



LIPOSOMES

M2 Pharmaceutique et Biopharmacie
(2024-2025)

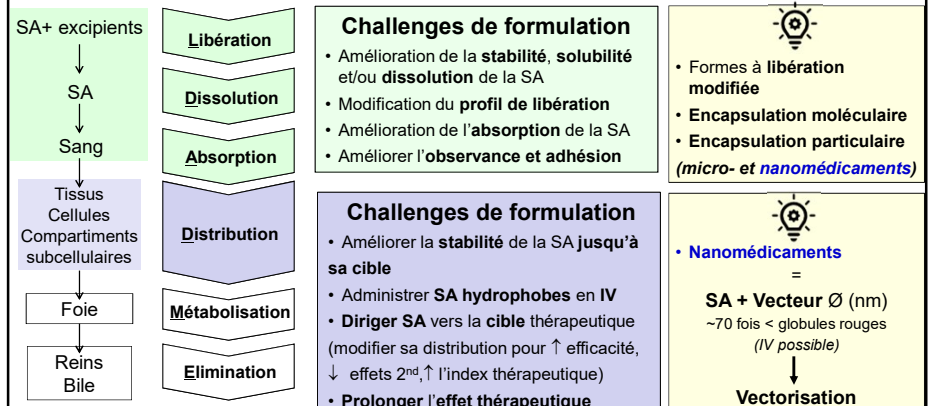
Pr Amélie BOCHOT
amelie.bochot@universite-paris-saclay.fr
Pr Vincent FAIVRE
vincent.favre@universite-paris-saclay.fr
Pr Elias FATTAL
elias.fattal@universite-paris-saclay.fr

PLAN

- RAPPELS
- APPLICATIONS & FORMULATION
- FABRICATION
- ATTRIBUTS QUALITE DU PRODUIT


RAPPELS

ADMINISTRATION D'UN MEDICAMENT DANS L'ORGANISME




UNE DIVERSITE DE NANOMEDICAMENTS


Nanosphères




Nanogels
(polymère hydrophile)




Nanocapsules à cœur huileux




Nanocapsules à cœur aqueux




Prodrogues lipidiques




Nanoémulsions



Nanocristaux




SA + stabilisant




Particules inorganiques

Liposomes



- Phospholipides en bicouche(s)
- Polyéthylène glycol
- Ligand de ciblage



≠ matériaux
≠ organisations supramoléculaires
(cf cours correspondants)

université PARIS-SACLAY FACULTÉ DE PHARMACIE 5

PRINCIPALES APPLICATIONS DES NANOMEDICAMENTS


> 50 nanomédicaments approuvés par la FDA
 Maladies chroniques, orphelines, diagnostic
 Petites molécules, molécules biologiques
Action générale +++, action locale
Voie intra-veineuse +++
Liposomes +++

Cancérologie +++

Infectiologie

Douleur

Nutrition parentérale



Inflammation

Ophthalmologie
(cours A. Bochet)

Vaccins et nanomédicaments à base d'ARN messenger
(cours F. Fay)

• Formulation
• Fabrication
• Coût
• Réglementaire

*90% non toxiques en Phase I
80% échouent en Phases II et III
→ manque d'efficacité en cancérologie*

université PARIS-SACLAY FACULTÉ DE PHARMACIE 6

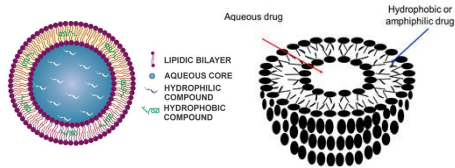
APPLICATIONS & FORMULATION

QU'EST-CE QU'UN LIPOSOME ?

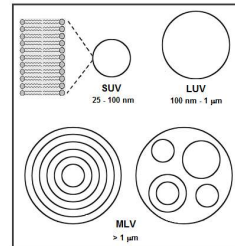
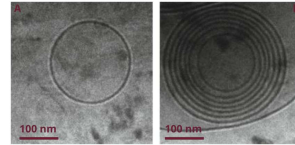


QU'EST-CE QU'UN LIPOSOME ?

Liposomes = vésicules

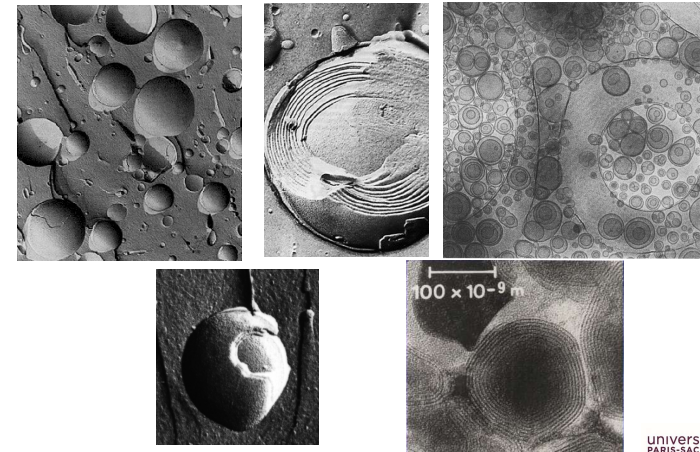


- Sphérique
- $\varnothing \sim 40 \text{ nm}$ à quelques μm
- 1 phase aqueuse
- Des molécules amphiphiles
- 1 ou plusieurs bicouches



Type de liposomes (avant calibration)

QU'EST-CE QU'UN LIPOSOME ?



PREMIERES APPLICATIONS : COSMETIQUE

Exemples de produits cosmétiques commercialisés à base de Liposomes

Nom du produit	Commercialisé par...	Rôle(s)
Capture Totale	Dior	Anti-rides et anti-tâches
Dermosome	Microfluidics	Hydratant
Decorte Moisture Liposome Face Cream	Decorte	Hydratant
Decorte Moisture Liposome Eye Cream	Decorte	Hydratant, brillance du contour des yeux
Natural Progesterone Liposomal Skin Cream	NOW Solutions	Bien-être général
C-Vit Liposomal Serum	Sesderma	Hydratant, favorise la synthèse du collagène, amélioration élasticité cutanée
Advanced Night Repair Protective Recovery Complex	Estée Lauder	Réparation cutanée
Fillderma Lips Lip Volumizer	Sesderma	Augmentation volume labial, hydratant, anti-rides
Lumessence Eye Cream	Aubrey Organics	Anti-rides, raffermissant
Russell Organics Liposome Concentrate	Russell Organics	Hydratant, raffermissant
Clinicians Complex Liposome Face and Neck Lotion	Clinicians Complex	Prévention du photo-vieillessement
Kerstin Florian Rehydrating Liposome Day Crème	Kerstin Florian	Hydratant
Liposomal Ferulac	Liposeceutical	Prévention et traitement du vieillissement
Gamme Aqua Energie	SO'BIO étic	Dynamisant, détoxifiant
B2 repair	Laboratoire Elphe	Anti-âge
Roivosome ACE Plus	Rovi Cosmetics Int.	Anti-âge, anti-rides
Lipobelle Soyglycone	Mibelle Biochemistry	Anti-oxydant



... Premières applications pharmaceutiques dans les années 1990

MYOCET®: FICHE D'IDENTITE

SA : DOXORUBICINE HCl (agent intercalant)

Indications : **Cancer** du sein métastatique, avec un risque cardiaque augmenté, cancer ovarien après l'échec d'une chimiothérapie de première intention à base de platine, en association avec le bortézomib pour le traitement du myélome multiple.

\varnothing : $\sim 150 \text{ nm}$

Structure multilamellaire

Composition (ratio molaire) : PC d'œuf / Cholestérol $\sim 1:1$

Ratio SA / lipides (en poids) : 0.27

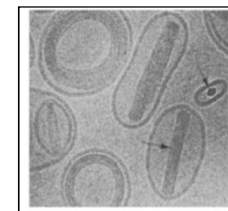
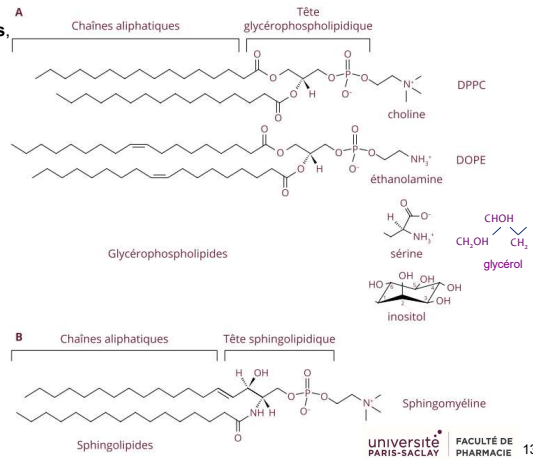
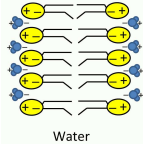
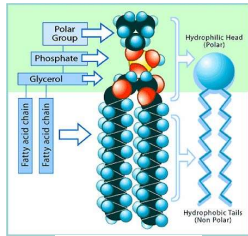


Fig. 2 Cryo-electron microscopy image of Myocet liposomes with encapsulated doxorubicin. The arrows indicate "frozen" bundles of doxorubicin-ultrafine filaments as seen from the side and from end-on (in the smaller inset) views. The liposome membrane is approximately 1 nm thick.

STRUCTURE DES PHOSPHOLIPIDES

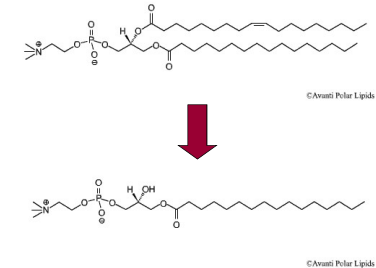
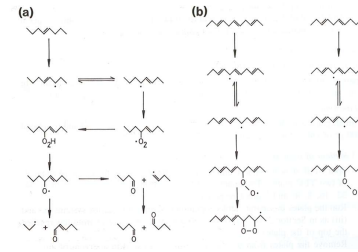
Glycérophospholipides naturels, synthétiques, saturés ou insaturés



PHOSPHOLIPIDES : RISQUE D'OXYDATION ET IMPORTANCE DE LEUR PURETE

Attention avec les PL insaturés
→ Risque d'oxydation +++

Pureté > 99%



Attention à la présence de lysophospholipides
↑↑ Perméabilité des liposomes

PHYSICO-CHIMIE DES PHOSPHOLIPIDES

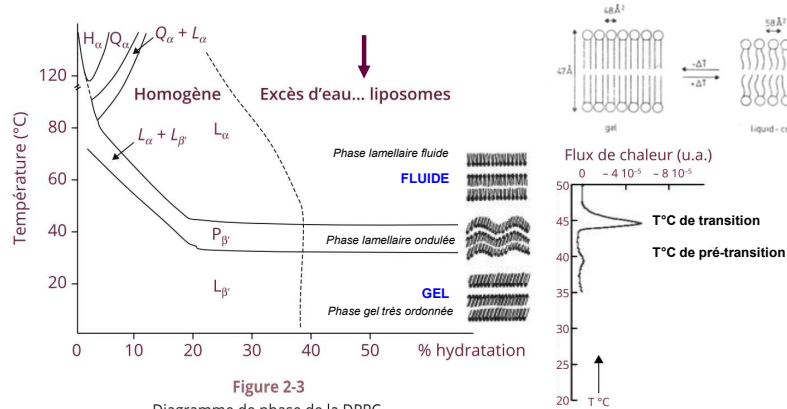


Figure 2-3

Diagramme de phase de la DPPC.

L : phase lamellaire, P : phase ondulée, H : phase hexagonale, Q : phase cubique.

TEMPERATURE DE TRANSITION

Selection of non-PEG 1,2-diacyl-sn-glycerophospholipids and main characteristics

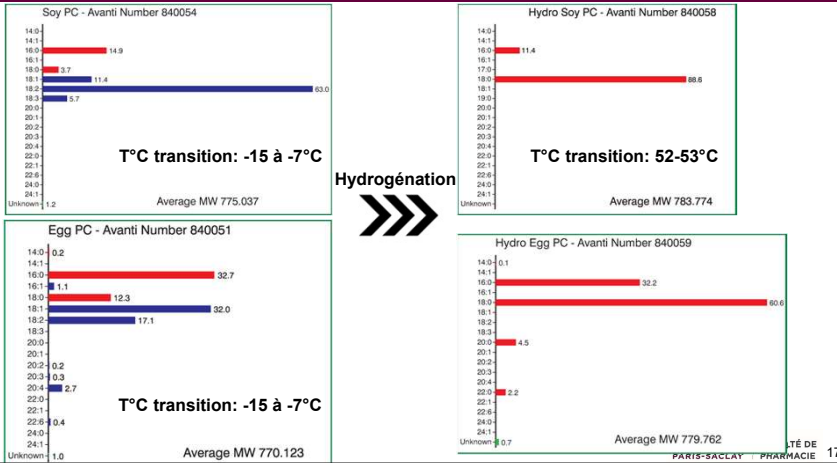
Name *	Abbreviation	Charge (at pH 7.4)	Transition Temperature T _c °C
Soy L-α-phosphatidylcholine	SPC	0	-15 to -7°C
Egg Yolk L-α-phosphatidylcholine	EPC	0	-15 to -7°C
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DOPC	0	-22°C
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DMPC	0	23°C
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DPPC	0	41°C
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	DSPC	0	58°C
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	DOPE	0	-16°C
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	DMPE	0	50°C
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	DPPE	0	63°C
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)	DOPG	-1	-18°C
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)	DMPG	-1	23°C
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)	DPGG	-1	41°C
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)	DSPG	-1	55°C
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt)	DOPS	-1	-11°C
1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt)	DOTAP	+1	<5°C

*Trivial names instead of IUPAC names have been used to save some space

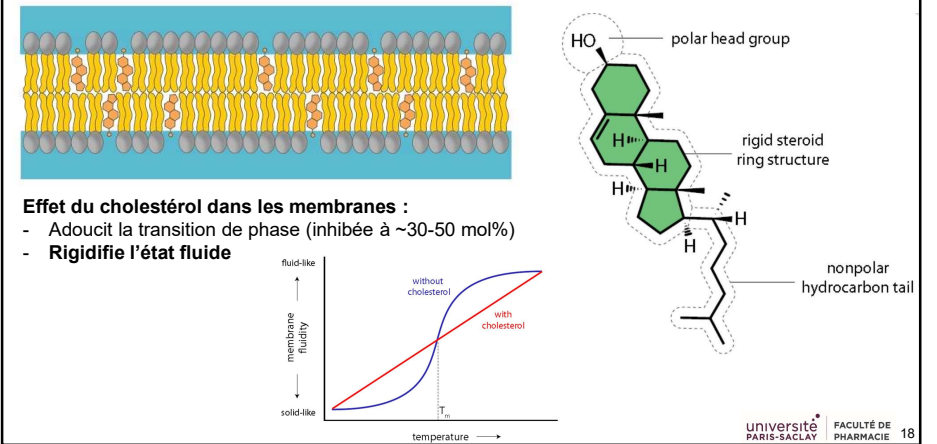
0° C de transition de phase
↑ avec le degré de saturation des lipides
↑ avec la longueur des chaînes

Important à prendre en compte pour la formulation et la fabrication des liposomes

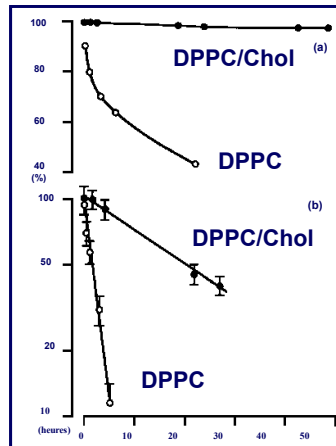
TEMPERATURE DE TRANSITION – MELANGES NATURELS



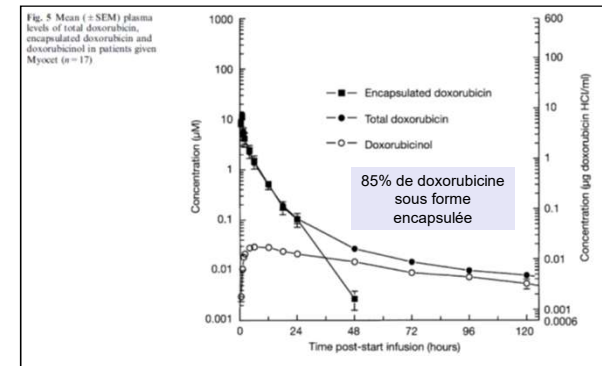
MYOCET®: ROLE DU CHOLESTEROL



ROLE DU CHOLESTEROL



MYOCET®: PHARMACOCINETIQUE



D p t des liposomes dans le système r ticulo-endoth lial puis **relargage** de la SA dans la circulation sanguine.

MYOCET®: PHARMACOCINETIQUE

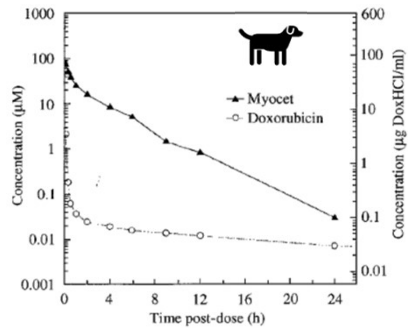


Fig. 3 Mean concentrations of doxorubicin HCl in the plasma of dogs after a single intravenous, slow bolus injection of 1.5 mg/kg of Myocet or conventional doxorubicin. Solid triangles are Myocet and open circles are conventional doxorubicin.

The Breast 2001, supplement 2, 1-7

Myocet® / doxorubicine libre

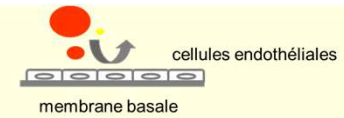
- ↓ Clairance 5-9 fois
- ↓ Volume de distribution 10-25 fois
- ↑ $T_{1/2}$ (16 à 50h)

Seminars in Cancer Biology 69 (2021) 190–199

MYOCET®: PHARMACOCINETIQUE

Endothélium à structure continue

Ex: vaisseaux normaux communs



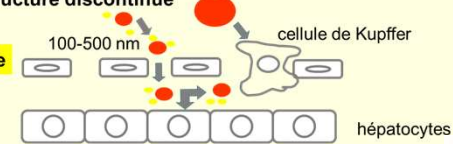
Endothélium à structure fenestrée

Ex: rein



Endothélium à structure discontinue (sinusoïde)

Ex: tumeurs, foie



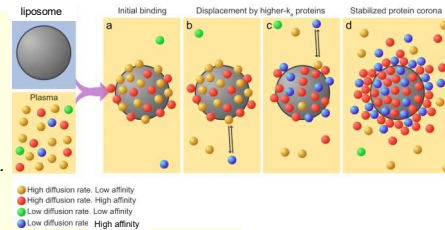
Voir Cours Mariana Varna

MYOCET®: PHARMACOCINETIQUE

Après administration IV de vecteurs :

- Adsorption de protéines sanguines

Opsonines : *fibronectine, complément, immunoglobulines, ...*
Autres protéines : *albumine, lipoprotéines, ...*



- Reconnaissance par le système réticulo-endothélial et phagocytose

- Disparition du compartiment sanguin et concentration importante dans le foie et la rate

Importance de la couronne protéique « corona » +++

Modification de la surface des particules par des polymères hydrophiles (ex: PEG) = vecteurs furtifs (2nde génération)

DOXIL/CAELYX®: FICHE D'IDENTITE

SA: DOXORUBICINE HCl

Indication : traitement du sarcome de Kaposi associé au SIDA, cancer ovarien n'ayant pas répondu au traitement par le cisplatine, cancer du sein.

Ø : ~ 100 nm

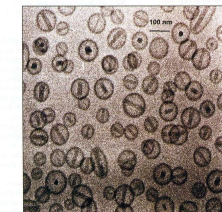
Structure unilamellaire

Composition: phosphatidylcholine de soja hydrogénée, cholestérol, mPEG*²⁰⁰⁰ carbamoyl DSPE sodique.

* Méthoxy polyéthylène glycol

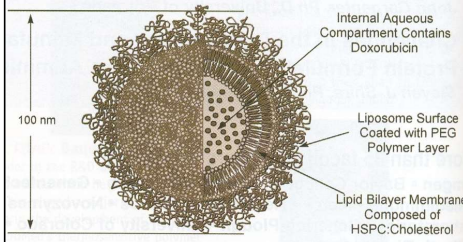


Cryo-electron micrograph of Doxil® liposomes.



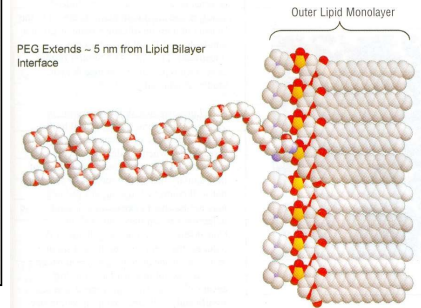
DOXIL/CAELYX®: STRUCTURE

Illustration of a Doxil® liposome. A single lipid bilayer membrane composed of hydrogenated soy phosphatidyl choline (HSPC) and cholesterol separates an internal aqueous compartment from the external medium. Doxorubicin is encapsulated in the internal compartment. Polymer groups (linear 2000 dalton segments of polyethylene glycol) are grafted to the liposome surface (although not shown, the polymer also extends from the inner monolayer of the membrane).



Voir Cours Mariana Varna

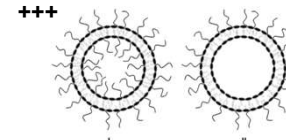
Space-filling model of PEG chain extending from a segment of the liposome surface. Note that only the outer monolayer of the liposome bilayer membrane is represented here. At the surface density of mPEG-2000 lipopolymer used in Doxil®, the hydrophilic layer provided by this STEALTH® coating extends approximately 5 nm from the lipid bilayer interface.



université PARIS-SACLAY FACULTÉ DE PHARMACIE 25

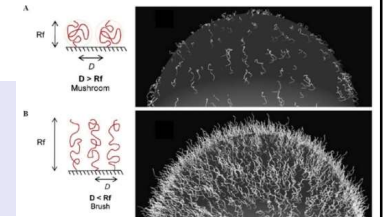
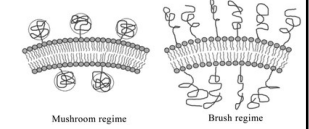
PEGYLATION : LONGUEUR ET DENSITE

Association pendant la formation ou en post-insertion



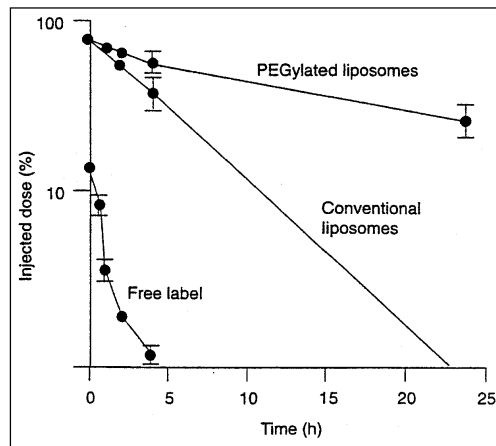
- Mobilité importante des chaînes
- Longueur optimale pour répulsion des protéines : PEG₂₀₀₀ à 5000
- Densité optimale : généralement 3-6 mole%
- Trop faible : espaces pour l'adsorption des protéines
- Trop élevée : ↓ la mobilité des chaînes

Voir Cours Mariana Varna



université PARIS-SACLAY FACULTÉ DE PHARMACIE 26

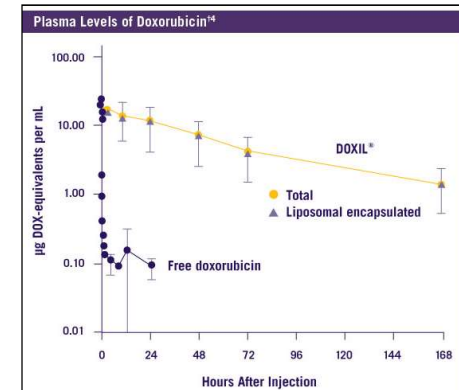
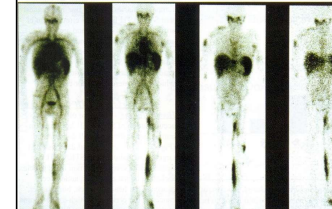
DOXIL/CAELYX®: EFFET PEG



université PARIS-SACLAY FACULTÉ DE PHARMACIE 27

DOXIL/CAELYX®: PHARMACOCINETIQUE

Serial gamma scintigrams of KS patient given ¹¹¹In-DTPA STEALTH® liposomes.¹⁴ The AIDS-KS patient pictured in the left panel received a single IV injection of liposomes containing ¹¹¹In-DTPA. Serial scintigrams were obtained for up to 96 hours after injection. Note the uptake pattern of the radiolabeled liposomes in the large KS lesions on the patient's left calf and thigh. Little uptake is seen at 4 hours; most of the label is present in the blood pool. Peak lesion uptake is seen at the 24- and 48-hour time points. A significant amount of the radiolabel remains in the lesion after 96 hours. Importantly, this technique reports the location of intact liposomes (any of the radiolabel released from liposomes is cleared by the kidneys within a few minutes).



Adapted from Gabizon et al. 1994

université PARIS-SACLAY FACULTÉ DE PHARMACIE 28

DOXIL/CAELYX®: BIODISTRIBUTION

Table 2. Localization of Doxorubicin in AIDS-45 Lesions*

Dose Level	PEG-Liposomal Doxorubicin	Doxorubicin	Concentration Ratio [†]
10 mg/m ²	2.06 ± 0.42	0.18 ± 0.07	11.4
20 mg/m ²	1.61 ± 0.80	0.31 ± 0.16	5.2
40 mg/m ²	7.71 ± 2.72	0.82 ± 0.18	9.4

* values are presented as the mean (± standard deviation) of the doxorubicin concentration (µg / gm tissue)
[†] concentration ratio = quotient of doxorubicin concentration measured in patients receiving PEG-liposomal doxorubicin divided by the doxorubicin concentration in patients receiving standard doxorubicin.

Accumulation dans les lésions
 vs.
 Toxicité cardiaque

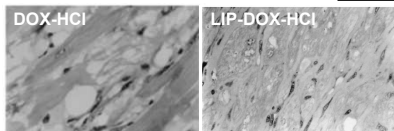


Fig. 3. Left ventricle from non-treated (doxorubicin-treated control) (1). Fig. 3. Left ventricle from rabbit treated with PL-DOX (1) and receiving high cumulative dose with severe cardiotoxicity and atrophy of normal lipoid tissue with mild vacuolization of myocardial fibers. Cases of death in 200 days. Cases of death in this control were 100%. Treatment time: 1200. Site visited five weeks after treatment-associated doxorubicin. Title

Incidence of heart lesions in dogs treated with PL-DOX or nonliposomal doxorubicin

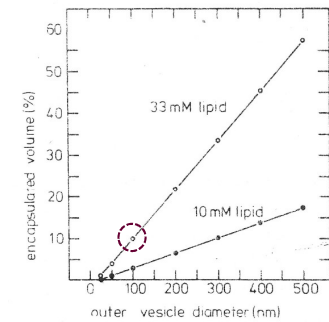
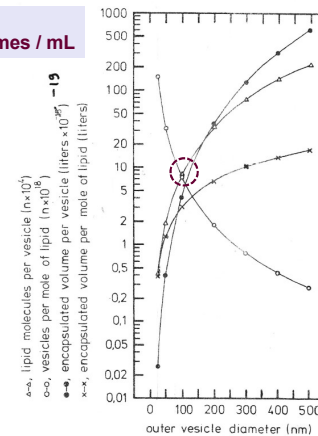
Site	PL-DOX ^a 0.25 mg/kg	PL-DOX ^a 0.75 mg/kg	PL-DOX ^a 1.0 mg/kg	DOX ^b 1.0 mg/kg
1 Week Post				
Right Ventricle	0/8	0/8	0/8	2/8
Left Ventricle	0/8	0/8	0/8	5/8
Papillary Muscle	0/8	0/8	0/8	5/8
Septum	0/8	0/8	0/8	4/8
Apex	0/8	0/8	0/8	6/8
Total Affected	0/8	0/8	0/8	6/8
Cardiotoxicity Score, Median (Range)	0	0	0	3 (1-8)
3 Weeks Post				
Right Ventricle	0/4	0/4	0/4	1/4
Left Ventricle	0/4	0/4	0/4	3/4
Papillary Muscle	0/4	0/4	0/4	3/4
Septum	0/4	0/4	0/4	4/4
Apex	0/4	0/4	0/4	4/4
Total Affected	0/4	0/4	0/4	4/4
Cardiotoxicity Score, Median (Range)	0	0	0	6 (3-11)

^a Pegylated liposomal doxorubicin.
^b Nonliposomal doxorubicin.

JPET 289:1128-1133, 1999

CHIFFRES CLES D'UNE SUSPENSION LIPOSOMALE

Doxil®
 2,3 10¹⁴ liposomes / mL



Inserm, Vol. 107, Méthodologie des liposomes/Liposome methodology

DAUNOXOME®:

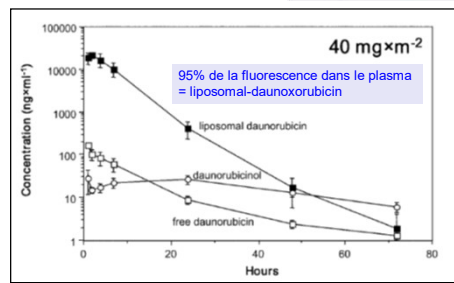
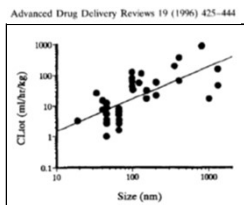
SA : DAUNORUBICINE

Indication : traitement du sarcome de Kaposi associé au VIH

Ø : ~ 45 nm

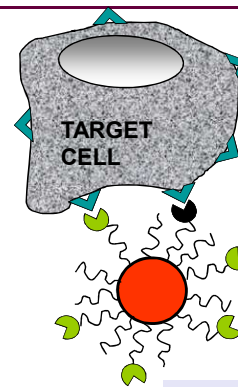
Structure unilamellaire

Composition : DSPC/cholestérol 2:1



Cancer Chemother Pharmacol (2001) 47: 15-21

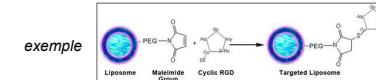
CIBLAGE



marqueur tumoral

Anticorps
 Peptides
 Lectines
 Petites Molécules

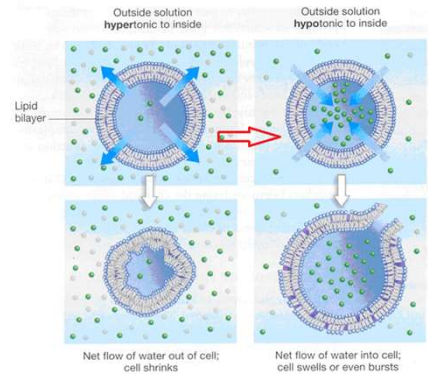
Spécificité
 Densité
 Stabilité ...



Voir Cours Mariana Varma

AUTRES EXCIPIENTS DANS LA FORMULATION DES LIPOSOMES

- **Tampons**
Citrate, Phosphate,...
- **Isotonisants**
NaCl, Glucose 5%,...
- **Cryoprotecteurs**
Tréhalose, sucrose...
- **Anti-oxydants**
 α -tocophérol, BHA*, BHT**
*butylhydroxyanisol, **butylhydroxytoluène



STABILITE DES LIPOSOMES DEPEND

- **Composition qualitative et quantitative**
- **Structure : MLV > LUV > SUV**
- **Charge de surface (potentiel zêta)**
- **Conditions de conservation**
 - Lumière
 - Oxygène
 - Température
- **Stabilisants**
 - Cholestérol ≥ 30 mol%
 - Alpha-tocophérol, BHT, BHA....
- **Lyophilisation**
 - Tréhalose, sucrose comme cryoprotectant

Exemples d'applications des liposomes



Visudyne
Vertéporfine
Solubilisation
DMLA



Ambisome
Amphotéricine B
Solubilisation,
distribution
Réduction de la
toxicité rénale
Anti-fongique,
anti-parasitaire



Caelyx, Myocet
Doxorubicine
Distribution
Réduction
toxicité cardiaque
Anticancéreux



ELA-Max
Lidocaïne
Forme topique
Anesthésique



DaunoXome
Daunorubicine
Distribution
Sarcome de Kaposi
associé HIV



Vyséo
phospholipides
Œil sec

ETAT DU MARCHÉ : BILAN

Product name	Active ingredient	Indication	year ¹	Lipids in formulation ²	Liposome type	PSD
Ambisome	Amphotericin	Fungal infections	1990	HSPC: DSPC: chol	Conventional	< 100 nm
Doxil/ Caelyx	Doxorubicin	Breast neoplasms; multiple myeloma; ovarian neoplasms; Kaposi's sarcoma	1995	HSPC: chol: DSPC-PEG 56:39:5 M	Stealth	100 nm
DaunoXome	Daunorubicin	Cancer advanced HIV-associated	1996	DSPC: chol 2: 1 M	Conventional	40-80 nm
DepoCyt	Cytarabine	Kaposi's sarcoma Neoplastic meningitis	1999 ¹	DOPC:DPPC	Conventional	20 μ m
Epaxal	Inactivated hepatitis A virus	Hepatitis A	1999	DOPC:DOPC 75:25 M	Conventional	150 nm
Myocet	Doxorubicin	Breast neoplasms	2000	EPC:chol	Conventional	80-90 nm
Visudyne	Verteporfin	Sub foveal choroidal neovascularization	2000	EPC:DPPC 3:5 M	Conventional	18-104 nm
DepoDur	Morphine	Pain relief	2004 ¹	DOPC:DPPC	Conventional	17-23 μ m
Marqibo	Vincristine	Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukaemia	2009	SPH:chol	Conventional	100 nm
Mepact	Mifamurtide	Osteosarcoma	2009	DOPC:DOPS 3:7 M	Conventional	1-5 μ m
Esparel	Bupivacaine	Anesthetic	2011	DEPC:DPPC: chol	Conventional	24-31 μ m
Lipodox	Doxorubicin	Breast neoplasms	2013	HSPC:chol: DSPC-PEG 56:39:5 M	Stealth	100 nm
Onivyde	Irinotecan	Metastatic Pancreatic Cancer	2015	DSPC:chol: DSPC-PEG 3:2:0.015	Stealth	110 nm
Mosquito	PfPR, S antigen-based vaccine	Vaccination to help against malaria caused by the parasite Plasmodium falciparum	2015	DOPC:chol	Conventional	50-100 nm
Doxorubicin	Doxorubicin	Breast neoplasms	2017	HSPC:chol: DSPC-PEG	Stealth	100 nm
Noctia	Bupivacaine	Anesthetic	2017	DSPC:DPPC: chol	Conventional	25-31 μ m
Vyxos	Daunorubicin	Acute myeloid leukemia	2017	HSPC:chol: DSPC:DSPC: chol 7:2:1	Conventional	107 nm
Shingrix	Glycoprotein E based vaccine	vaccine for prevention of herpes zoster	2017	DOPC:chol	Conventional	50-100 nm
Arkaace	Amikacin	Mycobacterium avium complex	2018	DPPC:chol	Conventional	300 nm

Substances actives

Masses molaires : 243 à 1278 g/mol
Log P : - 3.2 à + 5.5

Ø : majoritairement ~ 100 nm
PL : majoritairement à haute θ °C de transition de phase

Génériques pour Liposomes de doxorubicine et amphotéricine B

Drug	Original product	Generic version	Manufacturer
Doxorubicin hydrochloride	Doxil®	Adropeq 20®	Axiommax Oncology Pvt. Ltd
		DOXOrubicin®	Dr. Reddy's
		Doxilip®	United Biotech
		i-dox®	Getwell
		Lipodox®	Sun Pharma
Amphotericin B	Ambisome®	Lippod™	Celon Labs
		Nadrox-HP®	Natco Pharma Ltd.
		Pegadria 50®	Intas pharmaceutical Ltd.
		Rubilong™	Zuventus Healthcare Ltd.
		SinaDoxosome®	Esir Nano Sina Co
Amphotericin B	Ambisome®	Ambiope®	Abbott
		Ambilip®	United Biotech
		Amlight™	Celon Labs
Amphotericin B	Amphonex®	Bharat serums and vaccines Ltd.	
		Phosome 10®	Cipla

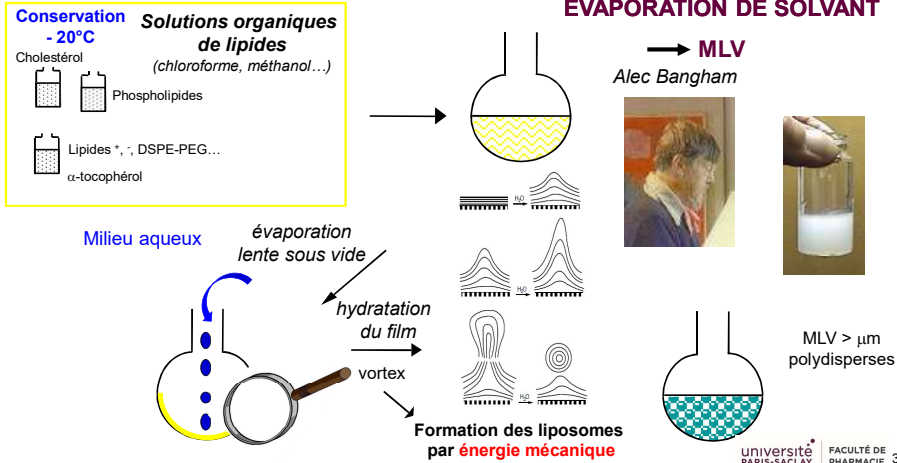
FABRICATION

MÉTHODES DE FABRICATION DES LIPOSOMES

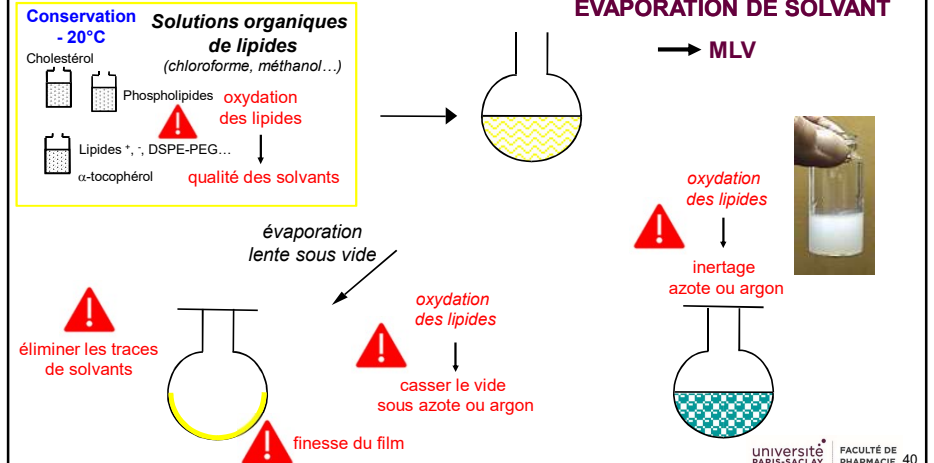
- Très nombreuses méthodes à l'échelle du laboratoire
- Méthodes utilisées à l'échelle industrielle
- Attributs qualité du produit



MÉTHODE D'HYDRATION DU FILM LIPIDIQUE 1961 : Echelle Labo EVAPORATION DE SOLVANT



MÉTHODE D'HYDRATION DU FILM LIPIDIQUE 1961 : Echelle Labo EVAPORATION DE SOLVANT



MÉTHODE D'HYDRATION DU FILM LIPIDIQUE 1961 : Echelle Labo

EVAPORATION DE SOLVANT

Solutions organiques de lipides + SA hydrophobe

Cholestérol
Phospholipides
Lipides *, , DSPE-PEG...
 α -tocophérol

→ MLV

Milieu aqueux + SA hydrophile
encapsulation dite passive

évaporation lente sous vide

hydratation

vortex

MLV > μm

Rendement d'encapsulation > 90%

Rendement d'encapsulation 10-30%

université PARIS-SACLAY FACULTÉ DE PHARMACIE 41

MÉTHODE PAR EVAPORATION EN PHASE INVERSE (REV) : Echelle Labo

LUV

Lipides dans solvant organique type éther éthylique

A

Rapport phase aqueuse/ phase organique = 1/3

B

Positionnement des PL à l'interface

C

Evaporation : formation de micelles inverses puis liposomes

Ultrasons émulsion eau dans huile

D

E

LUV ~ 500 nm
Calibration 100 nm

université PARIS-SACLAY FACULTÉ DE PHARMACIE 42

MÉTHODE DE DISPERSION DE SOLVANT : Echelle labo et industrielle

INJECTION DE SOLVANT

Solutions organiques de lipides

→ solvant miscible à l'eau éthanol +++

Cholestérol
Phospholipides
Lipides *, , DSPE-PEG...
 α -tocophérol

SA hydrophobe

Milieu aqueux + SA hydrophile

agitation magnétique

élimination du solvant

MLV > μm

Rendement d'encapsulation élevée

Rendement d'encapsulation ~ 20%

université PARIS-SACLAY FACULTÉ DE PHARMACIE 43

MÉTHODE DE DISPERSION DE SOLVANT : Echelle labo et industrielle

INJECTION DE SOLVANT

Solutions organiques de lipides

→ solvant miscible à l'eau éthanol +++

Cholestérol
Phospholipides
Lipides *, , DSPE-PEG...
 α -tocophérol

SA hydrophobe

Milieu aqueux + SA hydrophile encapsulation dite passive

agitation magnétique

oxydation des lipides

qualité des solvants

oxydation des lipides

inertage azote ou argon avant fermeture flacon

élimination du solvant

MLV > μm

Rendement d'encapsulation élevée

Rendement d'encapsulation ~ 20%

université PARIS-SACLAY FACULTÉ DE PHARMACIE 44

CALIBRATION DE LA TAILLE DES LIPOSOMES : ETAPE CRITIQUE

Après fabrication

MLV ~ μm et polydispersité

Généralement \varnothing ciblé : < 100 nm \rightarrow devenir *in vivo*, efficacité

SONICATION

échelle labo uniquement

- Rapide
- \uparrow T°C
- Relargage possible de particules métalliques

EXTRUSION

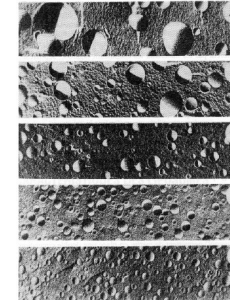
échelle labo et industrielle

HOMOGENEISATION

échelle labo et industrielle

CALIBRATION DE LA TAILLE DES LIPOSOMES : EXTRUDEUR

Généralement \varnothing ciblé, $\text{pdi} < 0,1 \rightarrow$ devenir *in vivo*, efficacité



$\varnothing \searrow$

\varnothing des liposomes fonction

- Porosité membranes utilisées
- Nombre de passages
- Si lipides saturés $T^\circ > T^\circ_{\text{transition}}$ thermostatier l'extrudeur



mais reproductible



dégradation certaines SA

CALIBRATION DE LA TAILLE DES LIPOSOMES : EXTRUDEUR

Lipex by Evonik

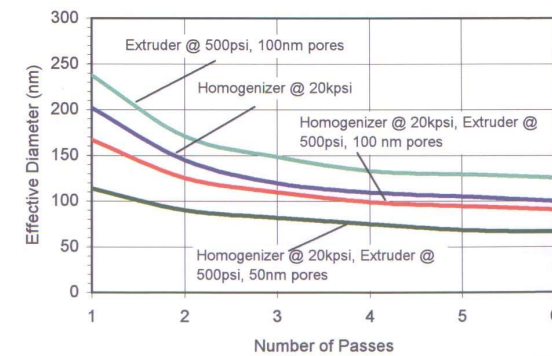


LIPEX® Flow Model	10 mL	100 mL	1000 mL
MAOP			
• psig	2450	2450	2450
• bar	170	170	170
MAOT (°C)**	80	80	80
Min. Extrusion volume	1 mL	20 mL	100 mL
Max. Extrusion volume	10 mL	100 mL	1000 mL
Weight (kg)	3	7	25
Material	316L Stainless steel		
• Body	EPDM		
• O-Ring			
Surface finish	Mechanically finished		



CALIBRATION DE LA TAILLE DES LIPOSOMES : HOMOGENEISEUR HAUTE PRESSION (cf cours particules lipidiques – V. Faivre)

Polydispersité > \varnothing ciblé : 100 nm, $\text{pdi} < 0,1 \rightarrow$ devenir *in vivo*, efficacité



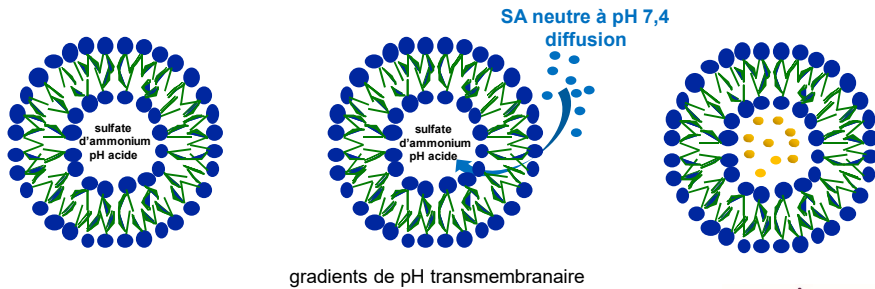
ENCAPSULATION DITE ACTIVE DES SA HYDROPHILES

Chargement SA hydrophiles (*acides et bases faibles*) avec des liposomes préformés
(exemples : daunorubicine, doxorubicine, bupivacaïne, vincristine...)

Fabrication de liposomes non chargés

Remplacement du milieu extérieur par dialyse

SA devient chargée et est piégée



PURIFICATION DES LIPOSOMES

Après fabrication, éliminer SA non encapsulée
Si SA libre → modification distribution, ↑ effets secondaires, ↓ efficacité
Calcul du rendement et du taux d'encapsulation

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION SUR GEL

ULTRACENTRIFUGATION

MEMBRANE

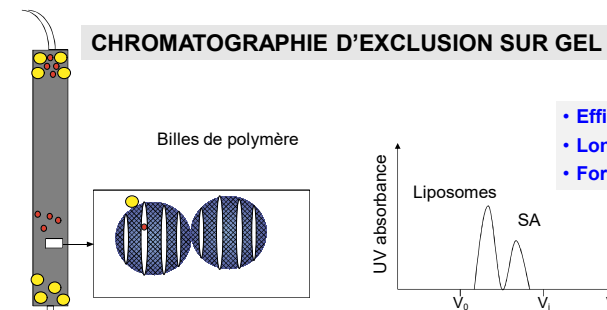
Pour SA hydrophobes, faire une centrifugation préalable à basse vitesse (*élimine SA précipitée si besoin*)

PURIFICATION DES LIPOSOMES

Après fabrication, éliminer SA non encapsulée
Si SA libre → modification distribution, ↑ effets secondaires, ↓ efficacité
Calcul du rendement et du taux d'encapsulation

PURIFICATION DES LIPOSOMES

Après fabrication, éliminer SA non encapsulée
Si SA libre → modification distribution, ↑ effets secondaires, ↓ efficacité
Calcul du rendement et du taux d'encapsulation



PURIFICATION DES LIPOSOMES

Après fabrication, éliminer SA non encapsulée
 Si SA libre → modification distribution, ↑ effets secondaires, ↓ efficacité
Calcul du rendement et du taux d'encapsulation

ULTRACENTRIFUGATION

dosage phospholipides
 dosage SA



surnaçant (SA libre)
 culot (liposomes)

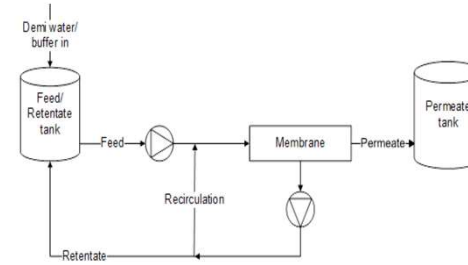
- température
- vitesse
- durée
 ~ 150 000 g

- Efficace
- Long
- Pas de dilution
- Peut altérer les liposomes
- Perte en lipides possible

PURIFICATION DES LIPOSOMES

Après fabrication, éliminer SA non encapsulée
 Si SA libre → modification distribution, ↑ effets secondaires, ↓ efficacité
Calcul du rendement et du taux d'encapsulation

MEMBRANE : dialyse, ultrafiltration, Diafiltration +++



- Long
- Choix de la membrane +++
- Débit, pression
 (seuil de coupure, adsorption)

DETERMINATION DE L'ENCAPSULATION DES SA

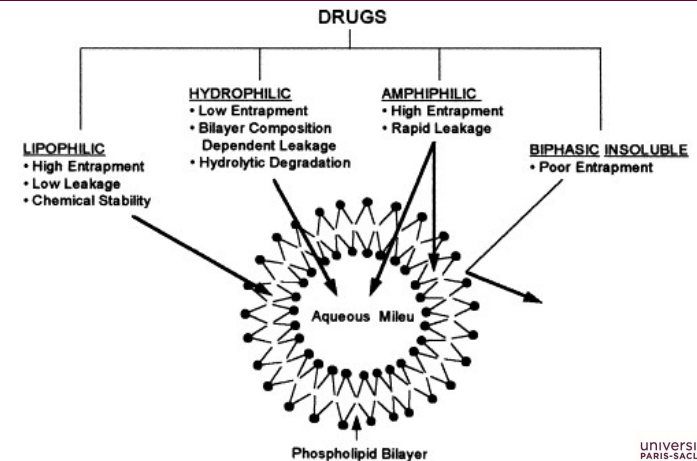
Après purification



Destruction des liposomes
 ↓
 Ajout d'un tensio-actif
 (Triton X100 ou Tween 80)

- Rendement d'encapsulation
 $\text{SA encapsulée} / \text{SA initiale} \times 100$
- Taux d'encapsulation
 $\text{mg de SA} / \text{mg de lipides} \times 100$
 $\mu\text{moles SA} / \mu\text{moles de lipides} \times 100$

ENCAPSULATION DES SA



ENCAPSULATION DES SA

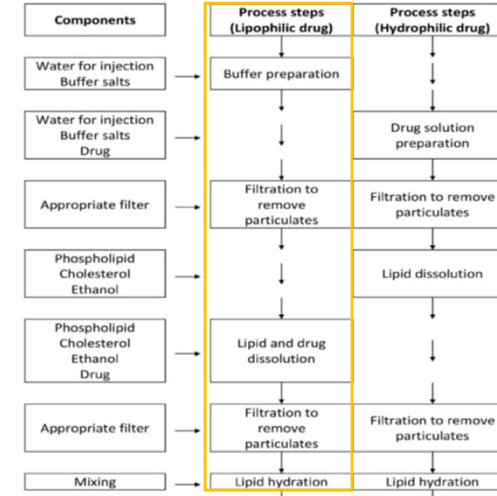
SA hydrophiles

- Morphologie et \emptyset des liposomes
- Concentration de lipides
 - ↑ nombre de liposomes
 - ↑ nombre de lamelles

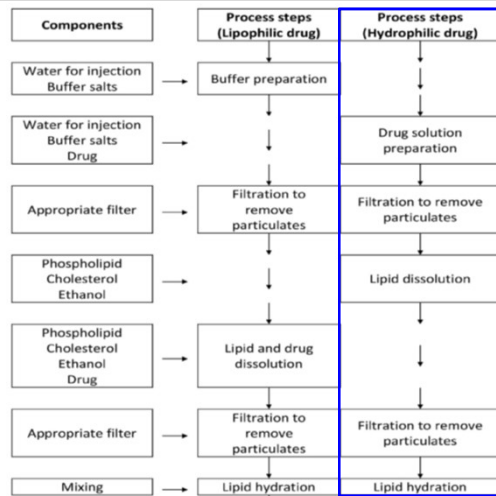
SA lipophiles

- Concentration de lipides
- Localisation dans la membrane dépend de
 - Coefficient de partage
 - Interaction avec les lipides
 - Compétition avec les lipides de la membrane

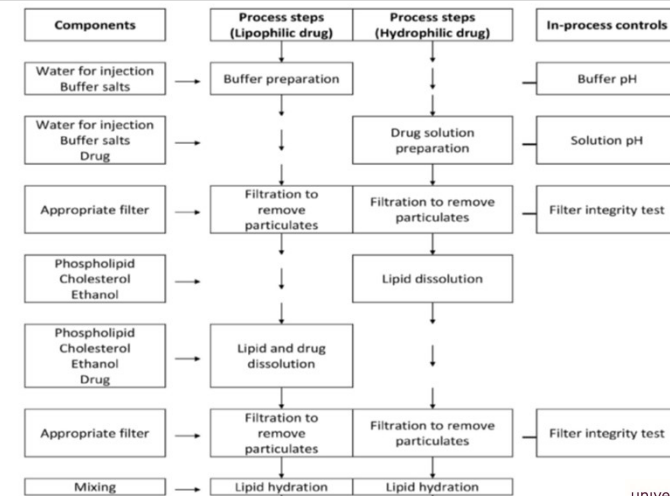
Fabrication industrielle des liposomes Les # étapes par injection d'éthanol



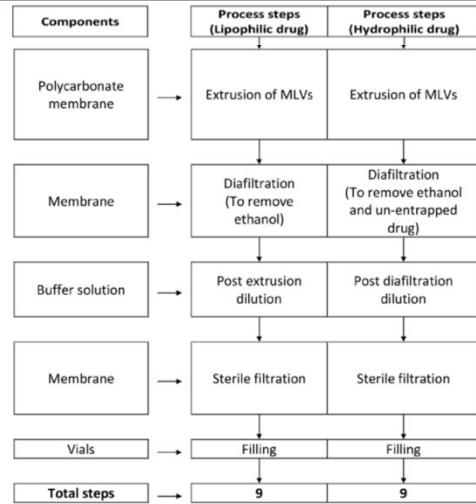
Fabrication industrielle des liposomes Les # étapes par injection d'éthanol



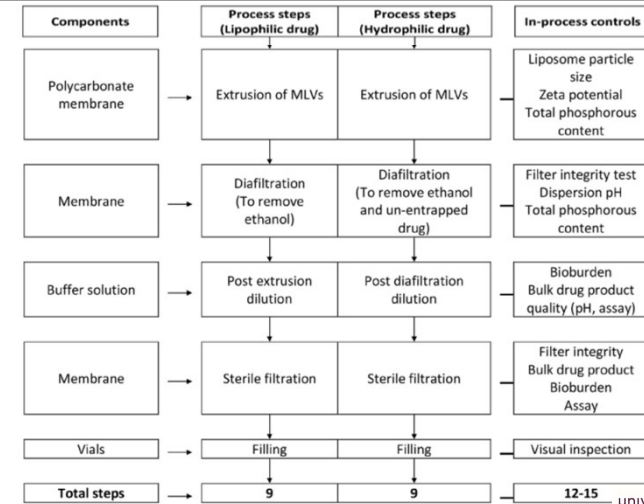
Fabrication industrielle des liposomes Les # étapes par injection d'éthanol



Fabrication industrielle des liposomes
Les # étapes suite



Fabrication industrielle des liposomes
Les # étapes suite



CONSERVATION DES LIPOSOMES

Attributs qualité critiques pouvant être affectés pendant la conservation

Ø, Taux d'encapsulation (*fuite*), Stabilité chimique

Suspension aqueuse
~ 70 % liposomes commercialisés



Conservation à 2-8°C



- Profil du produit
- Contraintes de production
- Marchés visés

Lyophilisation

~ 30 % liposomes commercialisés

↑ Stabilité à T°C ambiante

MAIS souvent effet sur

- ↑ Ø et polydispersité
- ↓ Taux de chargement si SA hydrophiles
- ↑ étapes et coût de fabrication

FABRICATION INDUSTRIELLE DES LIPOSOMES

Étapes nombreuses

Procédé long, énergivore, coûteux
ex : *extrusion et diafiltration*

Méthodes de stérilisation

- Filtration quand Ø cible << 0,2 µm (cas le plus fréquent)
- Fabrication aseptique si Ø > 0,2 µm



Equipements, petits matériels

- Aucune trace de tensio-actifs
- Nettoyage sans détergent

Lipides

- Qualité des solvants
- Inertage azote ou argon
- Chauffer pendant le procédé à θ°C > θ°C de transition de phase des lipides

ATTRIBUTS QUALITE DU PRODUIT

ATTRIBUTS QUALITE DU PRODUIT

Attributs qualité du produit	Rationnel
• Apparence	• Impactée par \emptyset , SA précipitée ...
• Identification de la SA	• Sécurité du patient
• Identification du cholestérol (<i>si présent</i>)	• Prévient la fuite <i>in vivo</i> de la SA • Performance de la formulation
• Identification des phospholipides	• Composants de base des liposomes (<i>non affecté par le procédé</i>)
• Turbidité	• Liée à la concentration de lipides et au \emptyset des liposomes
• Dosage des phospholipides	• Impacte l'encapsulation
• Dosage de la SA	• Impacte l'effet thérapeutique
• Encapsulation de la SA	• SA libre : pas la même distribution, toxicité que SA encapsulée
• Diamètre moyen et distribution	• Impacte le temps de circulation, distribution de la SA, sécurité du patient
• Charge de surface	• Stabilité physique, interaction avec milieu physiologique
• Libération <i>in vitro</i>	• Correspond aux profils attendus

ATTRIBUTS QUALITE DU PRODUIT

Attributs qualité du produit	Méthodes
• Apparence	• Visuelle
• Identification de la SA	• Cf méthodes analytiques
• Identification du cholestérol (<i>si présent</i>)	• Cf méthodes analytiques
• Identification des phospholipides	• CLHP, Chromatographie sur couche mince
• Turbidité	• UV
• Dosage des phospholipides	• Dosage du phosphate minéral, CLHP, dosage enzymatique
• Dosage de la SA	• Cf méthodes analytiques
• Encapsulation de la SA	• Dosage SA et lipides (<i>destruction des liposomes</i>)
• Diamètre moyen et distribution	• Diffusion quasi élastique de la lumière
• Charge de surface	• Mobilité électrophorétique (Zetamétrie)
• Libération <i>in vitro</i>	• Ultracentrifugation, dialyse, ultrafiltration, ...

ATTRIBUTS QUALITE DU PRODUIT suite

Attributs qualité produit	Rationnel
• pH	• Stabilité des lipides, SA
• Solvants résiduels	• Toxicité, stabilité des liposomes
• Volume extractible	• Impacte la dose administrée
• Osmolalité	• Impacte la tolérance et intégrité des liposomes
• Pyrogènes, endotoxines	• Sécurité du patient
• Stérilité	• Sécurité du patient

ATTRIBUTS QUALITE DU PRODUIT *suite*

Attributs qualité produit	Méthodes
• pH	• pH métrie
• Solvants résiduels	• RMN, Chromatographie gazeuse
• Volume extractible	• Pharmacopée
• Osmolalité	• Osmomètre
• Pyrogènes, endotoxines	• Pharmacopée
• Stérilité	• Pharmacopée

BIBLIOGRAPHIE

- Crommelin et al., **The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what?** Journal of Controlled Release 318 (2020) 256–263.
- Shah et al., **Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process.** Advanced Drug Delivery Review, 154–155, 2020, pages 102-122.
- Colombo et al., **Transforming nanomedicine manufacturing toward Quality by Design and microfluidics.** Advanced Drug Delivery Review, 128, 2018, pages 115-131.
- Joyce et al., **A translational framework to deliver nanomedicines to the clinic. Nature nanotechnology.** 2024. <https://doi.org/10.1038/s41565-024-01754-7>

Merci aux Pr Vincent Faivre et Elias Fattal



FABRICATION DU CAELYX/DOXIL

