



TECNICHE INNOVATIVE PER LA PRODUZIONE DI LIPOSOMI

NOVEL TECHNOLOGIES IN THE PRODUCTION OF LIPOSOMES

Cinzia De Caro¹

Abstract

ITA: Il lavoro di tesi presenta una revisione delle tecniche più recenti messe a punto per la produzione di strutture liposomiali. In particolare, sono stati analizzati i lavori della letteratura scientifica sviluppati per la messa a punto di nuove formulazioni e di nuove tecniche per la produzione di vescicole lipidiche per diversi campi di applicazione: dal settore farmaceutico a quello cosmetico e nutraceutico. A partire dalle caratteristiche dei metodi preparativi più tradizionali e dalle limitazioni ad essi associate, sono stati esaminati i vantaggi e gli svantaggi delle tecniche più recenti. Particolare rilievo è stato dato all'aspetto che riguarda il trasferimento della produzione dalla scala di laboratorio a quella industriale.

1. Introduzione

I liposomi sono strutture vescicolari costituite da uno o più bilayer lipidici che circondano un core acquoso. Per la loro composizione affine alla membrana cellulare i liposomi possono essere usati efficacemente come sistemi di veicolazione di molecole funzionali.

Oggi è disponibile una grande varietà di metodi preparativi, metodi che si differenziano per caratteristiche operative e prodotti ottenibili.

2.1. Liposomi

Come già riportato nella breve Introduzione, i liposomi sono piccole vescicole organizzate, dal punto di vista strutturale, con uno o più doppi strati fosfolipidici che delimitano all'interno un core idrofilo che è in genere costituito dallo stesso mezzo in cui i liposomi sono sospesi.

Nel processo di formazione dei liposomi, le molecole lipidiche disciolte nel mezzo di costituzione, molecole composte da una testa idrofila e una coda idrofobica, si autoassemblano in foglietti lipidici bimolecolari dopo aver diminuito la loro solubilità nel mezzo circostante.

Le teste polari sono esposte alla fase acquosa e le code apolari sono a contatto con il doppio strato. In Figura 1 [1] è illustrato schematicamente il processo di assemblaggio fondamentale relativo alla produzione di una vescicola unilamellare. La bassa solubilità in acqua delle molecole lipidiche influenza notevolmente la dinamica dello scambio lipidico tra il doppio strato e il mezzo circostante.

I lipidi più comunemente utilizzati sono i fosfolipidi, in particolare: la fosfatidilcolina e l'acido fosfatidico, il fosfatidilglicerolo, la fosfatidilserina e la fosfatidiletanolamina. Questi sono caricati negativamente e presentano, ognuno, una diversa combinazione di catene di acidi grassi nella regione idrofobica della molecola. Possono essere usati anche fosfolipidi di natura cationica come, ad esempio, la stearylamina. Oltre alla carica, la natura dei residui di acidi grassi in ciascuna molecola lipidica, in particolare il numero di doppi legami nella catena, è responsabile delle proprietà fondamentali dei doppi strati come il cambiamento di fase e l'elasticità [1].

I liposomi possono essere classificati in base a composizione e dimensione.

¹ Relatori: Gaetano Lamberti e Anna Angela Barba

Conclusioni

A partire dai principi base della preparazione dei liposomi, sono state sviluppate diverse nuove tecnologie per preparare i liposomi, che possono essere utilizzate per superare alcuni problemi tipici delle classiche procedure di preparazione. Ogni tecnica esaminata ha i suoi vantaggi e svantaggi legati a fattori quali costi, produttività e regime produttivo, uso di solventi, proprietà dei prodotti finali. Sebbene esistano ancora dei limiti anche nelle nuove tecnologie sviluppate, negli ultimi anni notevoli progressi sono stati fatti per rendere le tecniche più facilmente trasferibili dalla scala di laboratorio a quella industriale o a una scala intermedia interessante soprattutto per la preparazione di prodotti ad alto valore aggiunto.

Bibliografia

- [1] Aldo Jesorka and Owe Orwar. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2008. 1:801–32.
- [2] <https://www.gruppoptpp.it/sistemi-di-rilascio-basati-sui-liposomi/>
- [3] Akbarzadeh et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* 2013, 8:102.
- [4] Dirk van Swaay, Andrew deMello. Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab Chip*, 2013, 13, 752.
- [5] D.D. LASIC. Applications of Liposomes. *Handbook of Biological Physics Volume 1*
- [6] Abdus S. Liposome drug delivery system update review. *Current drug delivery*, 2007; 4; 297-305.
- [7] B. William, et al. Supercritical fluid methods: An alternative to conventional methods to prepare liposomes. *Chemical Engineering Journal* 383 (2020) 123106.
- [8] Lesoin L, Boutin O, Crampon C, et al. CO₂/water/surfactant ternary systems and liposome formation using supercritical CO₂: a review. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp* 2011; 377:1-14.
- [9] Lesoin L, Crampon C, Boutin O, et al. Preparation of liposomes using the supercritical anti-solvent (SAS) process and comparison with a conventional method. *J Supercrit Fluids* 2011; 57:162-174.
- [10] Otake K, Imura T, Sakai H, et al. Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide. *Langmuir* 2001; 17:3898-3901.
- [11] Zhenjun Huang, Xuan Li, et al. Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian journal of pharmaceutical sciences* 9 (2014) 176-182.
- [12] Massing U, Cicko S, Ziroli V. Dual asymmetric centrifugation (DAC): A new technique for liposome preparation. *J Control Release* 2008; 125:16-24.
- [13] Laouini A, Jaafar-Maalej C, Sfar S, et al. Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor Application to spironolactone encapsulation. *Int J Pharm* 2011; 415:53-61.
- [14] Jaafar-Maalej C, Charcosset C, Fessi H. A new method for liposome preparation using a membrane contactor. *J Liposome Res* 2011; 21:213-220.
- [15] Pham TT, Jaafar-Maalej C, Charcosset C, et al. Liposome and niosome preparation using a membrane contactor for scaleup. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012; 94:15-21.
- [16] Schubert R, Beyer K, Wolburg H, et al. Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate. *Biochemistry* 1986; 25:5263-5269.
- [17] Peschka R, Purmann T, Schubert R. Cross-flow filtration an improved detergent removal technique for the preparation of liposomes. *Int J Pharm* 1998; 162:177-183.
- [18] Wagner, A., Vorauer-Uhl, K., Kreismayr, G., Katinger, H., 2002. Enhanced protein loading into liposomes by the multiple crossflow injection technique. *J. Liposome Res.* 12,271–283.
- [19] Wagner, A., Platzgummer, M., Kreismayr, G., Quendler, H., Stiegler, G., Ferko, B., Vecera, G., Vorauer-Uhl, K., Katinger, H., 2006. GMP production of liposomes – a new industrial approach. *J. Liposome Res.* 16, 311–319.
- [20] Wagner, A., Vorauer-Uhl, K., 2011. Liposome technology for industrial purposes. *J. Drug Deliv.*, 1–9.
- [21] Catherine Charcosset, Audrey Juban, Jean-Pierre Valour, Sébastien Urbaniak, Hatem Fessi. Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices. *Chemical Engineering Research and Design Volume 94, February 2015, Pages 508-515.*

- [22] Oselys Rodriguez Justo*, Ângela Maria Moraes. Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume. The Institution of Chemical Engineers 2010
- [23] Wang T, Deng Y, Geng Y, et al. Preparation of submicron unilamellar liposomes by freeze-drying double emulsions. *Biochim Biophys Acta (BBA) e Biomembranes* 2006; 1758:222-231.
- [24] Novel methods for liposome preparation. Yogita P. Patil, Sameer Jadhav. *Chemistry and Physics of Lipids* 177 (2014) 8– 18
- [25] Wang, T., Wang, N., Sun, W., Li, T., 2011. Preparation of submicron liposomes exhibiting efficient entrapment of drugs by freeze-drying water-in-oil emulsions. *Chemistry and Physics of Lipids* 164, 151-157.
- [26] Stark, B., Pabst, G., Prassl, R., 2010. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: effects of cryoprotectants on structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41, 546–555
- [27] Jahn, A., Vreeland, W.N., Gaitan, M., Locascio, L.E., 2004. Controlled vesicle selfassembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing. *Journal of the American Chemical Society* 126, 2674–2675.
- [28] Jahn, A., Stavis, S.M., Hong, J.S., Vreeland, W.N., Devoe, D.L., Gaitan, M., 2010. Microfluidic mixing and the formation of nanoscale lipid vesicles. *ACS Nano* 4, 2077–2087.
- [29] Wi, R., Oh, Y., Chae, C., Kim, D.H., 2012. Formation of liposome by microfluidic flow focusing and its application in gene delivery. *Korea Australia Rheology Journal* 24, 129–135.
- [30] Mijajlovic, M., Wright, D., Zivkovic, V., Bi, J.X., Biggs, M.J., 2013. Microfluidic hydrodynamic focusing based synthesis of POPC liposomes for model biological systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 104, 276–281.
- [31] Huang, X., Caddell, R., Yu, B., Xu, S., Theobald, B., Lee, L.J., Lee, R.J., 2010. Ultrasoundenhanced microfluidic synthesis of liposomes. *Anticancer Research* 30, 463–466.
- [32] Hood, R.R., Shao, C., Omiattek, D.M., Vreeland, W.N., Devoe, D.L., 2013. Microfluidic synthesis of PEG- and folate-conjugated liposomes for one-step formation of targeted stealth nanocarriers. *Pharmaceutical Research* 30, 1597–1607.
- [33] Hong, J.S., Stavis, S.M., Depaoli Lacerda, S.H., Locascio, L.E., Raghavan, S.R., Gaitan, M., 2010. Microfluidic directed self-assembly of liposome hydrogel hybrid nanoparticles. *Langmuir* 26, 11581–11588.
- [34] Anna, S.L., Bontoux, N., Stone, H.A., 2003. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels. *Applied Physics Letters* 82, 364–366.
- [35] Thorsen, T., Roberts, R.W., Arnold, F.H., Quake, S.R., 2001. Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Physical Review Letters* 86, 4163–4166.
- [36] Kuroiwa, T., Kiuchi, H., Noda, K., Kobayashi, I., Nakajima, M., Uemura, K., Sato, S., Mukataka, S., Ichikawa, S., 2009. Controlled preparation of giant vesicles from uniform water droplets obtained by microchannel emulsification with bilayer-forming lipids as emulsifiers. *Microfluidics and Nanofluidics* 6, 811–821.
- [37] Sugiura, S., Kuroiwa, T., Kagota, T., Nakajima, M., Sato, S., Mukataka, S., Walde, P., Ichikawa, S., 2008. Novel method for obtaining homogeneous giant vesicles from a monodisperse water-in-oil emulsion prepared with a microfluidic device. *Langmuir* 24, 4581–4588.
- [38] Matosevic, S., Paegel, B.M., 2011. Stepwise synthesis of giant unilamellar vesicles on a microfluidic assembly line. *Journal of the American Chemical Society* 133, 2798–2800.
- [39] Shum, H.C., Lee, D., Yoon, I., Kodger, T., Weitz, D.A., 2008. Double emulsion template monodisperse phospholipid vesicles. *Langmuir* 24, 7651–7653.
- [40] Davies, R.T., Kim, D., Park, J., 2012. Formation of liposomes using a 3D flow focusing microfluidic device with spatially patterned wettability by corona discharge. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 22.
- [41] Sabrina Bochicchio, Annalisa Dalmoro, Federica Recupido, Gaetano Lamberti, Anna Angela Barba. Nanoliposomes Production by a Protocol Based on a

Simil-Microfluidic Approach. Book Advances Bionanomaterials pp 3-8.

[42] Sabrina Bochicchio, Annalisa Dalmoro, Paolo Bertocin, Gaetano Lamberti, Rouslan I. Moustafinee, Anna Angela Barba. Design and production of hybrid nanoparticles with polymeric-lipid shell-core structures: conventional and next-generation approaches. RSC Adv., 2018,8, 34614-34624



Cinzia De Caro