

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Utilizarea nanosistemelor farmaceutice pentru modularea unor procese de la nivelul micromediului tumoral

---

Doctorand

**Cristina-Ioana Barbălată**

---

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

---



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

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	19
<b>ASPECTE GENERALE</b>	
<b>1. Rolul micromediului tumoral în evoluția cancerului și a rezistenței terapeutice</b>	23
<b>2. Modularea micromediului tumoral pentru îmbunătățirea efectului terapeutic anticanceros</b>	27
2.1. Monoterapia	27
2.2. Terapia combinată	30
<b>3. Utilizarea nanosistemelor în terapia cancerului</b>	33
3.1. Lipozomii	35
<b>4. Implementarea conceptului de Calitate prin Design in dezvoltarea nanosistemelor farmaceutice</b>	39
<b>CONTRIBUTII PERSONALE</b>	
<b>1. Obiective generale/ Ipoteza de lucru</b>	45
<b>2. Metodologie generală</b>	47
2.1. Implementarea conceptului de QbD in dezvoltarea lipozomilor	47
2.2. Analiza datelor	47
2.3. Tehnica de preparare al lipozomilor	47
2.4. Studiile de proliferare celulară	48
<b>3. Implementarea conceptului de QbD în dezvoltarea unei formulări lipozomale cu EGCG</b>	49
3.1. Introducere	49
3.2. Materiale și Metode	50
3.2.1. Materiale	50
3.2.2. Metode	51
3.2.2.1. Implementarea QbD-ului în dezvoltarea lipozomilor	51
3.2.2.2. Prepararea lipozomilor	52
3.2.2.3. Determinarea conținutului de EGCG din lipozomi	52
3.2.2.4. Determinarea mărimii lipozomilor	52
3.2.2.5. Determinarea potențialului zeta	52
3.2.2.6. Studiul de cedare <i>in vitro</i>	53
3.2.2.7. Cultivarea celulelor	53

3.2.2.8. Testul de viabilitate celulară cu MTT	53
3.3. Rezultate	54
3.3.1. Stabilirea QTPP-ului, identificarea CQA-urilor și analiza de risc	54
3.3.2. DoE și analiza statistică a datelor	55
3.3.2.1. Influența factorilor de formulare asupra conținutului de EGCG încapsulat în lipozomi	56
3.3.2.2. Influența factorilor de formulare asupra EE%	57
3.3.2.3. Influența factorilor de formulare asupra mărimii lipozomilor	58
3.3.2.4. Influența factorilor de formulare asupra potențialului zeta	58
3.3.2.5. Design space-ul	59
3.3.2.6. Studiul de cedare <i>in vitro</i>	60
3.3.3. Viabilitatea celulară	61
3.4. Discuții	62
3.5. Concluzii	66
<b>4. Un studiu de screening pentru dezvoltarea lipozomilor co-încapsulați cu Simvastatină și Doxorubicină, o formulare cu potențiale beneficii în terapia cancerului de colon</b>	67
4.1. Introducere	67
4.2. Materiale	70
4.3. Metode	70
4.3.1. Implementarea conceptului de QbD	70
4.3.2. Prepararea lipozomilor	71
4.3.3. Caracterizarea lipozomilor	72
4.3.3.1. Determinarea concentrațiilor de SIM și DOX încapsulate în lipozomi	72
4.3.3.2. Determinarea mărimii lipozomilor, PdI și a potențialului zeta	72
4.3.3.3. Determinarea morfologiei lipozomilor utilizând microscopia electronică de transmisie (TEM)	72
4.3.3.4. Studiul de cedare <i>in vitro</i>	73
4.3.4. Efectuarea co-culturii celulare	73
4.3.5. Studiul de proliferare celulară	74
4.4. Rezultate și Discuții	74
4.4.1. Stabilirea QTPP-ului și a CQA-urilor	74
4.4.2. Analiza de risc	75
4.4.3. DoE	80
4.4.4. Analiza DoE-ului	80

4.4.4.1. Influența factorilor de formulare asupra concentrației de substanță încapsulată în lipozomi	80
4.4.4.2. Influența factorilor de formulare asupra EE%	83
4.4.4.3. Influența factorilor de formulare asupra mărimii lipozomilor	84
4.4.4.4. Influența factorilor de formulare asupra PdI-ului	86
4.4.4.5. Influența factorilor de formulare asupra potențialului zeta	87
4.4.5. Analiza TEM	88
4.4.6. Studiul de cedare <i>in vitro</i>	89
4.4.7. Influența lui SIM și a lui DOX asupra proliferării celulelor de cancer de colon murin C26 în co-cultură cu macrofage	91
4.5. Concluzii	96
<b>5. Utilizarea conceptului de QbD pentru a optimiza co-încapsularea Simvastatinei și a Doxorubicinei în lipozomi în vederea obținerii unui efect anticanceros sinergic</b>	97
5.1. Introducere	97
5.2. Materiale	98
5.3. Metode	99
5.3.1. Optimizarea procesului de obținere a SIM-DOX-LCL	99
5.3.2. Prepararea lipozomilor	99
5.3.2.1. Prepararea lipozomilor încărcăți cu SIM	99
5.3.2.2. Prepararea lipozomilor încărcăți cu SIM și DOX	100
5.3.2.3. Prepararea lipozomilor încărcăți cu DOX	100
5.3.2.4. Prepararea lipozomilor goi	100
5.3.3. Caracterizarea lipozomilor	100
5.3.3.1. Determinarea concentrației de SIM și DOX încapsulată în lipozomi. Determinarea EE%.	100
5.3.3.2. Determinarea mărimii lipozomilor, a PdI-ului și a potențialului zeta	101
5.3.3.3. Studiul de cedare <i>in vitro</i>	101
5.3.3.4. Studiul de stabilitate	101
5.3.4. Cultivarea celulelor	102
5.3.5. Testul de proliferare celulară	102
5.4. Rezultate și Discuții	103
5.4.1. Optimizarea procesului de obținere a SIM-DOX-LCL	103
5.4.2. Studiul de cedare <i>in vitro</i>	111

5.4.2.1. Evaluarea profilului de cedare a SIM și DOX din formula optimă utilizând o metodă de analiză HPLC	111
5.4.2.2. Compararea metodei de analiză HPLC cu o metodă cronamperometrică în ceea ce privește concentrația de SIM și DOX în mediul de cedare	113
5.4.3. Studiul de stabilitate	114
5.4.4. Testul de proliferare celulară	116
5.5. Concluzii	119
<b>6. Dezvoltarea de pulberi inhalatorii ce conțin lipozomi încapsulați cu SIM, utilizând tehnologia de spray-drying</b>	121
6.1. Introducere	121
6.2. Materiale	123
6.3. Metode	123
6.3.1. Utilizarea planurilor experimentale în dezvoltarea pulberilor inhalatorii conținând SIM-L	123
6.3.2. Prepararea SIM-L	123
6.3.3. Procesul de spray-drying a SIM-L	124
6.3.4 Caracterizarea SIM-L și a pulberilor inhalatorii	124
6.3.4.1. Cuantificarea concentrației de SIM încapsulată în lipozomi și determinarea EE%. Cuantificarea conținutului de SIM în pulberea inhalatorie.	124
6.3.4.2 Determinarea mărimii, a Pdl-ului și a potențialului zeta a SIM-L și a lipozomilor din pulberea inhalatorie	124
6.3.4.3. Determinarea randamentului	124
6.3.4.4. Determinarea profilului aerodinamic a pulberii inhalatorii	125
6.3.4.5. Caracterizarea morfologică a pulberilor inhalatorii utilizând microscopul electronic de scanare (SEM)	125
6.4. Rezultate și Discuții	125
6.4.1. Identificarea CQAs a pulberii inhalatorii și a lipozomilor obținuți prin spray-drying. Identificarea CPP-urilor și a CMA-urilor. Conceperea DoE-ului și efectuarea experimentelor.	125
6.4.2. Analiza statistică a DoE-ului	129
6.4.2.1. Influența factorilor de formulare asupra randamentului procesului	129
6.4.2.2. Influența factorilor de formulare asupra umidității reziduale din pulberile inhalatorii	130

6.4.2.3. Influența factorilor de formulare asupra conținutului de substanță activă din pulberile inhalatorii	132
6.4.2.4. Influența factorilor de formulare asupra MMAD-ului și a FPF-ului	132
6.4.2.5. Influența factorilor de formulare asupra aspectului morfologic al pulberilor inhalatorii	134
6.4.2.6. Influența factorilor de formulare asupra mărimii și a PdI-ului lipozomilor obținuți prin spray-drying	135
6.4.2.7. Influența factorilor de formulare asupra potențialului zeta a lipozomilor obținuți prin spray-drying	136
6.4.3. Desing space-ul și formula optima	137
6.5. Concluzii	139
<b>7. Concluzii generale</b>	141
<b>8. Originalitatea și elementele de inovație ale tezei</b>	143
<b>REFERINȚE BIBLIOGRAFICE</b>	145

**CUVINTE CHEIE:** lipozomi; micromediul tumoral; cancer; conceptul de calitate prin design.

## INTRODUCERE

Cancerul este cunoscut ca fiind un grup de boli care afectează milioane de oameni. Acest lucru a condus la ridicarea unor semne de întrebare în ceea ce privește conexiunea dintre biologia tumorilor și variabilitatea răspunsului terapeutic. Ultimele descoperiri din domeniu au evidențiat faptul că tumorile au capacitatea de a transforma anumite celule sănătoase în celule pro-canceroase, iar acest mecanism favorizează creșterea tumorilor, dezvoltarea unor mecanisme de rezistență la terapia anticanceroasă și apariția metastazelor.

Datorită faptului că schemele terapeutice actuale prezintă numeroase dezavantaje precum apariția a numeroase efecte adverse sistemice, complianța redusă a pacientului la terapie, lipsa eficacității, costuri ridicate cu asistența medicală, agențiile internaționale pentru aprobarea medicamentelor promovează ideea de a investiga potențialul anticanceros a substanțelor medicamentoase deja aprobate. Cu toate acestea, ultimele studii au evidențiat un interes crescut în găsirea de noi molecule cu efect anticanceros printre compușii de origine naturală.

În ciuda acestor descoperiri, cea mai mare provocare în terapia cancerului rămâne asigurarea unei concentrații crescute de compus activ la nivelul tumorii. În ultimii ani, dezvoltarea nanoparticulelor pentru terapia cancerului a prezentat un interes crescut în rândul cercetătorilor. Avantajele acestor formulări farmaceutice sunt scăderea numărului și a intensității efectelor adverse prin transportul substanțelor active la locul țintei, posibilitatea de a încorpora compuși cu diferite proprietăți fizico-chimice și obținerea unor efecte sinergice.

Luând în considerare aceste provocări, obiectivul acestei teze a fost dezvoltarea de nanosisteme farmaceutice pentru utilizarea în terapia cancerului și pentru modularea diferitelor procese asociate micromediului tumoral.

## ASPECTE GENERALE

Prima parte a tezei intitulată "Aspecte generale" este împărțită în patru secțiuni astfel: în prima parte sunt prezentate aspecte generale despre rolul micromediului tumoral în progresia cancerului și potențialele ținte terapeutice; în a doua parte s-a discutat despre utilizarea diferitelor substanțe medicamentoase în monoterapie sau terapie combinată pentru modularea diferitelor procese asociate micromediului tumoral; în a treia secțiune au fost prezentate diferitele tipuri de nanoparticule care sunt utilizate curent în terapia cancerului; iar în a patra secțiune au fost prezentate elemente generale despre implementarea conceptului de Calitate prin Design (QbD) în dezvoltarea nanoparticulelor.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Cea de-a doua parte a tezei include patru studii de cercetare în care au fost dezvoltate nanoparticule lipidice pentru utilizarea lor în terapia cancerului. Dezvoltarea nanoparticulelor s-a făcut utilizând conceptul QbD. Primul studiu s-a axat pe dezvoltarea lipozomilor încapsulați cu un polifenol extras din ceaiul verde având ca scop țintirea celulelor stem implicate în progresia cancerului oral. Studiul a prezentat principalele provocări asociate cu instabilitatea fizico-chimică a compusului și beneficiile încorporării acestuia în lipozomi. Cel de-al doilea studiu a avut ca scop investigarea factorilor de proces și de formulare care ar putea influența profilul de calitate al lipozomilor co-încapsulați cu simvastatină și doxorubicină, precum și evidențierea efectului antiproliferativ al acestei formulări pe o linie de cancer de colon murin în co-cultură cu macrofage. Scopul celui de-al treilea studiu a fost optimizarea procesului de co-încapsulare a simvastatinei și doxorubicinei în lipozomi, precum și investigarea efectului anticanceros a formulării lipozomale pe două linii celulare de cancer uman: cancer de sân și cancer pulmonar. Mai mult decât atât, în cadrul acestui studiu a fost testată o nouă metodă electrochimică pentru dozarea simultană a

simvastatinei și doxorubicinei din mediul de cedare. Această metodă are avantajul că este mult mai rapidă comparativ cu metoda de testare standard HPLC. Rezultatele pozitive obținute în cadrul celui de-al treilea studiu cu privire la efectul antiproliferativ al simvastatinei pe linia celulară de cancer pulmonar, au stat la baza conceperii celui de-al patrulea studiu, și anume dezvoltarea unei pulberi inhalatorii care să conțină lipozomi cu simvastatină pentru terapia cancerului pulmonar.

## CONCLUZII GENERALE

Această teză s-a bazat pe faptul că atât tumorile cât și micromediul tumoral prezintă numeroase potențiale ținte pentru terapia anticanceroasă, iar terapia combinată aduce mai multe beneficii terapeutice în comparație cu monoterapia. Cu toate acestea, studiile de proliferare celulară trebuie să susțină efectul sinergic sau aditiv al terapiei combinate înainte de a fi investigată pe modele animale.

În toate cele patru studii, conceptul de QbD a fost implementat în procesul de dezvoltare a nanosistemelor farmaceutice cu scopul de a oferi o viziune detaliată asupra tuturor interacțiunilor dintre excipienți și parametrii de proces care ar putea afecta în mod negativ calitatea produsului finit. Pe baza acestor rezultate au fost concepute formulări lipozomale optime care să îndeplinească reglementările internaționale din acest domeniu. Mai mult decât atât, studiile de proliferare efectuate pe diferite linii celulare canceroase și/sau celule asociate micromediului tumoral, au evidențiat că lipozomii dezvoltați în cadrul acestei teze au prezentat un efect inhibitor mai pronunțat comparativ cu substanțele libere.

## ELEMENTELE DE ORIGINALITATE ALE TEZEI

Având în vedere rezultatele promițătoare obținute în studiile de proliferare celulară, se poate afirma că în cadrul acestei teze au fost dezvoltate două noi formulări lipozomale, una cu 3-galat de epigallocatechină pentru terapia cancerului oral și o pulbere inhalatorie ce conține lipozomi cu simvastatină pentru terapia cancerului pulmonar. Aceste formulări lipozomale au avantajul de a transporta substanța activă direct la locul de acțiune într-o concentrație crescută utilizând dispozitive intuitive pentru pacienți ceea ce va conduce ulterior la îmbunătățirea complianței pacientului la terapie și reducerea numărului și intensității reacțiilor adverse. De asemenea, asocierea dintre simvastatină și doxorubicină a evidențiat un efect negativ asupra proliferării a trei tipuri de celule canceroase, punând în evidență potențialele beneficii a acestei combinații în terapia cancerului.

Utilizarea metodei cronampermetrice pentru cuantificarea simultană a simvastatinei și doxorubicinei în cel de-al treilea studiu, reprezintă de asemenea un element de noutate al acestei teze. Rezultatele acestui studiu au evidențiat că această



metodă analitică are capacitatea de a înlocui în viitor metodele standard de analiză. Principalele avantaje atribuite acestei metode sunt costul redus, utilizarea unui volum mic de probă/ reactivi și mai ales faptul că poate fi utilizată în domeniul medical sau farmaceutic pentru detecția/cuantificarea rapidă a diverselor molecule medicamentoase.

---

PhD THESIS SUMMARY

# Modulation of tumor microenvironment-associated processes by the use of nanosystems

---

PhD Student      **Cristina-Ioana Barbălată**

---

PhD Supervisor    Prof.dr. **Ioan Tomuță**

---



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

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	19
<b>GENERAL ASPECTS</b>	
<b>1. The role of tumor microenvironment in cancer progression and drug resistance</b>	23
<b>2. Modulation of tumor microenvironment for an enhanced anticancer effect</b>	27
2.1. Monotherapy	27
2.2. Combined therapy	30
<b>3. The use of nanosystems in cancer therapy</b>	33
3.1. Liposomes	35
<b>4. Implementation of Quality by Design approach in the development of pharmaceutical nanosystems</b>	39
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. General objectives/ Work hypothesis</b>	45
<b>2. General methodology</b>	47
2.1. The implementation of QbD approach in the development of liposomes	47
2.2. Data analysis	47
2.3. The preparation process of liposomes	47
2.4. Antiproliferative studies	48
<b>3. Application of the QbD approach in the development of a liposomal formulation with EGCG</b>	49
3.1. Introduction	49
3.2. Materials and Methods	50
3.2.1. Materials	50
3.2.2. Methods	51
3.2.2.1. Application of the QbD steps in liposomes development	51
3.2.2.2. Preparation of liposomes	52
3.2.2.3. Determination of liposomal EGCG content	52
3.2.2.4. Liposomal size analysis	52
3.2.2.5. Zeta potential measurements	52
3.2.2.6. <i>In vitro</i> drug release	53
3.2.2.7. Cell cultures	53

3.2.2.8. MTT viability assay	53
3.3. Results	54
3.3.1. Setting the QTPP, identification of the CQAs and risk assessment	54
3.3.2. DoE and statistical analysis of the data	55
3.3.2.1. The influence of formulation factors on encapsulated EGCG concentration	56
3.3.2.2. The influence of formulation factors on EE%	57
3.3.2.3. The influence of formulation factors on the liposomal size	58
3.3.2.4. The influence of formulation factors on zeta potential	58
3.3.2.5. The design space	59
3.3.2.6. <i>In vitro</i> drug release	60
3.3.3. Cell viability	61
3.4. Discussions	62
3.5. Conclusions	66
<b>4. A screening study for the development of Simvastatin-Doxorubicin liposomes, a co-formulation with future perspectives in colon cancer therapy</b>	67
4.1. Introduction	67
4.2. Materials	70
4.3. Methods	70
4.3.1. Implementation of the QbD concept	70
4.3.2. Liposomes preparation	71
4.3.3. Characterization of liposomes	72
4.3.3.1. Determination of SIM and DOX entrapped concentrations	72
4.3.3.2. Determination of liposomal size, PDI and zeta potential	72
4.3.3.3. Determination of liposomal morphology using Transmission Electron Microscopy (TEM)	72
4.3.3.4. <i>In vitro</i> release study	73
4.3.4. Cell co-culture	73
4.3.5. Cell proliferation assay	74
4.4. Results and Discussions	74
4.4.1. Setting the QTPP and the CQAs	74
4.4.2. Risk analysis	75
4.4.3. DoE	80
4.4.4. DoE analysis	80
4.4.4.1. The influence of the formulation factors on drug	80

entrapped concentration	
4.4.4.2. The influence of the formulation factors on EE%	83
4.4.4.3. The influence of the formulation factors on liposomal size	84
4.4.4.4. The influence of the formulation factors on Pdl	86
4.4.4.5. The influence of the formulation factors on zeta potential	87
4.4.5. TEM analysis	88
4.4.6. <i>In vitro</i> release study	89
4.4.7. The effects of SIM and DOX on the proliferation of C26 murine colon carcinoma cells co-cultured with macrophages	91
4.5. Conclusions	96
<b>5. The use of QbD approach to optimize the co-loading of Simvastatin and Doxorubicin in liposomes for a synergistic anticancer effect</b>	97
5.1. Introduction	97
5.2. Materials	98
5.3. Methods	99
5.3.1. The optimization process of SIM-DOX-LCL	99
5.3.2. Preparation of liposomes	99
5.3.2.1. Preparation of liposomes loaded with SIM	99
5.3.2.2. Preparation of liposomes loaded with SIM and DOX	100
5.3.2.3. Preparation of liposomes loaded with DOX	100
5.3.2.4. Preparation of empty liposomes	100
5.3.3. Characterization of liposomes	100
5.3.3.1. Determination of SIM and DOX entrapped concentration. Determination of EE%.	100
5.3.3.2. Determination of liposomal size, Pdl and zeta potential	101
5.3.3.3. <i>In vitro</i> release study	101
5.3.3.4. Stability study	101
5.3.4. Cell culture	102
5.3.5. Cell proliferation assay	102
5.4. Results and Discussions	103
5.4.1. The optimization process of SIM-DOX-LCL	103
5.4.2. <i>In vitro</i> release study	111
5.4.2.1. The assessment of SIM and DOX release profile from the optimal formulation using the HPLC method	111

5.4.2.2. A comparison of the HPLC and chronamperometric method concerning the assay of SIM and DOX from the release medium	113
5.4.3. Stability study	114
5.4.4. Cell proliferation assay	116
5.5. Conclusions	119
<b>6. Process development of dry powder inhalers containing SIM loaded liposomes using the spray-drying technology</b>	121
6.1. Introduction	121
6.2. Materials	123
6.3. Methods	123
6.3.1. The use of DoE in the development of SIM-L	123
6.3.2. Preparation of SIM-L	123
6.3.3. Spray-drying process of SIM-L	124
6.3.4 Characterization of SIM-L and DPIs	124
6.3.4.1. Quantification of SIM entrapped concentration and EE% of SIM-L. Quantification of drug load in DPIs	124
6.3.4.2 Determination of size, PDI and zeta potential of SIM-L and spray-dried SIM-L	124
6.3.4.3. Determination of yield	124
6.3.4.4. <i>In vitro</i> aerodynamic characterization	125
6.3.4.5. Morphological characterization of the DPIs via Scanning Electron Microscopy (SEM)	125
6.4. Results and Discussions	125
6.4.1. Identifying the CQAs of DPIs and spray-dried liposomes. Identifying the CPPs and CMAs. Designing the DoE and performing the experiments	125
6.4.2. DoE statistical analysis	129
6.4.2.1. The influence of the formulation factors on the yield response	129
6.4.2.2. The influence of the formulation factors on the residual moisture content response	130
6.4.2.3. The influence of the formulation factors on the drug load response	132
6.4.2.4. The influence of the formulation factors on the MMAD and FPF responses	132
6.4.2.5. The influence of the formulation factors on the	134

morphological aspect of the DPIs	
6.4.2.6. The influence of the formulation factors on the size and PDI of spray-dried liposomes	135
6.4.2.7. The influence of the formulation factors on the zeta potential of spray-dried liposomes	136
6.4.3. The design space and the optimal formulation	137
6.5. Conclusions	139
<b>7. General conclusions</b>	<b>141</b>
<b>8. The originality and the innovations of the thesis</b>	<b>143</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>145</b>

**KEY WORDS:** liposomes; tumor microenvironment; cancer; Quality by Design concept.

## INTRODUCTION

Cancer is known to be a group of diseases that affect million of people worldwide. Because of this, numerous questions have been raised about the biology of cancer tumors and about the variability in anticancer therapeutic response. The recent findings highlighted that tumors have the capacity to transform certain healthy cells into defective cells, a mechanism which helps tumors to grow, to develop drug resistance mechanisms and to induce metastasis.

Due to the fact that the actual chemotherapeutic schemes present numerous disadvantages such as the occurrence of systemic side effects, reduced patient compliance, lack of efficacy, increased healthcare costs, the international drug agencies promote the idea of repurposing drug molecules to overcome these barriers. Nevertheless, the latest studies also evidenced an increased interest in finding potential anticancer molecules among natural compounds.

Despite these recent advances, a major challenge in anticancer treatment remains the achievement of the desired drug concentrations at the tumor site. In the last decades, the development of nanoparticles for anticancer therapy has raised a considerable attention. The advantages associated with these pharmaceutical formulations are the decrease of number and intensity of side effects by delivering the chemotherapeutic drugs at the tumor site, the possibility of incorporating drugs with different physiochemical properties and achieving a synergistic anticancer effect.

By considering these main challenges, the objective of this thesis was the development of nanoparticle-based delivery systems for potential application in

anticancer therapy and for the modulation of different processes associated with the tumor microenvironment.

## GENERAL ASPECTS

The first part of the thesis entitled “General aspects” is divided into four sections as follows: in the first section are presented general aspects about the role of tumor microenvironment in cancer progression and the potential therapeutic targets; in the second part is discussed about the use of different drug molecules in monotherapy and combined therapy to modulate various processes associated with the tumor microenvironment; in the third section are presented different types of nanoparticles that are currently used in anticancer therapy; while the fourth part includes general aspects about the implementation of Quality by Design (QbD) concept in the development of nanoparticles.

## PERSONAL CONTRIBUTION

The second part of the thesis includes four research studies that aimed to develop lipidic nanoparticles using the QbD approach for their potential application in anticancer therapy. Therefore, the first research study focused on developing liposomes encapsulated with a polyphenol from green tea that might be used to target the stem cells involved in the progression of oral cancers. The study presents the main challenges associated with the physicochemical instability of natural compounds and the benefits of their incorporation into liposomes. The second study aimed to screen different formulation factors and process parameters that might have a potential critical impact on the quality profile of liposomes co-encapsulating simvastatin and doxorubicin, as well as to demonstrate the potency of this liposomal formulation to inhibit the proliferation of murine colon cancer cells when co-cultured with macrophages. Based on the results obtained in the second study, the third study aimed to optimize the liposomal formulation co-encapsulated with simvastatin and doxorubicin and to investigate its anticancer potential on two different human cancer cell lines: breast cancer and lung cancer. In addition, this study proposed and tested an electrochemical method for the simultaneous quantification of simvastatin and doxorubicin from aqueous medium in a shorter period of time compared to the HPLC technique. The positive results obtained in the third study with respect to the anticancer effect of simvastatin on the pulmonary cancer cell line, promoted the idea of developing a liposomal formulation for inhalation administration using the spray drying technology, and respresented thus the main purpose of the fourth study.



## GENERAL CONCLUSIONS

This thesis focused on the fact that both the tumors and the tumor microenvironment can be targeted via multiple pathways, and that combined therapy brings more therapeutical advantages than monotherapy. Nevertheless, the *in vitro* studies needed to demonstrate that the chosen therapy presents a synergistic or additive anticancer effect, in order to be considered for future *in vivo* studies.

Throughout the four studies, the QbD concept was used in the formulation studies to get a thorough understanding of the interactions that occur between the formulation factors, process parameters and the critical quality attributes of the nanoformulation. The obtained results provided the basis for designing an optimal liposomal formulation that meets the international regulations requirements. Additionally, the *in vitro* studies performed on different cancer cell lines highlighted that the developed liposomal formulations are more noxious than the active substances when tested alone on both cancer cells and tumor microenvironment associated cells.

## THE ORIGINALITY AND THE INNOVATIONS OF THE THESIS

By considering the promising results obtained in the antiproliferative studies, this thesis proposes two novel liposomal formulations, namely liposomes loaded with epigallocatechin-3-gallate for the treatment of oral cancer, and inhalation powder containing liposomes loaded with simvastatin for the treatment of lung cancer. These two liposomal formulations promise to deliver the active ingredient directly at the site of action in a high concentration using patient friendly devices, leading thus to an increased patient compliance and a reduced number of systemic side effects. In addition, the drug combination between simvastatin and doxorubicin proved to have a negative influence on the proliferation of three different cancer cell lines, underlining the potential benefits of this drug combination in cancer therapy.

The use of the chronoamperometric method for the simultaneous quantification of simvastatin and doxorubicin in the third study, also represents a groundbreaking element of this thesis. The results of this study evidenced that this new analytical method might replace the standard analytical techniques in the nearest future. The advantages related to this method are that is cost effective, does not use chemical solvents, small volumes of samples in the microliter range can be analyzed, and can be used in the medical field or pharmaceutical industry for fast detection/quantification of different drug molecules.