

Année universitaire 2012-2013

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

MICHENAUD Matthieu

n  le 31 mai 1988 à Saumur (49)

soutenue publiquement le 14 octobre 2013

**Formulation et évaluation des systèmes lipidiques de type III et
IV avec un nouveau tensioactif de la famille des Gélucire[®].**

JURY :

Président :	M. Jean-Pierre BENOIT
Directeur :	M. Vincent JANNIN
Co-Directeur :	M. Frédéric LAGARCE
Membre :	Mme. Brigitte PECH





ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je soussigné Matthieu MICHENAUD, déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :

LISTE DES ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

BENOIT Jean-Pierre
 BOUET Gilles
 BOURY Franck
 CALENDAlphonse
 DUVAL Olivier
 FOUSSARD Françoise
 JARDEL Alain
 MAHAZA Chetaou
 MARCHAIS Véronique
 MAURAS Geneviève
 MAURAS Yves
 PASSIRANI Catherine
 RICHOMME Pascal
 ROBERT Raymond
 SAULNIER Patrick
 SERAPHIN Denis
 VENIER Marie-Claire

Disciplines

Pharmacotechnie
 Chimie Physique Générale et Minérale
 Biophysique
 Biologie Moléculaire - Biotechnologie
 Chimie Thérapeutique
 Biochimie Générale et Clinique
 Physiologie
 Bactériologie - Virologie
 Bactériologie et Virologie
 Biologie Cellulaire
 Toxicologie
 Chimie générale ó Chimie analytique
 Pharmacognosie
 Parasitologie et Mycologie médicale
 Biophysique pharmaceutique et biostatistiques
 Chimie Organique
 Pharmacotechnie

MAITRES DE CONFERENCES

ANNAIX Véronique
 BASTIAT Guillaume
 BAGLIN Isabelle
 BATAILLE Nelly
 BENOIT Jacqueline
 CLÈRE Nicolas
 CORVEZ Pol
 DERBRE Séverine

Disciplines

Biochimie Générale et Clinique
 Biophysique pharmaceutique et biostatistiques
 Pharmaco - Chimie
 Biologie Cellulaire et Moléculaire
 Pharmacologie et Pharmacocinétique
 Pharmacologie
 Sémiologie
 Pharmacognosie

MAITRES DE CONFERENCES

DUBREUIL Véronique
 ÉVEILLARD Matthieu
 FAURE Sébastien
 FLEURY Maxime
 GALLAND Françoise
 GIRAUD Sandrine
 GUILLET David
 HELESBEUX Jean-Jacques
 JOLIVET Jean-Paul
 KHAN Mustayeen
 LAGARCE Frédéric
 LANDREAU Anne
 LARCHER Gérard
 LE RAY Anne-Marie
 LICZNAR Patricia
 MALLET Marie-Sabine
 MAROT Agnès
 MILTGEN-LANCELOT Caroline

 NAIL BILLAUD Sandrine
 OGER Jean-Michel
 PECH Brigitte
 SCHINKOVITZ Andréas
 TRICAUD Anne

A.H.U.

SPIESSER-ROBELET Laurence

PRAG (Professeurs Agrégés)

HANOTTE Caroline
 ROUX Martine

PRCE (Professeurs certifiés affectés dans l'enseignement supérieur)

GENARD Nicole
 LECOMTE Stéphane

Disciplines

Chimie Analytique
 Bactériologie - Virologie
 Pharmacologie Physiologie
 Immunologie
 Biophysique
 Biologie moléculaire et cellulaire
 Chimie Analytique
 Chimie Organique
 Biophysique
 Chimie Générale et Minérale
 Pharmacotechnie-Biopharmacie
 Botanique
 Biochimie Générale et Clinique
 Valorisation des substances naturelles
 Bactériologie - Virologie
 Chimie Analytique et Bromatologie
 Parasitologie et Mycologie médicale
 Management et gestion des organisations de santé
 Immunologie
 Chimie
 Pharmacotechnie
 Pharmacognosie
 Biologie Cellulaire

Disciplines

Pharmacie clinique et Éducation Thérapeutique

Disciplines

Economie ó Gestion
 Espagnol

Anglais
 Anglais

REMERCIEMENTS

Je souhaite ici adresser mes remerciements à :

M. Jean-Pierre BENOIT, Directeur de l'unité INSERM 1066 et professeur de pharmacotechnie à la faculté de pharmacie d'Angers, pour l'honneur que vous me faites de présider ma thèse et pour m'avoir transmis l'envie de poursuivre dans votre équipe de travail. Merci pour la confiance que vous m'accordez.

M. Vincent JANNIN, Directeur de projet pharmacie chez Gattefossé, pour avoir dirigé et encadré ma thèse de la meilleure façon. Merci d'avoir partagé vos connaissances, de vous être rendu disponible et à l'écoute de mes questions et propositions. Merci pour votre accueil et votre sympathie.

M. Frédéric LAGARCE, Professeur de pharmacotechnie et biopharmacie à la faculté de pharmacie d'Angers, pour avoir dirigé mon travail et pour votre aide tout au long de mes études de pharmacie. Merci pour votre écoute et vos conseils précieux dans l'orientation de mon projet professionnel. Merci pour votre bienveillance.

Mme Brigitte PECH, Maître de conférences en pharmacotechnie à la faculté de pharmacie d'Angers, pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse, et pour m'avoir communiqué le goût de la galénique.

M. Jacques MOYRAND, Président de Gattefossé Holding, pour m'avoir accueilli pendant 6 mois au sein de l'entreprise Gattefossé et m'avoir donné l'opportunité d'accomplir mon stage de master 2.

M. Frédéric DEMARNE, Directeur du département recherche et développement, pour m'avoir intégré dans votre structure m'ayant permis de réaliser le travail support de ma thèse.

Mme Stéphanie CHEVRIER et M. Yann CHAVANT, pour tous vos conseils et l'aide essentielle que vous avez apporté à ce travail. Merci beaucoup pour votre gentillesse, votre bonne humeur et pour m'avoir tout de suite intégré à l'équipe de travail.

Mme Élisabeth PEYROT et M. Christophe VOUSTINAS, pour le soutien analytique indispensable que vous m'avez fourni. Merci tout particulièrement à Christophe de m'avoir formé au maniement de l'HPLC.

M. Cédric MIOLANE, pour votre aide et disponibilité pour la réalisation des analyses HPLC, et pour votre gentillesse.

Melle Silvia BELOTTI et Melle Céline ANDRE, pour votre aide précieuse au cours des manipulations et pour la rédaction de mon rapport de master 2. Merci pour les très bons moments passés ensemble. Un grand merci à Silvia pour son amitié.

Mme Aurélie AUTRIC, Mme Viviane BARDIN, Mlle Oriane CANTIN, Mme Yvonne CUPPOK, Melle Florence DESVIGNES, Mme Dominique HOSTE, Mme Adeline RASCALOU, M. Jean-Michel GIRARD, M. Ferhat TAHIR et l'ensemble du personnel du bâtiment Blanche chez Gattefossé pour votre très bon accueil.

Je dédie ma thèse à :

Mes parents, pour votre soutien moral et vos encouragements tout au long de mes études, pour votre aide de chaque instant et les dernières relectures. Merci pour tout.

François, pour la force que tu me donnes chaque jour. En espérant que tu es fier de ton petit frère.

Aurélie, pour ton amour et ton soutien malgré la distance qui nous a séparée cette année. Merci pour le courage que tu me donnes.

TABLE DES MATIERES

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT	2
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS : TABLEAUX.....	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS : FIGURES	10
TABLE DES ILLUSTRATIONS : EQUATIONS	10
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
I. INTRODUCTION	12
II. CONTEXTE.....	14
a. Systèmes de classification des substances actives.....	14
b. Les différentes options de formulation pour augmenter la solubilité des substances actives BCS II.....	16
c. Présentation des formulations lipidiques et du système de classification LFCS (Lipid Formulation Classification System)	18
d. Le consortium sur les formulations lipidiques : historique et dernières recommandations.....	20
e. Introduction aux systèmes sursaturés.....	23
f. Corrélation des performances in vitro et in vivo des systèmes lipidiques	24
III. INTRODUCTION AU TRAVAIL EXPERIMENTAL	25
IV. OBJECTIFS	25
V. MATERIELS ET METHODES	26
a. Matériels.....	26
i. Excipients.....	26
ii. Substances actives.....	28
b. Méthodes.....	30
i. Mesure de la solubilité.....	30
ii. Préparation des milieux pour les tests de dispersion, de lipolyse et de la solution de pancréatine	31
iii. Calcul de la solubilité barycentrique	31
iv. Mise en place des diagrammes binaires et ternaires	31
v. Viscosité, indice de réfraction et taille des particules.....	32

vi.	Calcul du rapport de sursaturation maximale : SR^M	33
vii.	Test de lipolyse	33
VI.	RESULTATS	34
a.	Tests de solubilité	34
b.	Mise en place des diagrammes binaires et ternaires	36
i.	Tests de miscibilité	36
ii.	Tests de dispersion	36
iii.	Sélection des formulations pour chaque API	40
c.	Tests de dispersion des formulations chargées en substance active	41
d.	Tests de digestion	43
i.	Test de digestion des formulations contenant du piroxicam	43
ii.	Test de digestion des formulations contenant de la cinnarizine	44
iii.	Test de digestion des formulations contenant de l'ibuprofène	46
VII.	DISCUSSION	50
VIII.	CONCLUSION	54
	BIBLIOGRAPHIE	55
	ANNEXES	57
	Annexe I : Détermination de la valeur seuil du $SR^M > 2,5$ [14]	57
	Annexe II : Appareil de dissolution type USP II (Hanson Research, SR8 Plus)	58
	Annexe III : Appareil pH-Stat Titrand 842 (Metrohm)	59
	Annexe IV : Test de digestion in vitro de formulations chargée de cinnarizine, avec ou sans Maisine ¹ 35-1	60

TABLE DES ILLUSTRATIONS : Tableaux

Tableau I : Composition des différents types de formulations lipidiques du LFCS [11].....	19
Tableau II : Les excipients et les abréviations utilisées.....	27
Tableau III : Abréviations et doses thérapeutiques des substances actives utilisées	29
Tableau IV : Propriétés physico-chimiques des substances actives utilisées	29
Tableau V : Proportions d'excipients utilisées pour la mise en place des diagrammes binaires	31
Tableau VI : Proportions d'excipients utilisées pour la mise en place des diagrammes ternaires.....	32
Tableau VII : Solubilité des APIs dans les excipients.....	34
Tableau VIII : Associations d'excipients sélectionnées pour chaque substance active.....	35
Tableau IX : Résultats des tests de dispersion: observations et taille des particules (obtenues par PCS).....	38
Tableau X : Résultats des solubilités barycentriques et mesurées des formulations sélectionnées, et les concentrations de saturation des formulations pour les tests de digestion	40
Tableau XI : Tests de dispersion de formulations chargées en principe actif	41
Tableau XII : Valeurs calculées des SR^M pour les formulations contenant de la cinnarizine .	44
Tableau XIII : Valeurs calculées des SR^M pour les formulations contenant de l'ibuprofène ..	46
Tableau XIV : Solubilité, masse et pourcentage d'ibuprofène dissous à t60min du test de digestion.....	49

TABLE DES ILLUSTRATIONS : Figures

Figure 1 : Représentation du système de classification biopharmaceutique (BCS).....	14
Figure 2 : Représentation du système de classification DCS	15
Figure 3 : Structure chimique de l'ibuprofène [18].....	28
Figure 4 : Structure chimique de la cinnarizine [19].....	28
Figure 5 : Structure chimique du piroxicam [20].....	29
Figure 6 : Diagramme ternaire Labrasol [®] ALF - Capryol [®] 90 - Transcutol [®] HP	36
Figure 7 : Diagramme binaire Gélucire [®] 48/16 - Transcutol [®] HP	37
Figure 8 : Diagramme binaire Tween [®] 80 - Transcutol [®] HP.....	37
Figure 9 : Formulation F14 ; microscopie optique à lumière polarisée, objectif X40	39
Figure 10 : Précipité prélevé après 30 minutes de dispersion dans l'eau, de la formulation T80-PIRO ; microscopie optique à lumière polarisée, objectif X10.....	42
Figure 11 : Résultats des tests de digestion des formulations contenant 10mg piroxicam	43
Figure 12 : Résultats des tests de digestion des formulations contenant 25 mg de cinnarizine	45
Figure 13 : Résultats des tests de digestion des formulations contenant 200mg d'ibuprofène	47
Figure 14 : Mesure de la solubilité de l'ibuprofène dans le Gélucire [®] 48/16 par DSC	48
Figure 15 : Mesure de la solubilité du piroxicam dans le Gélucire [®] 48/16.....	48
Figure 16 : Photographie comparative des formulations dispersées sans substance active	51

TABLE DES ILLUSTRATIONS : Equations

Équation 1 : Equation de Noyes-Whitney	16
Équation 2 : Formule du SR ^M	21
Équation 3 : Calcul de la solubilité barycentrique	31
Équation 4 : Calcul du SR ^M	33

LISTE DES ABREVIATIONS

- AAPS : American Association of Pharmaceutical Scientists
- AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
- AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
- APIs : Active Pharmaceutical Ingredients
- ASD : Amorphous Solid Dispersion
- AUC : Area Under the Curve
- BCS : Biopharmaceutics Classification System
- Bs : Baricentric solubility
- CSD : Crystalline Solid Dispersion
- DCS : Developability Classification System
- DSC : Differential Scanning Calorimetry
- FDA : Food and Drug Administration
- HLB : Hydrophilic Lipophilic Balance
- HPLC : High Performance Liquid Chromatography
- HPMC : Hydroxy-Propyl-Methyl-Cellulose
- LBFs : Lipid-Based Formulations
- LFCS : Lipid Formulation Classification System
- NaTDC : taurodéoxycholate de sodium
- PCS : Photon Correlation Spectroscopy
- PEG : Poly Éthylène Glycol
- SDDS : Supersaturating Drug Delivery Systems
- SEDDS : Self Emulsifying Drug Delivery Systems
- SGF : Simulated Gastric Fluid
- SMEDDS : Self-MicroEmulsifying Drug Delivery Systems
- SNEDDS : Self-NanoEmulsifying Drug Delivery Systems
- SRM : Maximum Supersaturation Ratio
- USP : United States Pharmacopoeia

I. INTRODUCTION

Le développement d'une substance active (Active Pharmaceutical Ingredient ; API) est organisé autour d'études précliniques et cliniques. Les études précliniques sont constituées par une première étape de recherche en synthèse chimique permettant de mettre en avant des molécules d'intérêt à développer, qui est suivie d'études de toxicologie, de pharmacologie et de pharmacocinétique réalisées en conditions *in vitro* et chez l'animal. Les études cliniques se font chez l'homme en 4 phases distinctes. La phase I correspond à une étude de sécurité d'emploi chez le volontaire sain par administration d'une dose unique. La phase II se fait chez le volontaire sain (phase IIa) ou malade (phase IIb). Il s'agit de déterminer l'activité de la substance active par une évaluation de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie et d'en déduire les doses optimales d'utilisation. La phase III est notamment constituée d'études de comparaison à un placebo ou au traitement de référence et permet d'évaluer le rapport bénéfice risque. La phase IV correspond aux essais réalisés après l'autorisation de mise sur le marché (AMM) qui ont pour objectif d'évaluer l'efficacité à long terme et de chercher des effets indésirables grâce à la pharmacovigilance.

Parallèlement au développement de la substance active, il est nécessaire d'utiliser des excipients, qui vont permettre l'administration et la libération dans l'organisme les mieux adaptées à la substance active. Il s'agit du développement galénique qui doit assurer l'adéquation entre la substance active et la formulation galénique mais aussi entre la formulation et le procédé de fabrication. La connaissance approfondie de la substance active est indispensable à la formulation. C'est pourquoi une phase de pré-formulation doit être mise en œuvre afin de préciser les caractéristiques physico-chimiques de l'API, sa solubilité dans différents solvants, son comportement face à un stress chimique (humidité, oxydation) ou physique (température, transferts, compression) ou des incompatibilités en particuliers avec certains excipients. Ensuite, en fonction de la dose d'API et de la voie d'administration souhaitée, l'étape de formulation permet de choisir la forme d'administration (solides, semi-solide, liquide) et de définir la composition de la formulation (choix et proportion de chacun des excipients) ainsi que du conditionnement primaire (en contact direct avec le médicament). La formulation ainsi fixée doit aussi être adaptée au procédé de fabrication mis en place au laboratoire et transférée successivement vers l'échelle pilote puis celle des lots industriels. Le développement galénique débute donc dès les études précliniques, est nécessaire à un passage rapide vers les études cliniques et peut-être optimisé jusqu'à l'obtention de l'AMM.

Le travail de développement galénique présenté ici, s'intéresse aux systèmes lipidiques (Lipid-Based Formulations, LBFs) en tant que formulations particulièrement adaptées aux substances actives faiblement solubles dans l'eau. Il s'agit de formuler et d'évaluer des LBFs autour de différents APIs modèles, participant ainsi au développement d'un nouvel excipient tensioactif de la société Gattefossé : le Gélucire® 48/16.

Dans le cadre de ce travail, les formulations développées sont liquides, semi-solides ou solides, et sont destinées à la voie orale. Elles sont chargées dans des gélules et sont évaluées par un test de digestion *in vitro* mimant la lipolyse intestinale. Les APIs utilisés pour mesurer les performances des LBFs sont des modèles de référence de substances actives faiblement solubles dans l'eau. Ces APIs sont chargées à leur dose thérapeutique dans les LBFs.

Suite à cette introduction, le contexte général de cette étude est approfondi. Il s'agit tout d'abord de présenter les différents systèmes de classification des APIs et des LBFs, puis de reprendre les dernières publications traitant des systèmes lipidiques. Ensuite est décrit le travail expérimental, réalisé selon les lignes directrices les plus récentes pour le développement des LBFs. Ce travail de sélection et d'évaluation des formulations se concentre sur l'impact de la nature des excipients sur l'efficacité des formulations et sur la mise en évidence de paramètres d'évaluation des performances des systèmes lipidiques. Les résultats obtenus sont alors discutés pour optimiser le développement des LBFs et connaître le potentiel du Gélucire® 48/16 par rapport à ses principaux concurrents commerciaux.

II. CONTEXTE

a. Systèmes de classification des substances actives

Afin d'optimiser le travail de pré-formulation et de passer plus rapidement à l'étape de la formulation, il est intéressant de classer les substances actives en fonction de propriétés physico-chimiques clés. C'est entre autre le rôle joué par le système de classification biopharmaceutique (Biopharmaceutics Classification System, BCS) qui permet d'estimer la biodisponibilité *in vivo* des substances actives en se basant sur leur solubilité et leur perméabilité *in vitro* [1]. Il définit 4 classes de substances actives (figure 1).

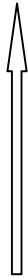
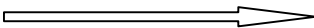
Perméabilité 	Classe II Faible solubilité Haute perméabilité	Classe I Haute solubilité Haute perméabilité
	Classe IV Faible solubilité Faible perméabilité	Classe III Haute solubilité Faible perméabilité
	Solubilité 	

Figure 1 : Représentation du système de classification biopharmaceutique (BCS)

Une substance active est considérée comme ayant une haute solubilité lorsque la dose administrable maximale par libération immédiate est soluble dans 250mL d'un milieu aqueux avec un pH allant de 1 à 6,8 à $37\pm 1^\circ\text{C}$. Quand plus de 85% de la dose de substance active initialement administrée est absorbée à travers la barrière intestinale, elle présente une haute perméabilité [2].

A partir de 2000, la Food and Drug Administration (FDA) précise que le BCS peut être utilisé comme un outil de développement des médicaments, en particulier pour les demandes de dispense des tests de bioéquivalences pour des substances de classe I [3 ; 4]. Intégré dans ce cadre réglementaire, le BCS est alors très largement utilisé par l'industrie pharmaceutique comme référence initiale dans l'orientation du développement des formes orales à libération immédiate. Au cours des étapes de formulation, il permet notamment d'anticiper certaines difficultés auxquelles sont confrontés les formulateurs. Il est en effet plus simple de rendre biodisponible les substances actives de classe I, alors que les APIs des autres classes nécessitent la mise en place de stratégies de formulations plus complexes.

Cependant, afin de mieux estimer la capacité de développement d'une nouvelle substance active, Butler et Dressman en 2010 ont fait évoluer le BCS vers le Developability Classification System (DCS) [5]. Par rapport au BCS, la principale modification apportée par le DCS est la partition de la classe II en IIa et IIb (figure 2).

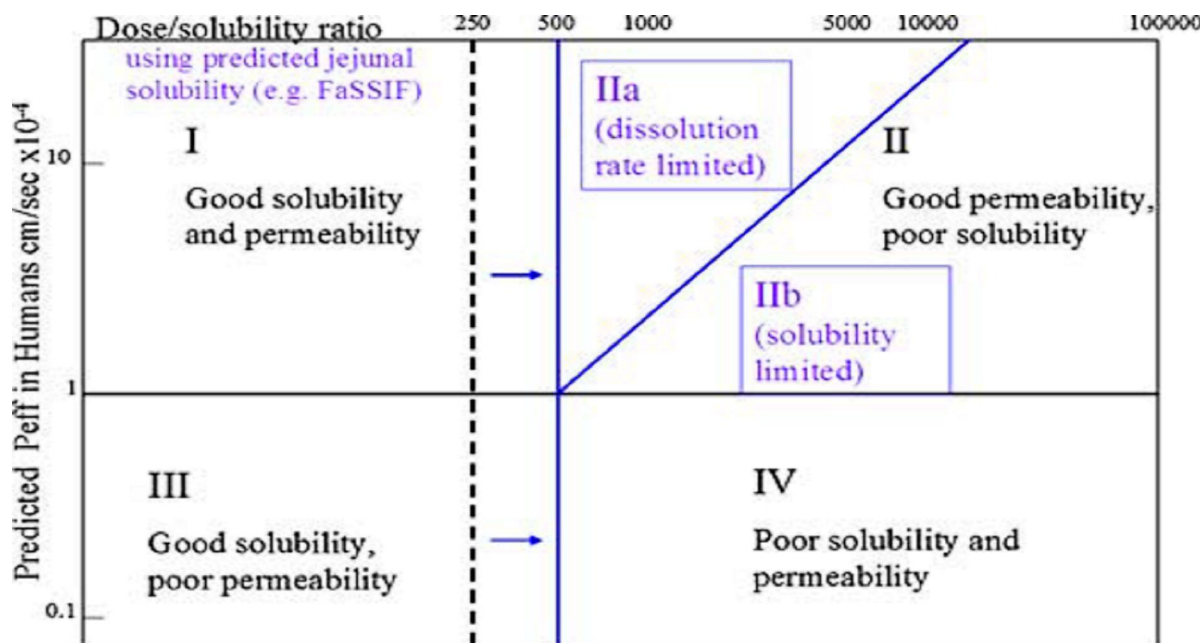


Figure 2 : Représentation du système de classification DCS

Les modifications apportées du BCS vers le DCS sont tracées en bleu ; Peff = estimation de la perméabilité efficace du jéjunum humain [5]

Les modifications apportées au BCS sont faites en fonction d'un volume de liquide disponible dans le tractus gastro-intestinal plus proche de la réalité, et de la compensation d'une faible solubilité par une haute perméabilité. En se basant sur cette hypothèse, le DCS différencie la classe II du BCS en classe IIa et IIb. Il apparaît alors que l'absorption des substances IIa est limitée par leur vitesse de dissolution plutôt que par leur solubilité. L'absorption complète de ces substances actives peut donc être obtenue par une formulation standard, en portant une attention particulière aux facteurs influençant la libération de la substance active, tels que la taille des particules, la surface développée ou la mouillabilité. D'autre part, l'absorption des substances IIb est limitée par leur solubilité et nécessite en revanche la mise en œuvre de formulations plus complexes telles que des formes pré-dissoutes [5] dont font partie les formulations lipidiques.

Ces systèmes de classification des substances actives mettent donc en avant le fait que l'amélioration de la solubilité des substances actives est un objectif clé des phases de développement galénique. Cela est d'autant plus vrai que de façon générale, l'application des méthodes de criblage à haut débit et de la chimie combinatoire dans l'industrie pharmaceutique, augmente la prévalence des substances actives classées BCS II [6]. Ainsi, 70% des nouvelles substances actives candidates, présentent une faible solubilité dans l'eau [7]. Il apparaît donc primordial de développer différentes options de formulations dans le but d'améliorer la solubilité des substances actives BCS II.

b. Les différentes options de formulation pour augmenter la solubilité des substances actives BCS II

Différentes approches pour accroître la solubilité des substances actives BCS II peuvent être développées. Elles sont à mettre en relation avec l'équation de Noyes-Whitney (Equation 1) qui présente les différents facteurs physicochimiques influençant la vitesse de dissolution d'une substance active.

$$v_d = \frac{A \times D}{h} (C_s - C)$$

Équation 1 : Equation de Noyes-Whitney

v_d = vitesse de dissolution ; A = surface développée ; D = coefficient de diffusion ; h = épaisseur de la couche de diffusion ; C_s = concentration dans la couche de diffusion ; C = concentration dans le milieu.

La couche de diffusion correspond à l'environnement directement au contact de la particule de substance active, dans lequel l'API est à saturation ou concentration saturante (C_s). L'équation de Noyes-Whitney met en évidence que les facteurs clés sur lesquels la formulation va pouvoir agir sont soit la concentration saturante, soit la surface développée. Voici les différentes options décrites par Kawabata en 2011 [7] :

- Modifications des cristaux
 - Polymorphes métastables :

Des formes polymorphes ont la même composition chimique mais présentent des réseaux cristallins ou des conformations moléculaires différentes. Ainsi elles ont des propriétés physicochimiques différentes, telles que le point de fusion, la densité, la stabilité ou la solubilité. L'utilisation d'une forme métastable plus soluble que la forme thermodynamiquement la plus stable, peut donc améliorer la biodisponibilité d'une substance active.
 - Formation de sels :

Cette approche communément utilisée pour les substances actives ionisables, permet d'en augmenter la solubilité et la vitesse de dissolution.
 - Formation de co-cristaux :

Un co-cristal est un matériel cristallin comprenant au moins 2 composés différents. La substance active est associée à une molécule non toxique en quantité stœchiométrique. La mise en place de co-cristaux permet d'augmenter la vitesse de dissolution, notamment des substances actives non ionisables aux pH physiologiques.

➤ Réduction de la taille des particules

○ Micronisation

La diminution de la taille des particules en augmente la surface développée et diminue l'épaisseur de la couche de diffusion, ce qui accroît la vitesse de dissolution de la substance active. Cependant la micronisation peut aussi générer l'agglomération des particules pouvant alors nécessiter l'ajout d'agents mouillants.

○ Nanocristaux

La formation de nanocristaux conduit à des particules de taille inférieure à 1µm. Par les mêmes mécanismes que la micronisation, les nanocristaux augmentent la vitesse de dissolution des substances actives, mais aussi la solubilité saturante. Les formulations de nanocristaux peuvent être définies comme des dispersions solides cristallines (Crystalline Solid Dispersions, CSD).

➤ Amorphisation

De façon générale, la solubilité des substances actives amorphes est plus grande que celle des cristaux correspondants. La formulation de systèmes amorphes stables peut être obtenue par les techniques de dispersions solides, conduisant aux dispersions solides amorphes (Amorphous Solid Dispersions, ASD). De façon générale les ASD sont moins stables que les CSD. Les ASD sont donc moins adaptées que les CSD aux substances actives amorphes peu stables.

➤ Compléxation par des cyclodextrines

L'inclusion de substances actives peu solubles dans l'eau, dans le cœur hydrophobe des cyclodextrines permet d'augmenter leur solubilité apparente.

➤ Modification du pH

Modifier le pH dans une formulation contenant une substance active ionisable, est aussi une solution pour en augmenter la solubilité et la vitesse de dissolution.

➤ Formulations lipidiques et auto-émulsification

Les formulations lipidiques sont des formulations dans lesquelles les substances actives sont à un état dissous, ce qui est favorable à une bonne biodisponibilité. Certains agents tensioactifs procurent aux formulations lipidiques des capacités d'auto-émulsification qui participent aussi à la dissolution des substances actives. Les formulations lipidiques permettent donc d'améliorer la biodisponibilité en augmentant la vitesse de dissolution et en présentant et maintenant la substance active en solution dans le tractus gastro-intestinal.

Dans le cadre du développement d'excipients adaptés aux formulations lipidiques, ce travail va s'attacher maintenant à présenter et étudier les LBFs.

c. Présentation des formulations lipidiques et du système de classification LFCS (Lipid Formulation Classification System)

Pour de nombreuses substances actives peu solubles dans l'eau, il est reconnu que l'administration lors d'un repas améliore la biodisponibilité [10]. Ce rôle bénéfique des lipides pour l'absorption des substances actives, notamment classées BCS II, est le point de départ du développement des formulations lipidiques.

L'intérêt porté aux LBFs repose notamment sur le fait qu'elles présentent les substances actives sous forme dissoute dans le tractus gastro-intestinal. Cependant d'autres procédés liés aux LBFs, vont augmenter l'absorption des APIs. En subissant la digestion lipidique elles créent un apport de tensioactifs et de lipides (et de leurs produits de digestion) qui va augmenter la capacité de dissolution intrinsèque des fluides gastro-intestinaux. En effet, au cours de la digestion lipidique induite par des lipases (gastriques et pancréatiques) et des estérases, les produits de digestion générés sont inclus dans des micelles mixtes formées de sels biliaires, de phospholipides et de cholestérol. Ces différentes structures colloïdales sont alors le support du maintien en solution des substances actives peu solubles dans l'eau [13]. De plus, en fonction des excipients qu'elles contiennent, les LBFs peuvent accroître la perméabilité intestinale des substances actives. Elles peuvent aussi améliorer la biodisponibilité des APIs en favorisant leur transport lymphatique et en diminuant l'effet de premier passage hépatique. Par ailleurs la propension à générer un état de sursaturation de la substance active dans le tractus intestinal, peut favoriser son absorption. [9 ; 10].

Cependant, les systèmes lipidiques regroupent un grand nombre de formulations présentant des caractéristiques et des comportements différents. A partir de 2000, Colin W. Pouton a mis en place le système de classification des formulations lipidiques (Lipid Formulation Classification System, LFCS [11]. Il décrit 4 types de formulations lipidiques (tableau I) :

- Type I : constitués de mono, di ou triglycérides dans lesquels la substance active est dissoute. Ces systèmes doivent être digérés par les enzymes gastriques ou pancréatiques pour former des produits amphiphiles et ainsi maintenir dissoute la substance active dans les fluides gastro-intestinaux.
- Type II : ces formulations intègrent 20 à 60 % de tensioactifs avec une balance hydrophile/lipophile (Hydrophilic Lipophilic Balance, HLB) inférieure à 12. Elles constituent notamment, des systèmes auto-émulsionnables (Self-Emulsifying Drug Delivery Systems, SEDDS), formant des émulsions huile dans eau avec une faible agitation et indépendamment de la digestion enzymatique. Typiquement les SEDDS forment des émulsions opaques avec des gouttelettes d'émulsion de taille supérieure à 100nm.
- Type III : contenant une partie lipidique, des tensioactifs hydrophiles (HLB>12) et des co-solvants, ils peuvent former des SEDDS mais aussi des SMEDDS (Self-MicroEmulsifying Drug Delivery Systems) ou des SNEDDS (Self-NanoEmulsifying Drug Delivery Systems). Les émulsions formées par les SMEDDS ont des tailles de particules inférieures à 100nm et sont opalescentes ou transparentes. Les

nanoémulsions formées par les SNEDDS sont transparentes avec des gouttelettes inférieures à 10nm.

Parmi les formulations de type III, on distingue les types IIIA, présentant une partie lipidique de 40 à 80%, des types IIIB, plus solubles dans l'eau (moins de 20% d'huile). Ces dernières présentent une meilleure dispersion mais aussi un risque accru de précipitation de l'API, du fait de la grande proportion de co-solvant hydrophile (20 à 50%).

- Type IV : dépourvus de partie lipidique, ces systèmes ne sont constitués que de tensioactifs majoritairement hydrophiles, et de co-solvants. Ils permettent de dissoudre une grande quantité de substance active et ainsi d'augmenter la dose chargée dans la formulation. La dispersion dans l'eau des formulations de type IV, forme des solutions micellaires d'aspect limpide.

Tableau I : Composition des différents types de formulations lipidiques du LFCS [11]

Excipients	Constitution des formulations (% , m/m)				
	Type I	Type II	Type IIIA	Type IIIB	Type IV
Huiles: mono, di ou triglycérides	100	40-80	80-40	<20	-
Tensioactifs insolubles dans l'eau (HLB < 12)	-	20-60	-	-	0-20
Tensioactifs solubles dans l'eau (HLB > 12)	-	-	20-40	20-50	30-80
Co-solvants hydrophiles (ex: PEG, propylène glycol, Transcutol®)	-	-	0-40	20-50	0-50

Le LFCS, ainsi fixé depuis 2006, encadre les définitions des formulations lipidiques. Il n'est cependant pas suffisant pour développer et comparer de façon harmonisée, les performances des formulations lipidiques. C'est pourquoi un consortium sur les formulations lipidiques a été mis en place. Sa présentation constitue la partie suivante de ce travail.

d. Le consortium sur les formulations lipidiques : historique et dernières recommandations

Le consortium sur les formulations lipidiques est un regroupement d'industries et d'universités constitué à partir de 2009, dont la société Gattefossé fait partie. L'objectif est de développer des méthodes d'évaluation du devenir des APIs suite à la dispersion et à la digestion des LBFs. Ces méthodes doivent être suffisamment robustes pour être admises en tant que méthodes standards de développement. Ainsi ces méthodes pourront permettre aux formulateurs de prédire la performance de leurs systèmes lipidiques *in vivo* et aussi d'apporter une explication rationnelle auprès des autorités réglementaires (EMA, FDA) des stratégies de développement choisies. La réalisation de cet objectif passe par la mise en place de procédures opératoires standardisées pour évaluer les critères clé de performance des formulations. De cette façon le consortium sur les formulations lipidiques cherche à mettre en place une approche rationnelle et systématique du développement de molécules candidates faiblement solubles dans l'eau [12].

Le consortium publie donc les travaux de recherche issus des différentes collaborations, et qui servent de référence pour la formulation par des systèmes lipidiques de substances actives peu solubles dans l'eau. Ce sont ces travaux, décrits dans 3 articles successifs, qui sont présentés ici [9 ; 13 ; 14].

La première publication du consortium LFCS présente les lignes directrices des essais de digestion *in vitro* par pH-stat [9]. Elles sont établies par l'étude de 8 formulations modèles représentant les 4 types de LBFs : les formulations de types I, II et IIIA sont réalisées soit avec des acides gras à moyennes chaînes soit à longues chaînes, et le type IIIB est formulé avec des acides gras à chaîne moyenne. La formulation de type IV ne contient pas d'acides gras. L'influence de la longueur des chaînes d'acides gras peut donc être évaluée. Ces premiers travaux définissent les conditions expérimentales telles que la composition du milieu de lipolyse pour mimer les conditions dans l'intestin grêle à jeun (pH, enzymes, sels biliaires). Par ailleurs, le matériel pour la réalisation du test de lipolyse, la centrifugation et la méthode de prélèvement des échantillons sont fixés.

Dans la seconde publication du Consortium LFCS [13], l'étude de la performance *in vitro* des 8 LBFs permet d'établir un guide commun au sujet du potentiel de précipitation d'une substance active modèle faiblement hydrosoluble : le danazol. Le but est d'évaluer plus précisément la propension des LBFs à générer et maintenir la sursaturation du principe actif pendant la digestion. En suivant les conditions expérimentales fixées, l'impact de différentes variables est étudié. Tout d'abord, l'impact de l'augmentation de la concentration en sel biliaire (taurodéoxycholate de sodium, NaTDC) a été exploré. Il est montré qu'en général, des concentrations croissantes en NaTDC augmentent la digestion des LBFs les plus lipophiles et favorise le passage des lipides et de la substance active, des phases huileuses mal dispersées vers la phase aqueuse colloïdale. D'autre part, l'influence de l'augmentation de la charge d'API dans la formulation est évaluée. Elle a un impact marqué sur sa dissolution. Pour les LBFs contenant des lipides à longues chaînes, la précipitation a été limitée, même pour des charges en principe actif proches de la saturation. Par ailleurs, la concentration de principe actif dissous dans la phase aqueuse augmente avec la charge en substance active. Cependant,

la précipitation est importante pour les LBFs contenant des lipides à chaînes moyennes, en particulier à des charges élevées de substance active.

Il apparaît alors que la probabilité de précipitation est dépendante du rapport de sursaturation maximal (Maximum Supersaturation Ratio, SR^M), quelle que soit la composition des LBFs. Le SR^M est calculé par l'équation suivante :

$$SR^M = \frac{\text{Concentration théorique maximum dans la phase aqueuse colloïdale}}{\text{Solubilité de l'API mesurée dans la phase aqueuse préalablement digérée}}$$

Équation 2 : Formule du SR^M

La concentration théorique maximum dans la phase aqueuse colloïdale correspond à la concentration obtenue si, au cours du test de digestion *in vitro*, la formulation permet de dissoudre l'ensemble de la substance active introduite, autrement dit si la formulation évite toute précipitation au cours du test de digestion *in vitro*.

La solubilité de l'API mesurée dans la phase aqueuse préalablement digérée correspond à la solubilité de l'API dans la phase aqueuse obtenue suite à la digestion d'une formulation placebo, c'est-à-dire ne contenant pas de substance active.

Ainsi le SR^M représente la capacité de la formulation à maintenir une quantité de substance active à un état sursaturé au cours du test de digestion *in vitro*. L'état de sursaturation correspond à la présence d'une substance active en solution à une concentration supérieure à sa solubilité saturante dans ce milieu [15]. Les travaux publiés en 2012 par le consortium, établissent qu'au-delà de 2,5 la probabilité de précipitation est grande (Annexe I).

Dans la troisième publication [9], les 8 mêmes formulations lipidiques étudiées précédemment sont développées avec 2 autres substances actives modèles BCS II : le fénofibrate et l'acide tolfénamique. Cette étude s'intéresse particulièrement à l'influence de la charge de substance active introduite dans la formulation. Elle est exprimée en pourcentage de la solubilité correspondant à la concentration à saturation. Les formulations sont chargées à 20, 40, 60, 80 et 100% de la solubilité. La solubilité dans la formulation influence donc la dose chargée dans la formulation et donc la concentration théorique maximum dans la phase aqueuse colloïdale au cours du test de digestion. L'influence de la charge en substance active est donc prise en compte par le calcul du SR^M . Il ressort que plus la charge est proche de la saturation, plus le SR^M est grand. Cependant, il n'est pas possible de corrélérer directement la charge en API à la performance des formulations. En revanche, le SR^M apparaît très fortement lié au devenir de la substance active au cours de la digestion, et ce quelles que soient les propriétés physico-chimiques des substances actives. Les résultats de cette troisième publication mettent en avant une valeur seuil du $SR^M = 3$ après 60min de digestion, au-dessus de laquelle le risque de précipitation est très grand. De plus ces résultats confirment que les formulations constituées d'acides gras à chaîne longues résistent mieux à la précipitation que les formulations avec des acides gras à chaînes courtes. Cependant ces dernières présentent une meilleure capacité à incorporer les substances actives à un état dissous. Les résultats

montrent que le SR^M est adapté aux 2 types de formulation, et permet alors de prendre en compte l'influence de la longueur des chaînes d'acides gras sur la performance des formulations.

Le SR^M est principalement affecté par la dose chargée et la capacité de dissolution de la LBF au cours de la digestion. Il apparait comme un paramètre prédictif du devenir *in vitro* des substances actives, avec un caractère universel. Il peut en effet s'appliquer aux 4 types de LBFs du LFCS avec des acides gras à chaînes longues ou moyennes et chargées à différents pourcentages de différentes substances actives. La valeur du SR^M varie au cours des 60 minutes du test de digestion. Cependant le calcul du SR^M après 60min est plus intéressant car correspond à aux conditions les plus difficiles appliquées à la formulation, avec la probabilité de précipitation la plus grande. Le SR^M donne ainsi une indication sur la « pression » maximum de sursaturation qui s'applique sur la formulation. Les résultats de la 3^{ème} publication déplacent la valeur seuil du SR^M de 2,5 à 3. La notion de valeur seuil peut s'expliquer par la théorie classique de la nucléation. Au-dessus de ce seuil, la barrière thermodynamique à la nucléation est trop réduite pour empêcher une nucléation et donc une cristallisation spontanée. La nucléation induit et accélère la précipitation de cristaux de substance active, et doit donc être évitée.

Cependant, la sursaturation peut aussi être une réponse pour améliorer la biodisponibilité des molécules dont la dissolution est le facteur limitant [Brouwers 2009]. C'est sur ce principe que repose le développement des systèmes sursaturés (Supersaturating Drug Delivery Systems, SDDS), dont peuvent faire partie les LBFs.

e. Introduction aux systèmes sursaturés

L'état de sursaturation correspond à la présence d'une substance active en solution, à une concentration supérieure à sa solubilité saturante dans le milieu, en occurrence dans le tractus gastro-intestinal. Il s'agit d'un état thermodynamiquement instable tendant vers la solubilité d'équilibre par précipitation de l'API. Néanmoins si la sursaturation persiste, le temps de solubilisation peut être suffisant pour l'absorption de la substance active, et donc augmenter sa biodisponibilité. Le travail Brouwers en 2009, [15] discute deux aspects de la sursaturation : la génération de cet état et son maintien, représentés par deux types de formulations. Tout d'abord les formulations sursaturantes qui ont pour objectif de créer et de maintenir dans le temps l'état de sursaturation. Elles associent des APIs sous des formes de haute énergie, plus facilement dissous, à des inhibiteurs de précipitation tels que l'Hydroxy-Propyl-Méthyl-Cellulose (HPMC). Il s'agit par exemple de dispersions solides. D'un autre côté, il existe des systèmes générant une sursaturation, parmi lesquels on trouve les LBFs. Elles vont éviter une trop grande précipitation par l'augmentation de la capacité solvante de l'environnement gastro-intestinal, en associant les composants de la formulation aux espèces endogènes de l'organisme.

Le test de digestion des LBFs du consortium LFCS propose d'évaluer grâce au SR^M, la limitation de la sursaturation, mais aussi le maintien de l'état de sursaturation au cours du temps avec un prélèvement jusqu'à $t = 60\text{min}$. Ainsi les formulations développées doivent trouver un compromis entre la génération d'une sursaturation de l'API et sa limitation, l'objectif final étant d'améliorer la biodisponibilité des substances actives. Pour connaître l'impact réel des formulations sur la biodisponibilité, il est intéressant de comparer les résultats de tests *in vitro* et *in vivo*.

f. Corrélation des performances *in vitro* et *in vivo* des systèmes lipidiques

Même si peu de données sont disponibles, en 2007 une étude s'intéresse à l'effet de proportions variables de lipides, tensioactifs et de co-solvants, sur la capacité de SEDDS à dissoudre le danazol au cours de tests de dispersion et de digestion [16]. Les méthodes utilisées sont proches de celles du LFCS, tant sur l'établissement des diagrammes de phase que sur la préparation des formulations. Les résultats de 9 formulations différentes de type III et IV, sont corrélés aux biodisponibilités obtenues chez le chien. Il est alors mis en évidence que les formulations permettant la meilleure dissolution *in vitro*, présentent aussi la biodisponibilité la plus grande. Les formulations les plus efficaces sont celles ayant la plus faible proportion en tensioactif (Cremophor® EL) et la quantité de lipide (Maïssine¹ 35-1) la plus grande. D'autre part en 2012 est publié un travail comparant aussi les résultats des tests de lipolyse *in vitro* aux résultats de biodisponibilité observés chez le chien [17]. Pour cela, 4 types de SNEDDS différents ont été formulés: du type I à IV, la proportion d'huile diminue, pour une proportion de tensioactif croissante. Les 4 formulations sont chargées à 25mg/g de cinnarizine, utilisée comme API modèle BCS classe II. La solubilité de la cinnarizine est meilleure dans les types I (partie lipophile plus grande) que dans les types II, III puis IV, qui sont alors chargés à une valeur proche de la concentration saturante. D'autre part, la taille des gouttelettes d'émulsion diminue avec la proportion de phase huileuse, et il est observé que le type IV, plus hydrosoluble, entraîne une précipitation de la substance active lors du test de dispersion. Suite aux tests *in vivo*, il ressort que les systèmes permettant une meilleure biodisponibilité, évaluée par la valeur d'aire sous la courbe (Area Under the Curve, AUC) sont les systèmes III et IV, les plus hydrophiles. Ces SNEDDS permettent aussi un meilleur maintien de la solubilité *in vitro*, montrant donc une corrélation entre solubilité *in vitro* lors du test de digestion et biodisponibilité. Ainsi, ces résultats confirment ceux publiés en 2007 [16]. Ils doivent cependant être particulièrement discutés, car les méthodes utilisées diffèrent des lignes directrices recommandées par le consortium LFCS.

En conclusion, bien que les mécanismes expliquant l'absorption des substances actives depuis l'état dissous dans les formulations lipidiques ne soient que peu connus, il est important de pouvoir définir des paramètres *in vitro* prédictifs du devenir *in vivo* des formulations. Ainsi, caractériser des systèmes lipidiques permettant un maintien en solution *in vitro* des substances actives BCS II, est une solution à leur faible biodisponibilité.

III. INTRODUCTION AU TRAVAIL EXPERIMENTAL

Dans le cadre d'un projet de formulation et d'évaluation de systèmes lipidiques pour substances actives faiblement solubles dans l'eau, cette étude participe aux étapes finales du développement d'un nouvel excipient tensioactif : le Gélucire® 48/16. Ce tensioactif ne présente pas de partie glycéridique et est donc particulièrement adapté à la formulation des systèmes lipidiques de type IV. Deux concurrents commerciaux sont sélectionnés : le Tween® 80 et le Kolliphor® RH40 qui sont deux tensioactifs solubles dans l'eau ne contenant pas de glycérides non plus, et pouvant aussi être utilisés dans les LBFs de type IV.

Le matériel et les méthodes de travail suivent les dernières recommandations du consortium sur les formulations lipidiques afin de pouvoir discuter et comparer les résultats obtenus. Les 3 substances actives faiblement solubles dans l'eau sélectionnées sont : le piroxicam, la cinnarizine et l'ibuprofène.

Le protocole de travail suit 3 étapes principales :

- Tout d'abord la solubilité des APIs dans différents excipients entrant dans la formulation des LBFs est mesurée. Il s'agit d'excipients Gattefossé ou de concurrents commerciaux. Ces tests permettent de sélectionner les excipients présentant le meilleur pouvoir solvant pour entrer dans la composition des formulations développées par la suite.
- Ensuite l'étape de formulation qui correspond à la mise en place de diagrammes binaires et ternaires afin de sélectionner les formulations d'intérêt qui seront évaluées.
- Enfin l'étape d'évaluation, par un test de digestion *in vitro*, des formulations d'intérêt chargées en API et non chargées afin de calculer le SR^M.

Cette étude est aussi le support de différentes communications scientifiques, en particulier de trois posters présentés au congrès annuel de l'association américaine des sciences pharmaceutiques (American Association of Pharmaceutical Scientists, AAPS) en novembre 2013.

IV. OBJECTIFS

Ce travail a 4 objectifs principaux :

- Développer, selon les dernières recommandations du consortium sur les formulations lipidiques, différents types de LBFs capables de maintenir en solution des substances actives peu solubles dans l'eau.
- Définir quels excipients et quels types de LBFs sont les plus aptes pour apporter une solution à la faible biodisponibilité des substances actives BCS II.
- Evaluer les capacités du Gélucire® 48/16 par rapport aux excipients concurrents, afin de présenter ses utilisations possibles et mettre en évidence les solutions nouvelles qu'il apporte.
- Mettre en évidence des paramètres prédictifs du maintien de la solubilité *in vitro*, en particulier par l'évaluation du SR^M.

V. MATERIELS ET METHODES

a. Matériels

i. Excipients

- **Gélucire[®] 48/16** (Gattefossé, lot 128623) est un stéarate de Poly Ethylène Glycol 32 (PEG-32), avec un point de fusion entre 46 et 50°C, une balance hydrophile-lipophile (Hydrophilic-Lipophilic Balance, HLB) de 16 et une concentration micellaire critique (CMC) de 260 mg/L. C'est un excipient hydrophile : l'addition d'eau entraîne l'hydratation des chaînes de PEG et la gélification du polymère. Le Gélucire[®] 48/16 est un tensioactif pouvant former une solution micellaire par addition de plus de 80% d'eau [6 ; 9].
- **Labrasol[®] ALF** (Caprylo caproyl de polyoxyl-8 glycéride, Gattefossé, lot 134394) est un tensioactif non ionique, dispersible dans l'eau, composé d'esters de PEG, de glycerides et de PEG libre. Il a une HLB de 12 et une CMC de 30mg/L. C'est un SMEDDS liquide à température ambiante.
- **Tween[®] 80** (Polyoxyéthylène 20 oléate de sorbitane, Merck Schuchardt OHG, lot S6536987 246) et un tensioactif non ionique miscible à l'eau (0,1mL/mL). Il présente une HLB est de 15 et une CMC de 13-15 mg/L.
- **Kolliphor[®] RH40** (polyoxyéthylène d'huile de ricin hydrogénée, BASF, lot 42977009T0) est un agent solubilisant et émulsifiant non ionique, utilisé dans les SEDDS ou SMEDDS, en combinaison avec un co-solubilisant et/ou co-solvant. Il a une HLB de 14 et une CMC de 200mg/L.
- **Labrafil[®] M1944CS** (Oleyl polyoxyl-6 glycéride, Gattefossé, lot 137844) est un tensioactif dispersible dans l'eau, composé d'esters de PEG et de glycérides. Il a une HLB de 9. C'est un SEDDS permettant de former des émulsions finement dispersées.
- **Capryol[®] 90** (Monocaprylate de propylène glycol, Gattefossé, lot 137885) est un tensioactif insoluble dans l'eau, avec une HLB de 5. Il est utilisé dans les SEDDS ou les SMEDDS.
- **Lauroglycol[®] 90** (Monolaurate de propylène glycol, Gattefossé, lot 136891) est un tensioactif insoluble dans l'eau, avec une HLB de 3. Il est utilisé dans les SEDDS ou les SMEDDS.
- **Plurol[®] oléique CC 497** (Di-oléate de triglycérol, Gattefossé, lot 139270) est un tensioactif insoluble dans l'eau, avec une HLB de 3. Il est utilisé dans les solutions lipidiques, les SEDDS ou les SMEDDS.
- **Labrafac[®] CC** (Triglycérides à chaînes moyennes, Gattefossé, lot 137582) est un composé huileux utilisé dans les solutions lipidiques, les SEDDS ou les SMEDDS.
- **Maisine[®] 35-1** (Monolinoléate de glycérol, Gattefossé, lot 134565) est un composé huileux utilisé dans les solutions lipidiques, les SEDDS ou les SMEDDS.

- **Pécéol^I** (Mono-oléate de glycérol, Gattefossé, lot 135566) est un composé huileux utilisé dans les solutions lipidiques, les SEDDS ou les SMEDDS.
- **Transcutol[®] HP** (Mono-éthyléther de diéthylène glycol, Gattefossé, lot 451045001) est un solvant hautement purifié, pour les substances actives peu solubles dans l'eau. Il est utilisé comme un co-solvant hydrophile dans le SEDDS ou les SMEDDS.

Tableau II : Les excipients et les abréviations utilisées

Excipients		Abréviations
Tensioactifs solubles dans l'eau	Gélucire [®] 48/16	G48/16
	Labrasol [®] ALF	LAS
	Tween [®] 80	T80
	Kolliphor [®] RH40	RH40
Tensioactifs insolubles dans l'eau	Labrafil [®] M1944CS	LCS
	Capryol ^I 90	C90
	Lauroglycol ^I 90	L90
	Plurol [®] oléique CC497	POL
Huiles	Labrafac [®] CC	LCC
	Maisine ^I 35-1	MAI
	Pécéol ^I	PEC
Solvant hydrophile	Transcutol [®] HP	TRA

Sont aussi utilisés :

- CaCl₂ (lot 7381112) et Tris (hydroxylméthylaminométhane, lot 8389658) de Chimie Plus Laboratoire (Décines, France).
- NaCl (lot K30914004228), HCl fumant 37% (lot K3320717215), NaOH en pastilles (lot B0816982241) et pepsine (de muqueuse gastrique de porc, lot K40293785012) de Merck (Darmstadt, Germany).
- NaTDC (sodium taurodéoxycholate, lot 104K0634), tributyrine (lot 04229CE), pancréatine (de pancréas de porc, lot SLBC2100V), L- -phosphatidylcholine (lot SLBB9072V), valérophénone (lot 04507CH), et acide 4-bromophénylboronique (lot 1352628) de Sigma-Aldrich.
- Tous les solvants utilisés sont de grade HPLC.

ii. Substances actives

- **Ibuprofène** (50 EP, Reckitt Benckiser, lot 00167386) est un dérivé de l'acide propionique. C'est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) ayant des propriétés antalgiques et antipyrétiques. L'ibuprofène est un acide faible (pKa 4,91 ; figure 3).



Figure 3 : Structure chimique de l'ibuprofène [18]

- **Cinnarizine** (Sigma Aldrich, lot 127K1457) est un antihistaminique et un inhibiteur des canaux calciques. Elle est principalement utilisée contre le mal des transports. C'est une base faible (pKa 7,88 ; figure 4).

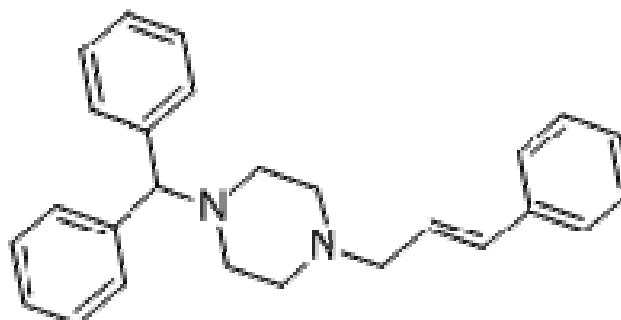


Figure 4 : Structure chimique de la cinnarizine [19]

- **Piroxicam** (AMSA, lot 109107001) est un AINS utilisé dans la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrose, les troubles musculo-squelettiques, la dysménorrhée et les douleurs post-opératoires. Sa longue demi-vie permet de l'administrer 1 fois par jour. C'est un ampholite (pKa 1,87-6,3 ; figure 5).

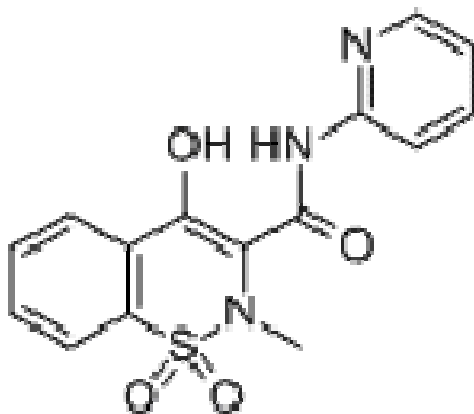


Figure 5 : Structure chimique du piroxicam [20]

Tableau III : Abréviations et doses thérapeutiques des substances actives utilisées

Substances actives	Abréviations	Dose thérapeutique (mg)
Ibuprofène	IBU	200
Cinnarizine	CNZ	25
Piroxicam	PIRO	10

Tableau IV : Propriétés physico-chimiques des substances actives utilisées

Substances actives	Solubilité dans l'eau (mg/L) à 25°C	Point de fusion (°C)	Log P	pKa	Poids moléculaire
Ibuprofène	21	76	3.97	4.91	206
Cinnarizine	750	120	5.77	7.88	368
Piroxicam	23	198	3.06	1,87-6,3	331

b. Méthodes

i. Mesure de la solubilité

La détermination de la solubilité des substances actives dans les excipients liquides à température ambiante et dans le milieu de digestion du LFCS se fait à 37°C par analyse HPLC selon les méthodes décrites à la Pharmacopée Américaine [21]. Les solubilités sont déterminées à 37°C et non à 25°C. En effet, des excipients sont trop visqueux à 25°C (cas du Tween[®] 80, de la Maïesine¹ 35-1, du Pécéol¹ et du Plurol[®] oléique CC 497) pour permettre la réalisation des tests de solubilité. De plus, la différence de solubilité entre 25 et 37°C est faible (environ 5%, données non présentées). La substance active est ajoutée en excès dans des flacons borosilicatés ambrés de 60mL, contenant 10g de chaque excipient lipidique. La dispersion est maintenue par agitation magnétique à 37°C, et des agitations régulières au vortex sont effectuées afin d'assurer une suspension homogène des particules non dissoutes dans l'excipient lipidique. Des prélèvements sont réalisés après 3, 5, 7 et 10 jours. Chaque échantillon est centrifugé à 2800g, 30min à 37°C. Le surnageant est prélevé et dilué dans le solvant adapté : de l'acétonitrile pour la cinnarizine et le piroxicam, une solution de valérophénone (étalon interne) dans l'acétonitrile à 35mg/mL pour l'ibuprofène. La solubilité est considérée comme atteinte lorsque la différence entre deux valeurs consécutives est inférieure à 5%.

La mesure de la solubilité des substances actives dans les excipients solides à température ambiante, se fait par analyse calorimétrique différentielle (Differential Scanning Calorimetry, DSC). C'est le cas du Gélucire[®] 48/16 et des formulations en contenant. L'équipement utilisé est la Pyris Diamond de Perkin Elmer. Le Gélucire[®] 48/16 est fondu et chargé en API de façon à réaliser une gamme de concentration. Chaque mélange est agité au vortex, puis conservé à 50°C pour s'équilibrer pendant toute une nuit. Suite à une agitation au vortex, des prélèvements de 5mg sont déposés dans des capsules d'aluminium et maintenus à température ambiante pendant plus de 24 heures pour permettre une stabilisation et une cristallisation, avant le scellage des capsules. Selon la loi de Raoult, la variation d'enthalpie du milieu est liée à concentration en substance active. Lorsque la concentration en API incorporé est inférieure à la solubilité, la variation d'enthalpie mesurée est celle de l'excipient avec un abaissement cryoscopique lié à l'API. Au-delà de la solubilité on peut considérer que ce sont les molécules d'excipient qui augmentent le désordre du réseau cristallin majoritairement formé par des molécules de principe actif. Ainsi la solubilité de la substance active dans le milieu apparaît au point d'inflexion de la courbe de la variation d'enthalpie en fonction de la concentration. Les analyses sont réalisées sous un flux d'azote (20mL/min). De l'indium hautement purifié est utilisé pour calibrer le flux de chaleur et la capacité calorifique. Le programme appliqué est le suivant : maintien à -20°C pendant 10 minutes puis chauffage jusqu'à 120°C à 3°C/min.

ii. Préparation des milieux pour les tests de dispersion, de lipolyse et de la solution de pancréatine

- Le milieu de simulation du fluide gastrique (Simulated Gastric Fluid, SGF), est préparé par ajout de NaCl (2g/L), de pepsine (3,2g/L) et de HCl fumant 37% (7mL/L) à 1L d'eau ultra-pure. Le pH est de 1,2.
- Le tampon de lipolyse est préparé par ajout de Tris (0,474g/L), de CaCl₂ (0,208g/L) et de NaCl (8,810g/L) dans l'eau ultra-pure. Le pH est ajustée à 6,5 avec du HCl 1M ou du NaOH 0,6M. Le tampon de lipolyse peut-être conservé 7 jours à 4°C.
- Le milieu de lipolyse est préparé par addition de L- -phosphatidylcholine (0,576g/L) et de NaTDC (1,565g/L) au tampon de lipolyse. Avant son utilisation, le milieu doit être agité pendant 12 heures minimum pour dissoudre totalement la L- -phosphatidylcholine. Le milieu de lipolyse peut être conservé 2 jours maximum à 4°C.
- La dispersion de pancréatine est préparée à une concentration de 200mg/mL de tampon de lipolyse. Après 10 minutes sous agitation magnétique, la solution est centrifugée à 2800g, 10min, 5°C. Le surnageant est ensuite utilisé dans les tests de digestion. Il est conservé 1 journée maximum.

iii. Calcul de la solubilité barycentrique

En connaissant la solubilité des APIs dans chaque excipient, il est possible de calculer la solubilité théorique de la substance active dans une formulation constituée de plusieurs excipients en différentes proportions (Baricentric solubility, Bs). L'équation 3 est utilisée :

$$BS = \sum (\%_{EX} \times S_{API})$$

Équation 3 : Calcul de la solubilité barycentrique

%_{ex} : pourcentage de l'excipient dans la formulation

S_{API} : solubilité de l'API dans l'excipient

iv. Mise en place des diagrammes binaires et ternaires

Parmi l'ensemble des formulations constituant les diagrammes binaires, les mélanges réalisés ont des proportions d'excipients variant successivement de 3%, soit :

Tableau V : Proportions d'excipients utilisées pour la mise en place des diagrammes binaires

Proportion d'excipient A	Proportion d'excipient B
100	0
97	3
94	6

Parmi l'ensemble des formulations constituant les diagrammes ternaires, les mélanges réalisés ont des proportions d'excipients variant successivement de 5%, soit :

Tableau VI : Proportions d'excipients utilisées pour la mise en place des diagrammes ternaires

Proportion d'excipient A	Proportion d'excipient B	Proportion d'excipient C
100	0	0
95	5	0
90	10	0
85	15	0
95	0	5
90	5	5

La mise en place des diagrammes binaires ou ternaires se fait alors en 2 étapes :

- La première étape est le test de miscibilité. 5g de chaque formulation, sans API, sont préparés dans un tube à essai et mis à l'étuve à 37°C. Les mélanges ne présentant qu'une seule phase après 24 heures sont miscibles.
- La deuxième étape est le test de dispersion. Il est réalisé dans un appareil de dissolution type USP II (Hanson Research, SR8 Plus ; annexe II). Deux grammes des formulations miscibles sont introduits dans 400 mL d'eau ultra-pure à 37°C avec une agitation fournie par des pâles standards à 60rpm. Le test de dispersion pour les formulations contenant une substance active est réalisé dans l'eau et dans le SGF.

L'apparence de la dispersion est évaluée macroscopiquement. Les mélanges sont soit homogènes, ce qui signifie qu'aucune particule en suspension n'est observée à l'œil nu après dispersion, soit non homogènes. Parmi les mélanges homogènes sont différenciés les mélanges limpides des mélanges troubles qui apparaissent bancs laiteux. Une observation par microscopie optique en lumière polarisée (Microscope Carl Zeiss Axio Scope A1) est aussi réalisée. La taille des particules est mesurée par spectroscopie à corrélation de photons (Photon Correlation Spectroscopy, PCS).

v. Viscosité, indice de réfraction et taille des particules

La viscosité et l'indice de réfraction sont nécessaires pour calculer la taille des particules. Les viscosités sont mesurées à 37°C avec un rhéomètre Contraves Rheomat 115. Un réfractomètre CETI est utilisé pour mesurer l'indice de réfraction à 37°C.

La distribution de la taille des particules n'est mesurée que sur les mélanges homogènes, par spectroscopie à corrélation de photons (PSS Nicomp, Particle sizing systems). L'angle de mesure est de 90° et la longueur d'onde du LASER de 632,8nm.

vi. Calcul du rapport de sursaturation maximale : SR^M

Le SR^M est le ratio de la concentration théorique maximum dans la phase aqueuse colloïdale sur la solubilité de la substance active dans la phase colloïdale digérée. (Equation 1) Dans le cadre de ce travail, il est calculé en appliquant l'équation 4 (36 correspond au volume de milieu de digestion en mL) :

$$SR^M = \frac{\text{Dose thérapeutique de l'API}}{36 \times \text{Solubilité de l'API dans la formulation digérée}}$$

Équation 4 : Calcul du SR^M

vii. Test de lipolyse

Le test de lipolyse est réalisé avec un appareil pH-Stat Titrand 842 (Metrohm ; Annexe III). Le bain est maintenu à 37°C et rempli avec 36mL de milieu de lipolyse. Au cours de la digestion des formulations lipidiques, le pH est maintenu constant par addition de NaOH 0,1N pour les formulations avec des acides gras à longues chaînes, et 0,6N pour celles contenant des acides gras à chaînes moyennes. On considère que 1 μ mol de NaOH correspond à 1 μ mol d'acides gras libérés par l'hydrolyse des lipides.

Avant le test de lipolyse, l'activité spécifique de la pancréatine doit être mesurée. Pour que la réaction soit directement proportionnelle à la concentration en enzyme, il est nécessaire d'avoir un excès de substrat. 500 microlitres de tributyrine (substrat modèle) sont introduits dans 28mL de milieu de lipolyse sans L- -phosphatidylcholine. Après 150 secondes d'agitation, 1,5 μ L de la dispersion de pancréatine sont ajoutés. L'activité spécifique de la pancréatine doit être supérieure à 900U/mg.

Pour tester les formulations lipidiques avec la substance active, la dose thérapeutique de chaque API est dissoute dans 1mL de formulation. Le mélange est réparti dans 2 gélules tailles 0 remplies de 500 μ L chacune. Les gélules sont dispersées pendant 10 minutes, puis 4mL de la dispersion de pancréatine sont ajoutés pour initier la digestion. Le test dure alors 1 heure avec des prélèvements de 1mL réalisés après 5, 15, 30 et 60 minutes. Le même test est réalisé pour les formulations sans API, mais un seul prélèvement de 1mL est pratiqué après 60 minutes de digestion. Chaque prélèvement est directement inhibé par 5 μ L d'une solution d'acide 4-bromophénylboronique 1M, puis centrifugé à 21000g, 30min, 37°C. Dans le cadre de la détermination de la solubilité des API dans la formulation digérée, le surnageant de l'échantillon prélevé après 1 heure de digestion sans API, est additionné d'un excès d'API et mis sous agitation pendant 4 heures, puis centrifugé à 21000g, 30min et 37°C. Chaque échantillon est dilué avec le solvant de façon adaptée à l'analyse HPLC: 102 fois dans la solution de valérophénone pour l'ibuprofène, 42 fois dans l'acétonitrile pour la cinnarizine et 400 fois dans l'acétonitrile pour le piroxicam.

VI. RESULTATS

a. Tests de solubilité

La solubilité des substances actives dans chaque excipient est présentée dans le tableau VI. Pour la plus part des tests, la solubilité d'équilibre a été atteinte en moins de 3 jours.

Tableau VII : Solubilité des APIs dans les excipients

Excipients		Solubilité (mg/mL)		
		Ibuprofène	Cinnarizine	Piroxicam
Tensioactifs solubles dans l'eau	Gélucire [®] 48/16	300	15	20
	Labrasol [®] ALF	357,0	28,3	15,0
	Tween [®] 80	306,6	20,0	18,5
	Kolliphor [®] RH40	368,9	28,9	28,3
Tensioactifs non solubles dans l'eau	Labrafil [®] M1944CS	18,1	12,4	3,5
	Capryol [†] 90	296,0	37,8	6,4
	Lauroglycol [†] 90	249,9	30,5	3,7
	Plurol [®] Oléique CC 497	14,6	7,7	2,6
Huiles	Labrafac [®] CC	17,3	26,6	2,5
	Maisine [†] 35-1	168,9	11,9	2,9
	Pécéol [†]	162,5	11,7	2,5
Solvant hydrophile	Transcutol [®] HP	437,0	42,7	19,9

Quelle que soit la substance active, les mêmes types d'excipients montrent la plus haute capacité solvante :

- Le Transcutol[®] HP, qui est le seul réel solvant, est le plus efficace des excipients. Cependant, du fait de sa propension à induire une précipitation lors de la dispersion et de sa faible compatibilité avec la gélatine, son utilisation dans les formulations est limitée à 15%.
- Tous les tensioactifs hydrophiles sont de bons solvants de ces APIs avec un log P entre 3 et 6.

- Parmi les tensioactifs non solubles dans l'eau, le Capryol¹ 90 est toujours le meilleur solvant. Ce résultat confirme la grande capacité solvante des excipients à chaînes moyennes par rapport aux acides gras à longues chaînes.

Ces substances modèles BCS II sont plus solubles dans le solvant et dans les tensioactifs solubles dans l'eau que dans les huiles. Par conséquent, les formulations lipidiques de type I et II du LFCS ne sont pas de bonnes options, alors que des LBFs plus hydrophiles telles que les types III et IV doivent être développées.

Dans le cadre de ce rapport, différentes associations d'excipients sont sélectionnées. Le Gélucire[®] 48/16 est choisi pour tous les APIs, et les autres excipients en fonction de leur capacité solvante. Les tensioactifs hydrosolubles ont pour rôle de favoriser l'émulsification. Les tensioactifs non solubles dans l'eau et le solvant hydrophile, doivent permettre de dissoudre la dose de substance active dans 1g de formulation. Les associations d'excipients sélectionnées sont présentées dans le tableau VII. Pour chacune d'elles la classification LFCS est précisée.

Tableau VIII : Associations d'excipients sélectionnées pour chaque substance active

Substances actives	Excipients sélectionnés	Type LFCS
Ibuprofène	LAS - C90	III B
	LAS - TRA	III B
	T80 - TRA	IV
	G48/16 - TRA	IV
	G48/16	IV
Cinnarizine	LAS - C90	III B
	LAS - C90 - TRA	III B
	G48/16 - TRA	IV
	G48/16	IV
Piroxicam	LAS	III B
	T80	IV
	RH40	IV
	G48/16	IV

b. Mise en place des diagrammes binaires et ternaires

Après avoir sélectionné les formulations, les proportions de chaque excipient doivent être définies. Pour chaque mélange, un diagramme binaire ou ternaire est tracé, dans lesquels sont définies les zones de miscibilité et d'apparence macroscopique après dispersion dans l'eau.

i. Tests de miscibilité

Les mélanges constitués de Gélucire® 48/16 et de plus de 6% de Transcutol® HP ne sont pas miscibles. Tous les autres mélanges testés sont miscibles (la proportion maximum de Transcutol® HP testée est de 15%).

ii. Tests de dispersion

Les résultats des tests de dispersion sont représentés par les diagrammes binaires et ternaires établis ci-dessous. L'ensemble des formulations sélectionnées sont présentes dans le diagramme ternaire Labrasol® ALF - Capryol[®] 90 - Transcutol® HP, et les diagrammes binaires Gélucire® 48/16 - Transcutol® HP et Tween® 80 - Transcutol® HP. Une formulation homogène signifie qu'aucune particule n'est observée à l'œil nu après dispersion. Parmi ces formulations, leur dispersion est soit limpide, soit trouble avec un aspect blanc laiteux.

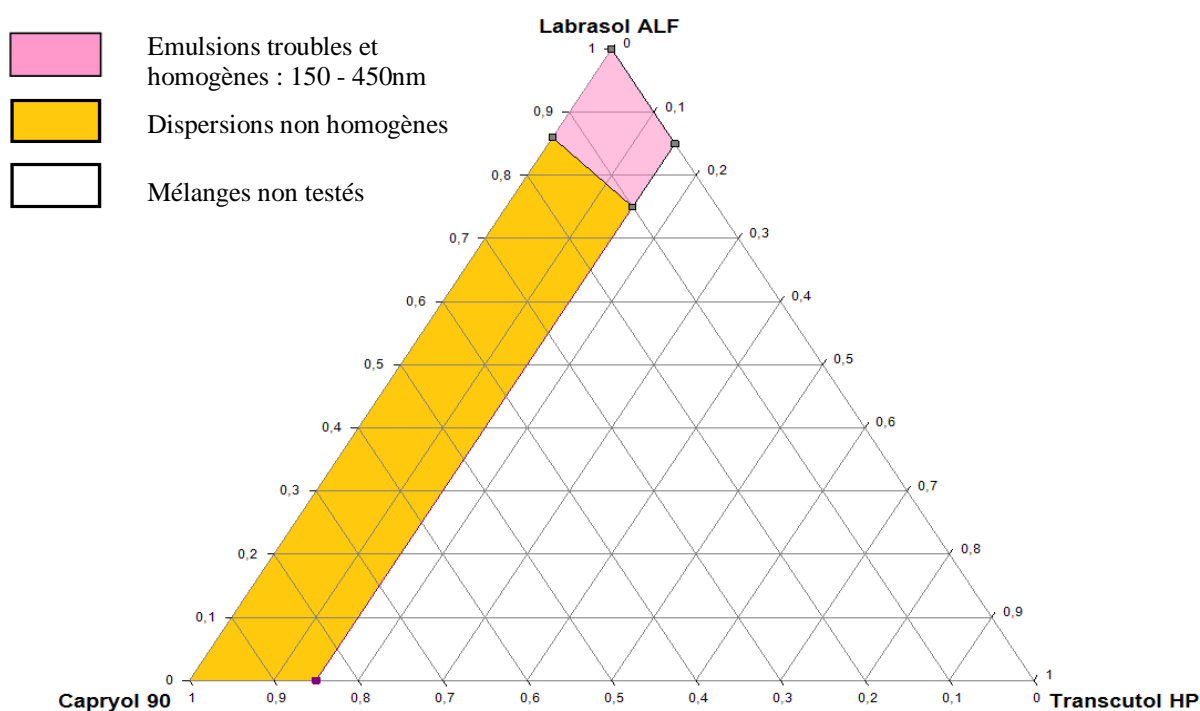


Figure 6 : Diagramme ternaire Labrasol® ALF - Capryol[®] 90 - Transcutol® HP

A partir de plus de 15% de Capryol[®] 90 (zone jaune), les mélanges ne sont plus homogènes. Le Labrasol® ALF n'est plus assez tensioactif pour émulsionner le Capryol[®] 90 dans l'eau. Les formulations d'intérêt se situent dans la zone rose (figure 6), qui contient des formulations formant des émulsions avec des tailles de gouttelettes entre 150 et 450nm (Diamètre moyen mesuré en nombre par PCS ; tableau VIII).

Les 2 diagrammes binaires G48/16 - TRA et T80 - TRA sont présentés ci-dessous.

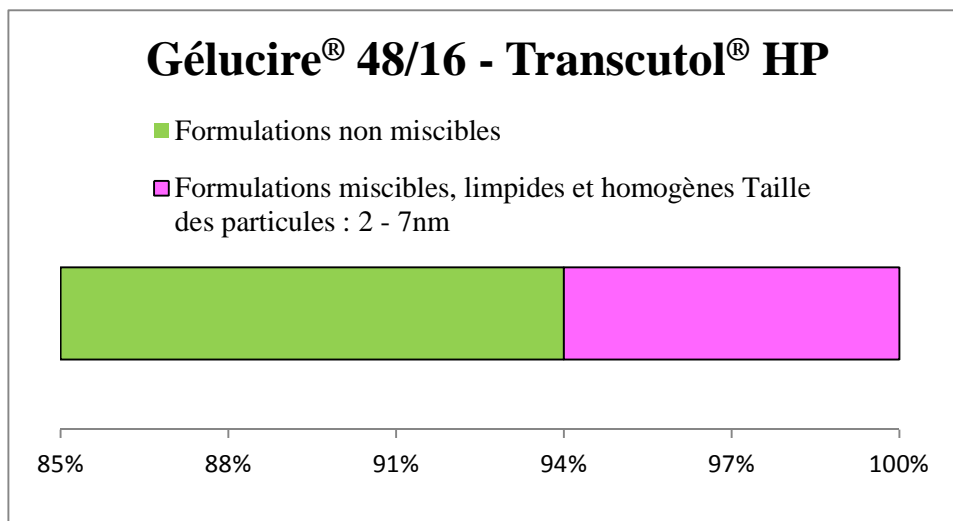


Figure 7 : Diagramme binaire Gélucire® 48/16 - Transcutol® HP

Au-delà de 6% de Transcutol® HP, les mélanges avec le Gélucire® 48/16 ne sont plus miscibles. Les formulations d'intérêt se situent dans la zone rose (figure 7). Il s'agit de formulations dont la dispersion forme des solutions micellaires limpides et homogènes, avec des tailles de particules de 2 à 7nm (Diamètre moyen mesuré en nombre par PCS ; tableau VIII).

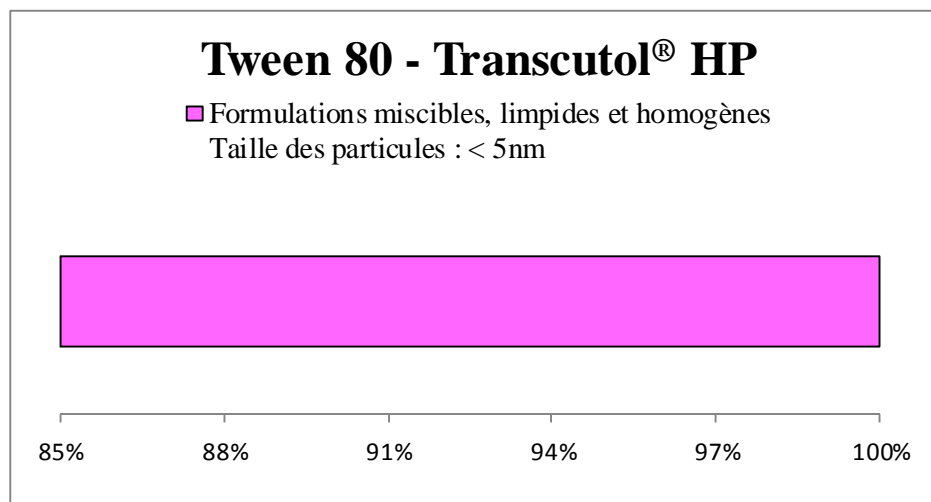


Figure 8 : Diagramme binaire Tween® 80 - Transcutol® HP

Jusqu'à 15% de Transcutol® HP (proportion maximale testée), les mélanges avec le Tween® 80 sont miscibles (figure 8). La dispersion de ces formulations forme des solutions micellaires limpides et homogènes avec des tailles de particules inférieures à 5nm (Diamètre moyen mesuré en nombre par PCS ; tableau VIII).

Pour la mise en place des diagrammes binaires et ternaires, le test de dispersion est associé à la mesure de la taille des particules par PCS. Elle n'est possible que lorsque la dispersion est homogène. Les résultats sont présentés dans le tableau VIII.

Tableau IX : Résultats des tests de dispersion: observations et taille des particules (obtenues par PCS)

Formulations	TRA	C90	LAS	G48/16	T80	Aspect à t = 0	Aspect à t = 30min	Taille de particules en nombre (nm)
F79	3	0	97	0	0	TH	TH	238 ± 46
F80	6	0	94	0	0	TH	TH	165 ± 33
F81	9	0	91	0	0	TH	TH	142 ± 27
F82	12	0	88	0	0	TH	TH	215 ± 49
F83	15	0	85	0	0	TH	TH	216 ± 49
F84	3	0	0	97	0	L	L	7 ± 1
F85	6	0	0	94	0	L	L	2 ± 0,3
F86	3	0	0	0	97	L	L	< 5
F87	6	0	0	0	94	L	L	< 5
F88	9	0	0	0	91	L	L	< 5
F89	12	0	0	0	88	L	L	< 5
F90	15	0	0	0	85	L	L	< 5
F1	0	0	100	0	0	TH	TH	233 ± 48
F2	5	0	95	0	0	TH	TH	222 ± 51
F3	10	0	90	0	0	TH	TH	207 ± 39
F4	15	0	85	0	0	TH	TH	299 ± 65
F5	0	5	95	0	0	TH	TH	325 ± 60
F6	5	5	90	0	0	TH	TH	296 ± 67
F7	10	5	85	0	0	TH	TH	226 ± 50
F8	15	5	80	0	0	TH	TH	197 ± 39
F9	0	10	90	0	0	TH	TH	372 ± 62
F10	5	10	85	0	0	TH	TH	390 ± 95
F11	10	10	80	0	0	TH	TH	217 ± 50
F12	15	10	75	0	0	TH	TH	318 ± 78
F13	0	15	85	0	0	TH	TNH	NA
F14	5	15	80	0	0	TNH	TNH	NA
T80	0	0	0	0	100	L	L	<5
RH40 100%	0	0	0	0	0	L	L	<5
G48/16	0	0	0	100	0	L	L	<5

Légende du tableau VIII : Le « F » signifie « Formulation » et le chiffre arbitraire *soy* rapportant correspond à une formulation unique, qui est utilisé tout au long du rapport. H = Homogène ; T = Trouble ; L = Limpide ; TNH = Trouble Non Homogène ; NA = Non Applicable

Les résultats présentés dans le tableau VIII montrent que lorsque les dispersions sont limpides et homogènes, la taille des particules est $< 10\text{nm}$. Il s'agit de solutions micellaires, formées par le Gélucire[®] 48/16, le Tween[®] 80 ou le Kolliphor[®] RH40. Lorsque la mesure de la taille des particules des dispersions limpides est aberrante par PCS, cela correspond à des micelles inférieures à 5nm. L'observation au microscope ne fait alors rien apparaître.

Quand la dispersion est homogène et trouble, la taille des particules est comprise entre 140 et 450nm. Il s'agit d'émulsions finement dispersées, qui sont ici formées par le Labrasol[®] ALF. A partir de proportions en LAS supérieures à 15%, les milieux ne sont plus homogènes. Il s'agit des formulations F13 et F14 du tableau VIII. La mesure de taille des particules par PCS n'est pas applicable. Des gouttes d'huile sont visibles à la surface du mélange dans le bol de dispersion. La figure 9 montre ces gouttelettes observées par microscopie optique.

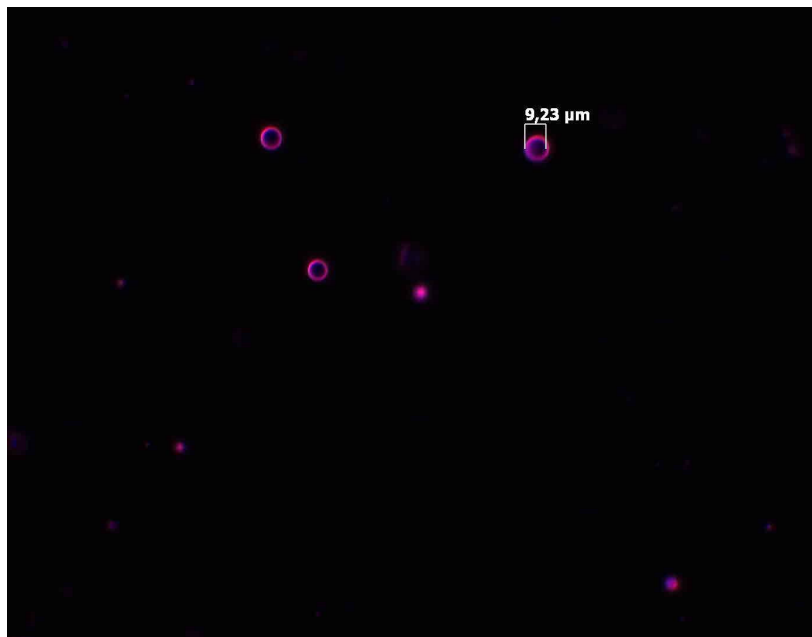


Figure 9 : Formulation F14 ; microscopie optique à lumière polarisée, objectif X40

iii. Sélection des formulations pour chaque API

La réalisation des diagrammes binaires et ternaires permet de déterminer les formulations qui peuvent être développées. Ainsi, les formulations doivent être miscibles, homogènes mais aussi posséder le pouvoir solvant le plus grand possible. Le calcul de la solubilité barycentrique permet d'avoir une valeur théorique de la solubilité, avant de mesurer la solubilité réelle des APIs dans les formulations sélectionnées. Ainsi, 5 formulations sont développées avec l'ibuprofène, 4 avec le piroxicam et 4 avec la cinnarizine. Le Transcutol® HP ne pouvant être associé à plus de 6% avec le Gélucire® 48/16, cette proportion du solvant est aussi sélectionnée avec les tensioactifs Labrasol® ALF et Tween® 80 afin de les comparer.

Tableau X : Résultats des solubilités barycentriques et mesurées des formulations sélectionnées, et les concentrations de saturation des formulations pour les tests de digestion

API Dose thérapeutique (mg)	Formulations	Solubilité barycentrique (mg/mL)	Solubilité mesurée (mg/mL)	Pourcentage de la saturation avec la dose thérapeutique (%)
Ibuprofène 200	F5 (LAS 95% - C90 5%)	354,0	361,0	55
	F80 (LAS 94% - TRA 6%)	361,8	330,1	61
	F85 (G48/16 94% - TRA 6%)	308,1	231,5	86
	F87 (T80 - TRA 6%)	314,4	267,7	75
	G48/16	NA	300	67
Cinnarizine 25	F9 (LAS 90% - C90 10%)	29,3	34,9	72
	F12 (LAS75% - C90 10% - TRA 15%)	31,4	23,9	105
	F85 (G48/16 94% - TRA 6%)	16,7	ND	ND
	G48/16	NA	15	167
Piroxicam 10	LAS	NA	15,0	67
	T80	NA	18,5	54
	RH40	NA	28,3	35
	G48/16	NA	20	50

Légende : NA = Non Applicable car un seul composé dans la formulation ; ND = Non Déterminé ; Les valeurs mesurées par DSC sont déterminées avec une précision inférieure à une décimale

c. Tests de dispersion des formulations chargées en substance active

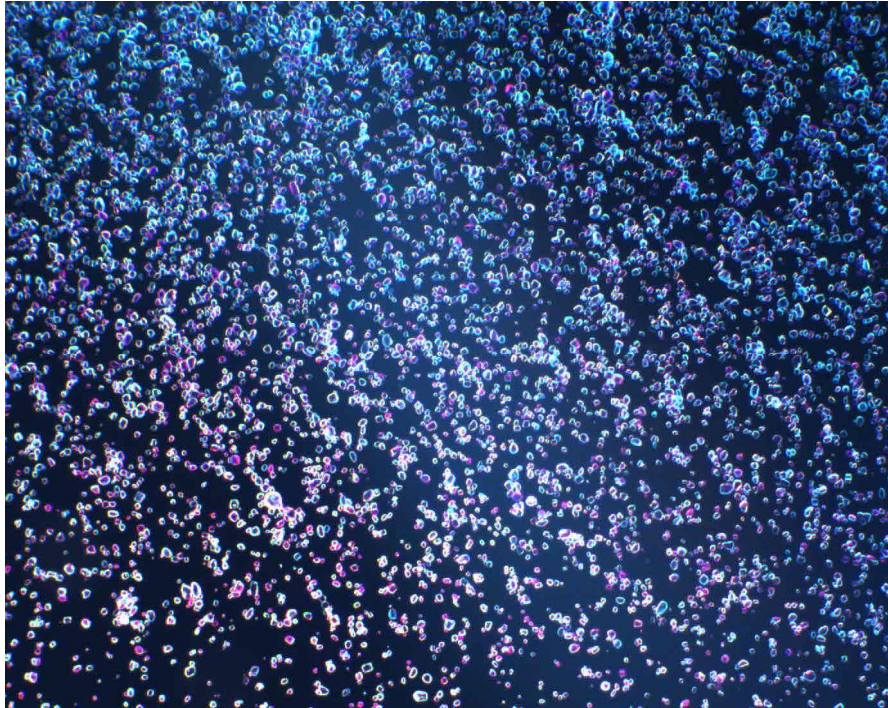
Pour la réalisation des tests de dispersion, les formulations sont chargées à 80% de la solubilité en substance active. Elles sont dispersées dans l'eau ultra-pure et dans le milieu SGF. Le test n'a été réalisé que sur un certain nombre des formulations sélectionnées (tableau IX). Les résultats des tests de dispersion sont présentés dans le tableau X.

Tableau XI : Tests de dispersion de formulations chargées en principe actif

API	Formulations	Masse d'API chargée (80% de la saturation) (mg)	Milieu de dispersion	Aspect à t = 0	Aspect à t = 30 min	Taille des particules en nombre (nm)
Ibuprofène	F5	288,8	Eau	TNH	TNH	NA
			SGF	TNH	TNH	NA
	F80	264,1	Eau	TNH	TNH	NA
			SGF	TNH	TNH	NA
	F87	214,2	Eau	LNH + P	LH + P	3,2 ± 0,5
			SGF	LNH + P	LH + P	62,1 ± 10,2
G48/16	240	Eau	TNH	TNH	NA	
		SGF	TNH	TNH	NA	
Cinnarizine	F9	27,9	Eau	TH	TH	ND
			SGF	TH	TNH	NA
	F12	19,1	Eau	TH	TH	4,4 ± 0,5
			SGF	TNH	TNH	NA
	G48/16	12	Eau	LH	LH	< 5
			SGF	LH	LH	< 5
Piroxicam	LAS	12,0	Eau	TH	TH	258,2 ± 59,1
			SGF	TNH	TNH	NA
	T80	14,8	Eau	L + P	L + P	ND
			SGF	L + P	L + P	ND
	RH40	22,6	Eau	L + P	L + P	14,2 ± 2,3
			SGF	L + P	L + P	9,8 ± 1,9
	G48/16	16	Eau	LH	LH	< 5
			SGF	LH	LH	< 5

Légende : T = Trouble ; H = Homogène ; NH = Non Homogène ; L = Limpide ; P = Précipité (la mesure de taille alors mesurée est celle de la phase aqueuse surnageante) ; NA = Non Applicable, cas de la mesure de taille des particules quand les mélanges ne sont pas homogènes ; ND = Non Déterminé.

Dès le début du test de dispersion des formulations contenant du Tween[®] 80 ou du Kolliphor[®] RH40, un précipité blanc apparaît. Par observation au microscope optique, il est mis en évidence qu'il s'agit de la substance active, piroxicam ou ibuprofène, comme observé dans la figure 10.



**Figure 10 : Précipité prélevé après 30 minutes de dispersion dans l'eau, de la formulation T80-PIRO ;
microscopie optique à lumière polarisée, objectif X10**

Les formulations F9 - CNZ et LAS - PIRO, contiennent du Labrasol[®] ALF, et sont homogènes dans l'eau. Cependant elles ne le sont pas dans le SGF à pH 1,2 où des particules blanches se déposent au fur et à mesure au fond du bol. Ce type de particules est aussi observé lors de la dispersion de F5 - IBU dans l'eau et le SGF. Par analyse HPLC, on met en évidence que ces particules contiennent de l'ibuprofène. Chargées à 80% de la solubilité, ces formulations ne sont donc pas capables de maintenir en solution l'ensemble de la substance active, lors des tests de dispersion.

Les dispersions du Gélucire[®] 48/16 montrent des résultats similaires aux autres formulations pour l'ibuprofène. En revanche il permet un maintien en solution de la cinnarizine pendant les 30 minutes du test. Cette observation doit cependant tenir compte du fait que la quantité de cinnarizine chargée est plus faible que dans les formulations F9 et F12. Néanmoins, le G48/16 permet aussi de dissoudre le piroxicam tout au long du test dans l'eau et le SGF, et ce avec une charge d'API supérieure au Tween[®] 80 et au Labrasol[®] ALF.

d. Tests de digestion

Chaque test de digestion *in vitro* est réalisé trois fois. Les résultats obtenus sont présentés dans les graphiques ci-dessous.

i. Test de digestion des formulations contenant du piroxicam

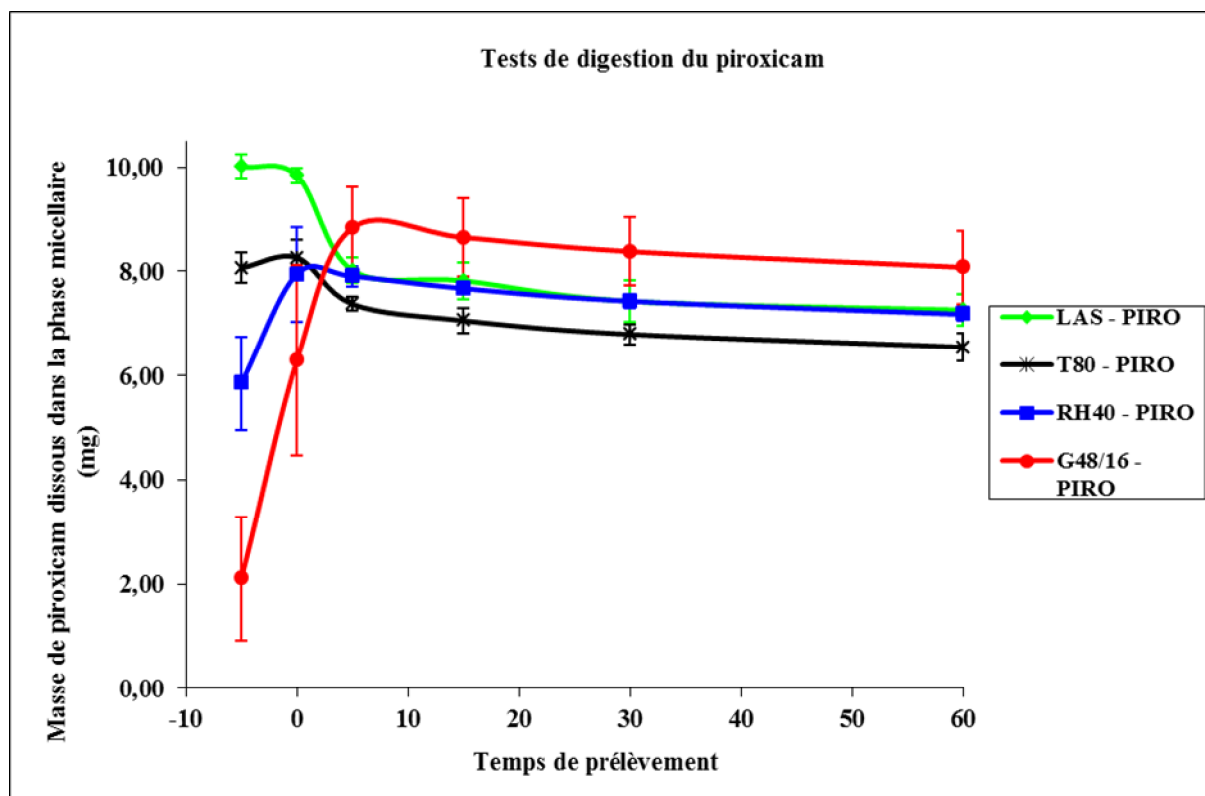


Figure 11 : Résultats des tests de digestion des formulations contenant 10mg piroxicam

Le Labrasol[®] ALF permet de dissoudre la totalité du piroxicam durant les 10 minutes de dispersion. Cela est dû à sa capacité à s'auto-émulsionner lorsqu'il est en contact avec un milieu aqueux. Les trois autres excipients forment des gels au contact de l'eau qui s'érodent plus lentement avec le temps. Le T80 est plus visqueux que le LAS, le RH40 est semi-solide et le G48/16 est solide. Ainsi on observe que la vitesse de dispersion est corrélée à l'état physique de l'excipient. D'autre part, la formation des micelles par le Gélucire[®] 48/16 dure plus de 10 minutes, expliquant la quantité croissante de piroxicam dissous après l'introduction de l'enzyme.

Après 1 heure, le Gélucire[®] 48/16 permet de maintenir en solution $8,1 \pm 0,7$ mg de piroxicam soit 81% de l'API introduit. Il est plus efficace que le Labrasol[®] ALF, le Kolliphor[®] RH 40 et le Tween[®] 80 qui maintiennent respectivement $7,3 \pm 0,3$ mg (73%), $7,2 \pm 0,1$ mg (72%) et $6,5 \pm 0,3$ mg (65%) de piroxicam en solution.

ii. Test de digestion des formulations contenant de la cinnarizine

La mesure de la solubilité des substances actives dans les formulations préalablement digérées, permet de déterminer les rapports de sursaturation maximale (SR^M) des formulations F12, F85 et G48/16. La solubilité dans la formulation F9 digérée n'a pas été déterminée, ne permettant donc pas le calcul du SR^M (tableau XI).

Tableau XII : Valeurs calculées des SR^M pour les formulations contenant de la cinnarizine

Formulations	F9 - CNZ (LAS 90% ; C90 10%)	F12 - CNZ (LAS 75% ; C90 10% ; TRA 15%)	F85 - CNZ (G48/16 94% ; TRA 6%)	G48/16 ó CNZ
Solubilité théorique maximum de la cinnarizine au cours du test de digestion (mg/mL)	$\frac{25}{36} = 0,69$			
Solubilité de la cinnarizine dans la formulation digérée (mg/mL)	ND	0,016	0,034	0,019
SR^M	ND	43,1	20,3	36,3

Légende : ND = Non Déterminé

Les valeurs des SR^M sont très supérieures à 3. Cela prédit une précipitation importante de la cinnarizine au cours de la digestion. Les tests de digestion de 1g des formulations contenant 25mg de cinnarizine sont alors réalisés.

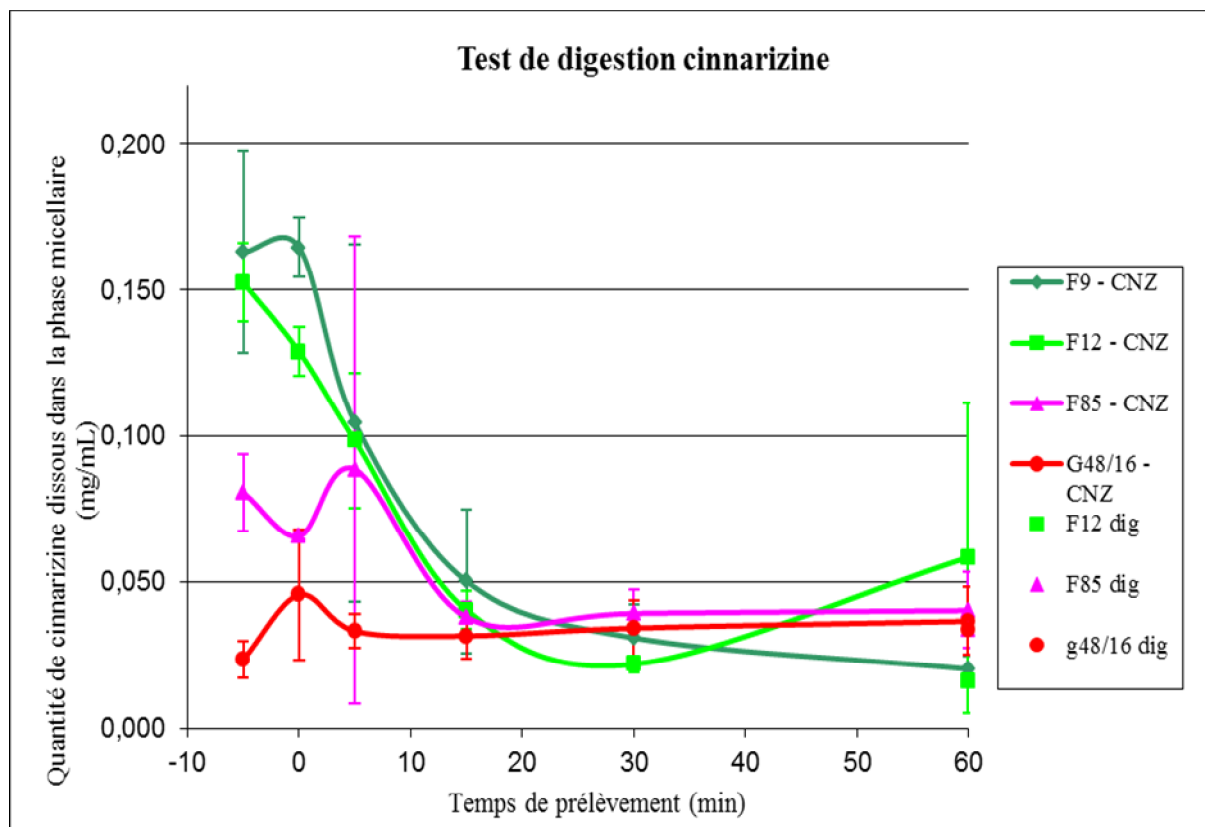


Figure 12 : Résultats des tests de digestion des formulations contenant 25 mg de cinnarizine

Les formulations sélectionnées pour maintenir en solution la cinnarizine, n'apparaissent pas efficaces. En effet, le maximum de solubilisation atteint est de $0,17 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$ à t_0 soit $5,8 \pm 0,4 \text{ mg}$. Cela correspond à 23% des 25mg de cinnarizine introduits, qui sont dissous lors de la phase de dispersion (F9 - CNZ t_0). Dès l'ajout de la pancréatine, la concentration en cinnarizine chute rapidement vers des valeurs équivalentes à la solubilité dans la formulation digérée, quels que soient les excipients testés. Par exemple, la solubilité de la cinnarizine dans la formulation F9 digérée préalablement (F9 - dig) est de $0,016 \text{ mg/mL}$ et la solubilité de la cinnarizine après 60 minutes de digestion est de $0,020 \pm 0,005 \text{ mg/mL}$ (F9 - CNZ t_{60}).

Ainsi des valeurs de SR^M très supérieures à 3 sont prédictives d'une précipitation importante de la substance active.

Cependant il est aussi possible d'observer que le Labrasol® ALF, qui contient des acides gras à chaînes moyennes, parvient à mieux dissoudre la cinnarizine qui a un $\log P = 5,7$. L'ajout de Capryol® 90 qui est un tensioactif insoluble dans l'eau, est probablement bénéfique à cette dispersion. D'autre part, la présence de Transcutol® HP dans la formulation F12 par rapport à F9 peut expliquer une tendance légèrement plus rapide à la précipitation.

Par ailleurs, la formulation G48/16 - CNZ est une dispersion chargée à 167% de la saturation, alors que la formulation F9 - CNZ est une solution chargée à 72% de la saturation (tableau IX). Cela explique aussi que la dispersion est meilleure pour F9 - CNZ ($0,17 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$ à t_0) que pour la formulation G48/16 - CNZ ($0,046 \pm 0,022 \text{ mg/mL}$ à t_0).

iii. Test de digestion des formulations contenant de l'ibuprofène

Comme précédemment, les SR^M sont calculés pour chaque formulation sélectionnée pour dissoudre l'ibuprofène. Les valeurs sont présentées dans le tableau XII.

Tableau XIII : Valeurs calculées des SR^M pour les formulations contenant de l'ibuprofène

Formulations	F87 ó IBU (T80 94% ; TRA 6%)	F80 ó IBU (LAS 94% ; TRA 6%)	F5 ó IBU (LAS 95% ; C90 5%)	G48/16 ó IBU	F85 ó IBU (G48/16 94% ; TRA 6%)
Solubilité théorique maximum de l'ibuprofène au cours du test de digestion (mg/mL)	$\frac{200}{36} = 5,5$				
Solubilité de l'ibuprofène dans la formulation digérée (mg/mL)	2,7	2,2	2,0	2,0	1,8
SR^M	2,0	2,5	2,8	2,8	3,1

Les SR^M des formulations contenant de l'ibuprofène se situent entre 2,0 et 3,1. La substance active devrait donc être maintenue en solution tout au long du test de digestion. Les tests de digestion sont réalisés et les résultats présentés par le graphique de la figure 13.

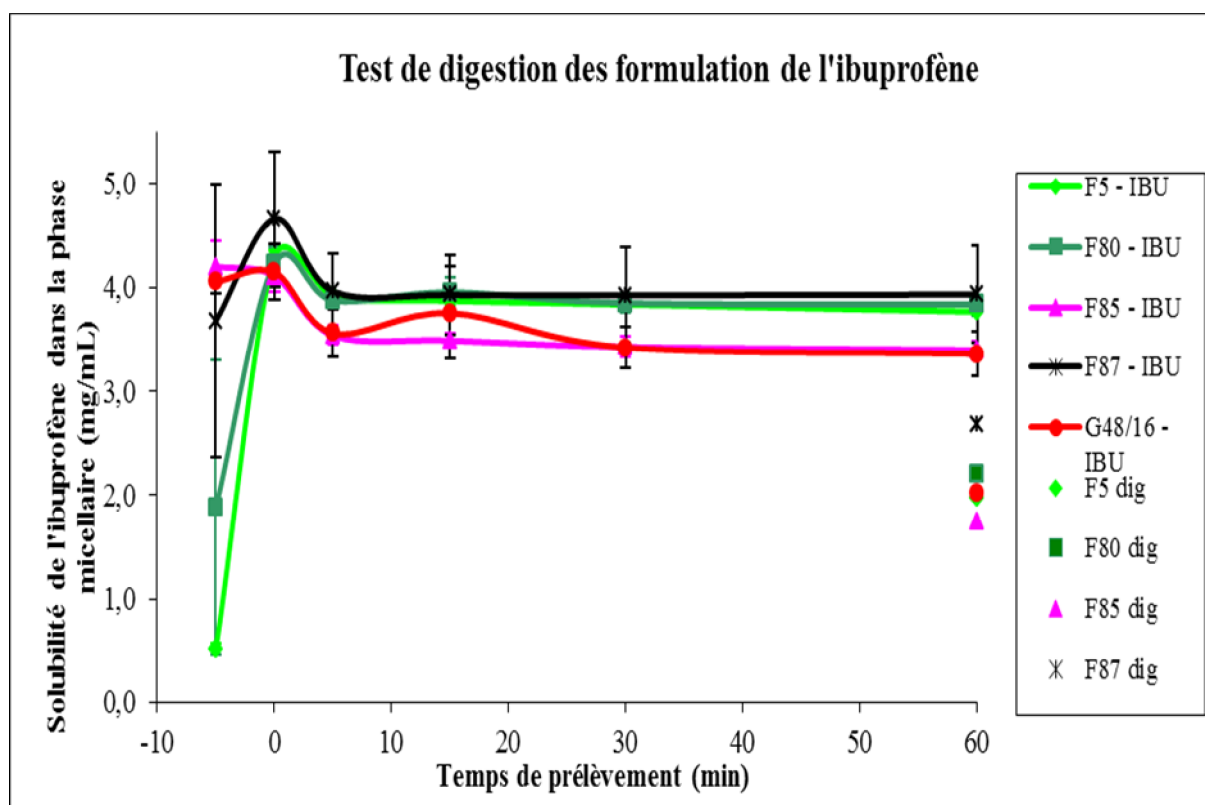


Figure 13 : Résultats des tests de digestion des formulations contenant 200mg d'ibuprofène

Lors de la phase de dispersion, les formulations contenant du Labrasol[®] ALF (F5 - IBU et F80 - IBU) sont les moins efficaces pour dissoudre l'ibuprofène. Ces résultats, opposés à ceux du test avec le piroxicam, peuvent s'expliquer par la présence des excipients associés. En effet, le Capryol[®] 90 dans F5 va former des gouttelettes lipidiques renfermant préférentiellement l'ibuprofène. La dispersion homogène de l'API dans le milieu est alors plus longue. Le Transcutol[®] HP, présent dans F80, est pourvoyeur de précipitation. Cela peut expliquer la faible quantité d'ibuprofène mesurée à t-5. Il faut cependant noter que les écarts types calculés au prélèvement t-5 de F80 sont très grands. D'autre part, les formulations contenant du Gélucire[®] 48/16 montrent un temps de latence, avant dissolution de l'ibuprofène, plus court que lors ce que Gélucire[®] 48/16 est chargé en piroxicam (formulation G48/16 - PIRO ; figure 11). Cette différence est due au plus grand désordre induit dans la structure du Gélucire[®] 48/16 par l'ibuprofène que par le piroxicam. En effet, les diagrammes de phases obtenus par DSC pour la mesure de la solubilité des APIs dans le Gélucire[®] 48/16, montrent une variation d'enthalpie induite par l'ibuprofène ($\Delta H = 130\text{J/g}$; figure 14) beaucoup plus importante que celle due aux concentrations de piroxicam ($\Delta H = 14\text{J/g}$; figure 15). De plus, l'ionisation de l'ibuprofène à pH 6,5 va faciliter sa dissolution.

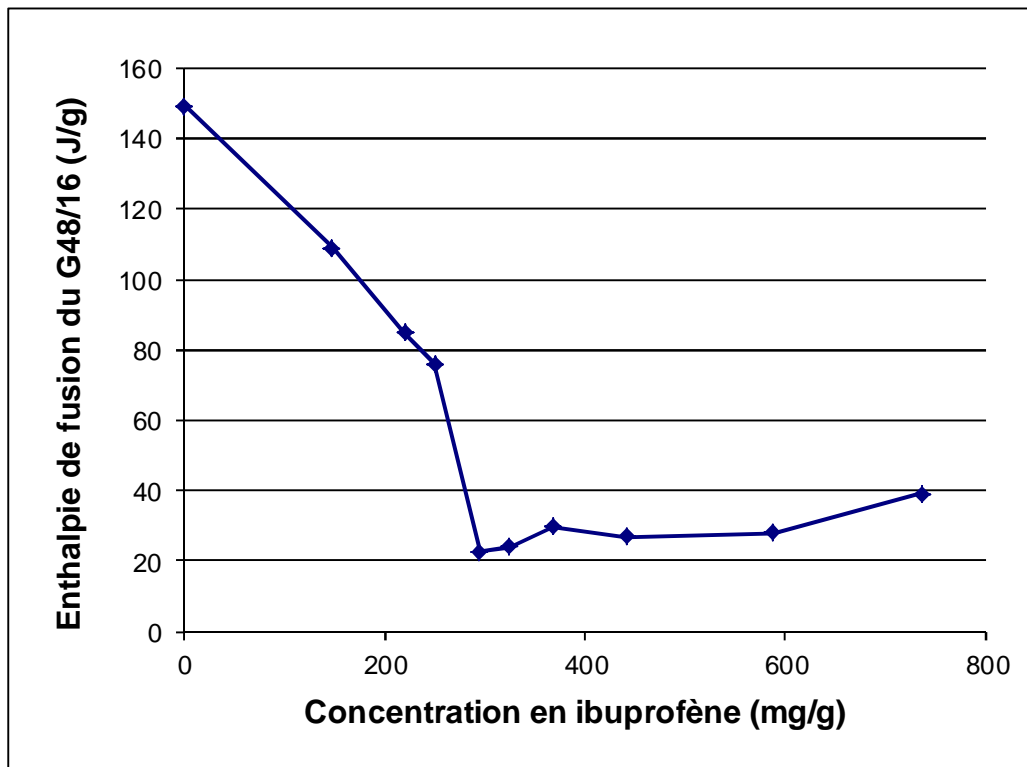


Figure 14 : Mesure de la solubilité de l'ibuprofène dans le Gélucire® 48/16 par DSC

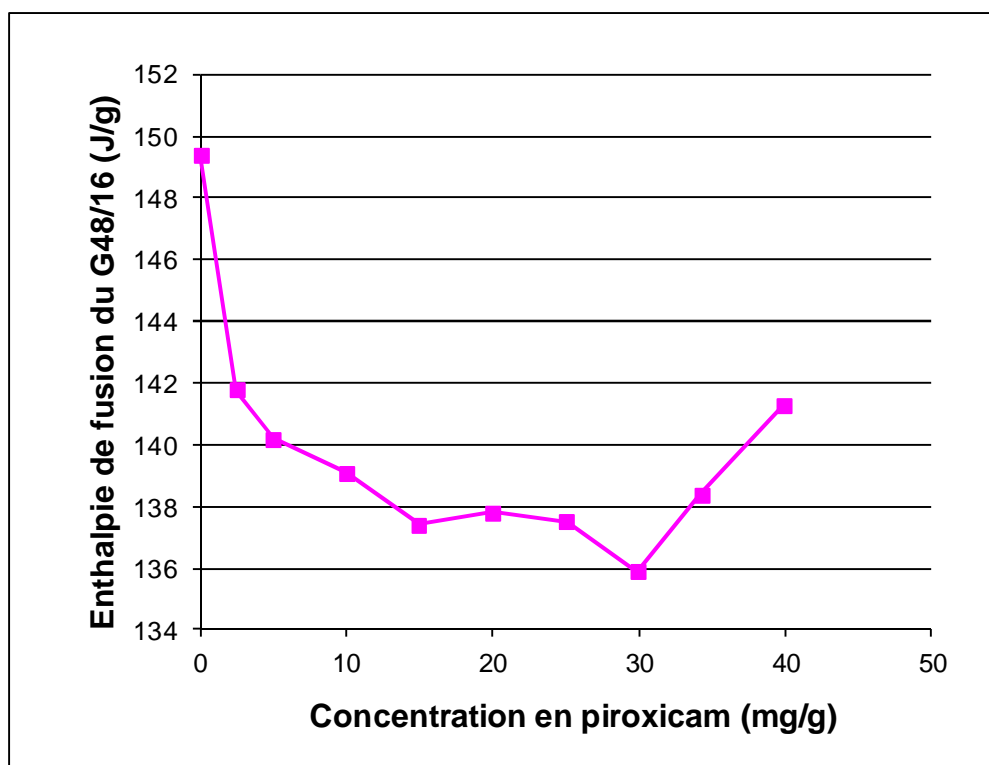


Figure 15 : Mesure de la solubilité du piroxicam dans le Gélucire® 48/16

D'autre part, le Tween[®] 80 montre des profils similaires avec le piroxicam et l'ibuprofène (F87), en atteignant pour ce dernier la solubilisation maximale de 82% à t0. On remarque alors que, bien que la formulation F87 soit la formulation chargée en ibuprofène au plus proche de la concentration saturante, elle montre une efficacité comparable aux autres pour maintenir l'ibuprofène en solution.

Le tableau XIII met en relief les performances des formulations, observées sur la figure 13.

Tableau XIV : Solubilité, masse et pourcentage d'ibuprofène dissous à t60min du test de digestion

Formulations	F87 ó IBU (T80 94% ; TRA 6%)	F80 ó IBU (LAS 94% ; TRA 6%)	F5 ó IBU (LAS 95% ; C90 5%)	G48/16 ó IBU	F85 ó IBU (G48/16 94% ; TRA 6%)
Solubilité de l'ibuprofène à t60 (mg/mL)	3,9±0,5	3,8±0,1	3,8±0,04	3,4±0,2	3,4±0,1
Masse d'ibuprofène dissous à t60 (mg)	137,7±16,4	134,4±3,9	131,9±1,3	117,6±7,5	119,0±3,2
Pourcentage de la dose d'ibuprofène introduit, dissous à t60 (%)	68,9±8,2	67,2±1,9	65,9±0,6	58,8±3,7	59,5±1,6

Les valeurs rapportées dans le tableau XIII montrent que les quantités d'ibuprofène dissoutes à la fin du test sont élevées. En effet de 60 à 70% des 200mg d'ibuprofène introduits, sont dissous après 60min de digestion. D'autre part, les solubilités obtenues avec les formulations contenant du Gélucire[®] 48/16 semblent légèrement inférieures. Cependant, en fonction des écarts types calculés, les 5 formulations sélectionnées montrent des performances similaires. De plus, l'observation des courbes de dissolution de l'ibuprofène au cours de la digestion (figure 13) montrent que le maintien de la substance active en solution est constant pendant les 60min du test. Ainsi les formulations présentent des performances intéressantes. Elles ont de bonnes capacités solvantes notamment liées à la génération d'états de sursaturation ($SR^M > 1$), et une très bonne résistance à la précipitation ($SR^M < 3$).

Ainsi, on confirme que pour des valeurs de SR^M inférieures ou légèrement supérieures à 3, les formulations permettent une bonne solubilité des substances actives. Le SR^M apparaît de nouveau comme un indicateur prédictif du maintien en solution de la substance active au cours de la digestion.

VII. DISCUSSION

Pour chaque étape de ce travail, les résultats sont comparés et discutés. Ainsi les réponses apportées aux objectifs fixés sont mises en avant.

Tout d'abord, à partir des résultats de solubilité des APIs dans les excipients, il est possible de définir un nombre réduit d'excipients présentant des pouvoirs solvants suffisants. Il s'agit des tensioactifs solubles dans l'eau (HLB > 12), du Capryol[®] 90 et du Transcutol[®] HP. Au final, les formulations lipidiques les plus adaptées à la dissolution de substances actives BCS II avec un log P d'environ 3 (ibuprofène, piroxicam), semblent être les LBFs de type III B et IV du LFCS.

La dissolution de la cinnarizine par les formulations sélectionnées est trop faible par rapport à la dose thérapeutique. Bien que la Maisine[®] 35-1 ou le Pécéol[®] n'aient pas été sélectionnés du fait de leur faible pouvoir solvant, il serait intéressant d'utiliser ces excipients contenant des acides oléiques, à l'instar des travaux de Larsen [17] utilisant de l'huile de sésame. Il semble en effet que l'utilisation de ces huiles permettrait de mieux dissoudre la cinnarizine qui est un API plus lipophile (log P = 5,77) que l'ibuprofène et le piroxicam. L'évaluation d'une formulation constituée de 75% de Labrasol[®] ALF, 10% de Capryol[®] 90 et de 15% de Maisine[®] 35-1 a été réalisée avec le même test de digestion *in vitro*. Il s'agit d'une formulation de type IIIB. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec les formulations F9-CNZ (LAS 10% ; C90 10%) et F12-CNZ (LAS 75% ; C90 10% ; TRA 15%). Les résultats sont présentés dans l'annexe IV. Durant la dispersion, la masse de cinnarizine dissoute avec la formulation contenant de la Maisine[®] 35-1 est équivalente à celles obtenues avec les formulations F9 et F12. Mais après 5 minutes de digestion, la libération d'acides oléiques par la Maisine[®] 35-1 entraîne une augmentation très franche de la solubilité de la cinnarizine dans la phase aqueuse. Puis la concentration décroît de façon régulière au cours des 60min du test, du fait de la faible stabilité des micelles. Cependant la dissolution de la cinnarizine reste supérieure en présence de Maisine[®] 35-1 par rapport aux formulations n'en contenant pas. Ces résultats montrent tout d'abord l'importance de mesurer la solubilité dans la phase micellaire digérée mais aussi de calculer le SR^M , afin de sélectionner les bons excipients et d'anticiper l'impact de la sursaturation.

D'autre part, en comparant l'ensemble des résultats entre les formulations contenant ou non du Transcutol[®] HP, ce solvant hydrophile ne semble pas, dans les proportions utilisées, apporter d'amélioration significative sur le maintien en solution après la dispersion (résultats similaires entre F85 - IBU et G48/16 - IBU). S'il ne participe pas à la formation des micelles, son fort pouvoir solvant est cependant indispensable à la dissolution de la substance active dans la formulation. Il doit donc être conservé notamment en vue de charger la dose thérapeutique dans une quantité plus faible de formulation. En effet l'un des objectifs des prochains travaux sera de dissoudre la dose thérapeutique d'une substance active faiblement soluble dans l'eau, dans 600mg de formulation, pouvant alors être chargée dans une seule gélule taille 0.

Par ailleurs, il est intéressant de comparer les performances des formulations en fonction de leurs pourcentages de saturation, afin d'évaluer l'influence de ce paramètre sur le maintien en solution des APIs et donc son importance au cours du développement de LBFs. Pour les

formulations contenant du piroxicam, le Labrasol[®] ALF est chargé à 67% de la saturation alors que le Kolliphor[®] RH40 est chargé à 35%. Cependant leurs performances sont similaires. Inversement le Gélucire[®] 48/16 et le Tween[®] 80 sont chargés respectivement à 50 et 54% de la saturation mais le Gélucire[®] 48/16 montre des performances supérieures au Tween[®] 80 ($8,1 \pm 0,7$ mg de piroxicam dissous par le Gélucire[®] 48/16 à t60 contre $6,5 \pm 0,3$ mg par le Tween[®] 80 ; figure 11). De plus pour les formulations contenant de l'ibuprofène, F87 (T80 94% - TRA 6%) est chargée à 75% de la saturation et présente des performances égales ou supérieures à F5 (LAS 90% - C90 10%) et F80 (LAS 94% - TRA 6%) qui ne sont chargées qu'à 55% et 61% de la saturation (figure 13).

Ainsi, bien qu'il soit nécessaire de pré-dissoudre les APIs dans les LBFs, la valeur de solubilité dans les excipients seuls ou dans les formulations ne semble pas être le seul paramètre à suivre pour le choix des formulations. En effet, une bonne solubilité dans la formulation ne prédit pas un bon maintien en solution au cours du test de digestion *in vitro*.

Conjointement à l'analyse des résultats portant sur la solubilité, ce travail s'intéresse aussi au comportement des formulations lors de leur dispersion.

L'aspect des formulations dispersées et la taille de particules formées sont des paramètres classiquement utilisés en développement galénique. Ces paramètres orientent généralement les formulateurs vers la sélection des formulations formant les particules les plus petites, donc plus stables, et d'aspect limpide ou opalescent. C'est le cas pour la formulation G48/16 - PIRO dans la dispersion homogène, limpide et formant des micelles inférieures à 5nm, est liée à un très bon maintien du piroxicam en solution au cours du test de digestion.

Cependant cette étude porte aussi l'attention vers les formulations contenant du Labrasol[®] ALF, qui forment des émulsions blanchâtres avec des tailles de gouttelettes entre 150 et 400nm (figure 6 ; figure 16). En effet ce SMEDDS permet une dissolution très rapide et maintenue dans le temps (figure 11, formulation LAS - PIRO).



Figure 16 : Photographie comparative des formulations dispersées sans substance active

A gauche : F80 (LAS 94% - TRA6%) ; à droite : F85 (G48/16 94% - TRA 6%)

Après le test de dispersion dans l'eau (60 rpm, 30 min, 37°C)

Par ailleurs, lors des tests de dispersion, les formulations RH40 - PIRO, T80 - PIRO et F87 - IBU (T80 94% - TRA 6% + IBU) montrent une précipitation de l'API (tableau X). Cela peut expliquer la plus faible dissolution du piroxicam par le Tween[®] 80 lors du test de digestion *in vitro* (figure 11, T80 - PIRO), mais n'est pas corrélé à la bonne dissolution obtenue par la formulation F87 - IBU (figure 13). Ainsi la génération d'un précipité lors du test de dispersion, tel qu'il est décrit par Cuiné [16], ne permet pas de sélectionner des formulations d'intérêt, capables de maintenir en solution les APIs au cours du test de digestion. Les observations et mesures réalisées au cours de test de dispersion ne permettent donc pas de mettre en avant des paramètres prédictifs des performances des LBFs.

Cependant, ces résultats doivent être analysés en prenant en compte le fait que les formulations sont chargées à 80% de la saturation pour le test de dispersion, alors que ce pourcentage est plus faible pour le test de lipolyse où la quantité d'API utilisée est équivalente à la dose thérapeutique dans 1mL (75% pour F87 - IBU, 50% pour T80 - PIRO, 35% RH40 - PIRO). Cette concentration saturante constante entre les formulations a été choisie afin de comparer des formulations ayant la même activité thermodynamique. Des études complémentaires, avec des conditions comparables à celles utilisées dans le test de digestion, sont donc nécessaires afin de vérifier si ce test de dispersion permet de différencier les formulations. De plus, dans le cas d'APIs acides, il est important de tester la dispersion des formulations dans le SGF afin de vérifier la capacité de la formulation à maintenir dissous l'API dans un milieu présentant un pH inférieur au pKa.

Suite aux étapes de formulations, les résultats obtenus au cours de la phase d'évaluation par le test de digestion *in vitro* sont discutés.

Tout d'abord, le Labrasol[®] ALF qui contient des acides gras à chaînes moyennes, est plus digéré que le Kolliphor[®] RH 40 ou le Tween[®] 80, composés d'acides gras à longues chaînes. De plus, mise à part le fait qu'une partie lipidique peut être un noyau de concentration des APIs BCS II, le maintien de la solubilité du piroxicam au cours de la digestion est similaire entre le Labrasol[®] ALF (type IIIB) et le Kolliphor[®] RH 40 (type IV) ou entre les formulations F5 ou F80 (type IIIB) et F87 (type IV) pour l'ibuprofène. La digestibilité des excipients, évaluée par la mesure du volume de NaOH ajouté au cours du test de digestion, n'apparaît donc pas comme un paramètre déterminant dans l'évaluation des performances des LBFs. Il n'est pas possible non plus, de montrer une influence du type de LBFs (IIIB ou IV) ou du type de tensioactif utilisé, sur la solubilité au cours de la lipolyse.

D'autre part, les résultats permettent d'évaluer les capacités de Gélucire[®] 48/16 par rapport aux autres tensioactifs solubles dans l'eau sélectionnés. Le G48/16 montre des performances supérieures pour dissoudre le piroxicam, en particulier par rapport au Tween[®] 80 mais aussi au Kolliphor[®] RH 40 (figure 11). Ces résultats sont d'autant plus probants que les tensioactifs sont utilisés sans excipients associés. Pour les formulations développées avec l'ibuprofène, le G48/16 apparaît légèrement moins efficace que le Tween[®] 80. Cependant les écarts types pour ce dernier comprennent les valeurs obtenues avec le G48/16. La discussion des résultats obtenus avec l'ibuprofène doit aussi tenir compte du fait qu'il s'agit d'un API classé BCS II mais aussi DCS I [5]. Ainsi ces résultats sont utiles à la comparaison des performances des différentes formulations, mais doivent être complétés pour mettre en avant l'efficacité de ces

LBFs. C'est pourquoi d'autres substances actives modèles, comme le fénofibrate, sont en cours de développement à la suite de ce travail. Cependant, sur l'ensemble des tests effectués, il est possible d'affirmer que le G48/16 présente des performances supérieures ou égales à ses concurrents commerciaux. De plus les caractéristiques physiques du G48/16 lui apportent un avantage significatif dans les champs d'applications possibles. En effet, le fait qu'il soit solide à température ambiante, rend possible sa commercialisation sous forme de pastille. En plus de faciliter son utilisation par rapport au Tween[®] 80 et au Kolliphor[®] RH 40, il pourrait entrer dans le développement de formes solides sèches. Cette application reste à être développée par la société Gattefossé.

Les résultats des tests de digestion des formulations contenant de la cinnarizine ou de l'ibuprofène mettent aussi en avant une corrélation entre les valeurs des SR^M et les performances des formulations durant le test de digestion *in vitro*. Les SR^M très supérieurs à 3 pour les formulations avec la cinnarizine, sont corrélés à une faible capacité à maintenir l'API en solution. Les SR^M calculés inférieurs ou égaux à 3 pour les formulations avec l'ibuprofène sont corrélés à un bon maintien de la solubilité de l'API au cours du test de digestion. Par ailleurs, la formulation F87 - IBU est celle présentant un SR^M le plus faible et montre la meilleure capacité solvante après 60 minutes de digestion. Mais les formulations F85 - IBU et G48/16 - IBU montrent des solubilités à t60 égales, alors qu'elles ont des SR^M respectifs de 3,1 et 2,8 (tableau XII). Ainsi le SR^M ne semble pas permettre de prédire et classer les performances de 2 formulations ayant de bonnes capacités de dissolution. En revanche ces résultats confirment très clairement la valeur seuil du SR^M de 3, au-dessus de laquelle la pression de sursaturation, appliquée par la digestion sur la formulation, est trop importante pour permettre un maintien en solution de la substance active. Ainsi avec le seul calcul du SR^M , il aurait été possible de déterminer que les formulations destinées à dissoudre l'ibuprofène sont assez bien adaptées, alors que celles contenant de la cinnarizine ne permettent pas une bonne dissolution. Le SR^M apparaît donc comme un paramètre prédictif de la capacité solvante des formulations au cours du test de digestion *in vitro*. Il pourra dorénavant être utilisé pour optimiser la sélection des systèmes lipidiques d'intérêt.

L'étude menée lors de ce travail démontre aussi une bonne répétabilité du test de digestion *in vitro* tel qu'il est décrit par le LFCS. En effet chaque test ayant été répété 3 fois, les écarts types mesurés restent faibles, en particulier au cours des 60 minutes de la phase de digestion. Les plus grandes variations observées au cours de la phase de dispersion sont inhérentes aux contacts entre le module d'agitation et les gélules pouvant modifier leur vitesse de rupture. Ainsi, le test de digestion *in vitro* du LFCS associé au calcul du SR^M est une étape pouvant être systématisée pour le développement galénique des systèmes lipidiques.

VIII. CONCLUSION

Par la formulation et l'évaluation de systèmes lipidiques de type III et IV selon les dernières recommandations du consortium LFCS, cette étude permet d'apporter des données nécessaires pour finaliser le développement d'un nouveau tensioactif : le Gélucire® 48/16.

Les études menées permettent en effet de répondre aux différents objectifs de ce travail. Tout d'abord, la mise en place d'un protocole de formulation conforme aux recommandations du LFCS, a permis de développer des systèmes lipidiques capables de maintenir en solution, au cours du test de digestion *in vitro*, 2 substances actives peu solubles dans l'eau : le piroxicam et l'ibuprofène. Le développement de LBFs permettant le maintien en solution de la cinnarizine est en court.

Ces résultats permettent de définir les LBFs de type III et IV comme les plus aptes pour résoudre la faible solubilité des APIs classés BCS II. L'association d'un tensioactif hydrosoluble avec un solvant hydrophile et éventuellement une proportion d'huile permettant de dissoudre une plus grande quantité d'API dans la formulation, est donc une solution intéressante pour les phases de développement galénique.

Dans ce cadre, le Gélucire® 48/16, en tant que tensioactif soluble dans l'eau ne contenant pas de partie glycéridique, est particulièrement adapté aux formulations de type IV. Il présente en effet des capacités solvantes, selon les substances actives, équivalentes ou meilleures que les excipients concurrents. De plus, sa capacité à être commercialisé sous forme solide est un avantage déterminant qu'il sera nécessaire de développer.

D'autre part, ce travail s'est focalisé autour de paramètres permettant de sélectionner les formulations les plus adaptées au maintien de la dissolution des substances actives faiblement solubles dans l'eau. Ainsi, la solubilité de l'API dans les excipients ou dans la formulation, l'aspect de la dispersion, la taille de gouttelettes d'émulsion ou la formation d'un précipité lors de la dispersion, ne ressortent pas comme étant des critères suffisamment discriminants. A l'inverse, elle met en évidence l'importance du rapport de sursaturation maximale (SR^M) pour prédire la capacité solvante des formulations au cours du test de digestion *in vitro*. Il est alors intéressant de poursuivre ce travail avec d'autres substances actives, notamment avec des log P supérieurs à 6.

L'ensemble de cette étude s'intègre dans le cadre du développement de formulations rendant les substances actives biodisponibles, appelées « enabling formulations ». Une revue publiée en avril 2013 [10] fait un état des connaissances actuelles et met en avant l'importance de l'impact des tensioactifs sur la perméation intestinale, le manque de données nécessaires à la compréhension des mécanismes de passage des APIs de l'état dissous dans le milieu intestinal vers le milieu intracellulaire, ainsi que l'importance de l'état de sursaturation sur l'augmentation de la biodisponibilité. A plus long terme, il serait donc intéressant de déterminer si le SR^M est une valeur prédictive, non seulement de la dissolution *in vitro*, mais aussi de la biodisponibilité *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

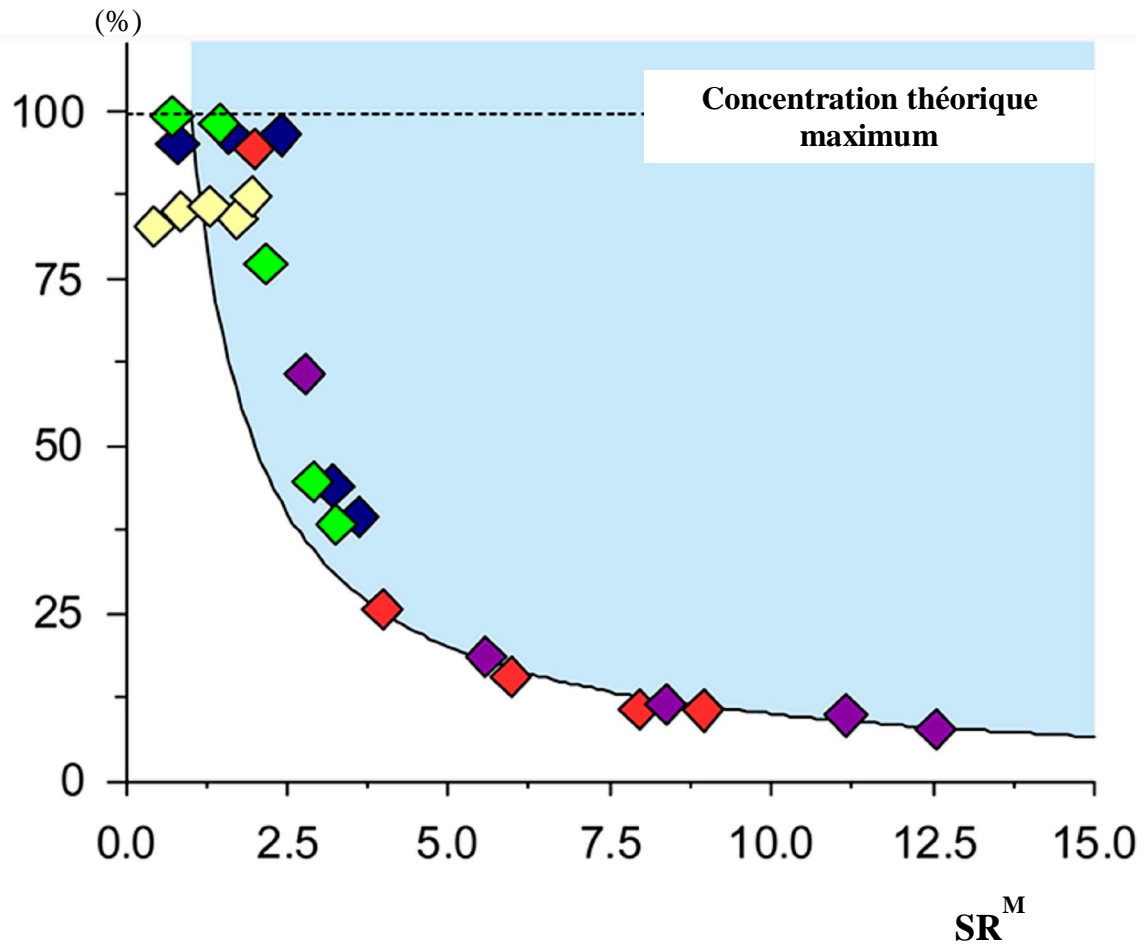
- [1] G. L. Amidon, H. Lennernas, V. P. Shah, and J. R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharmaceutical Research*, 12 (1995) 413-420.
- [2] Guideline on the investigation of bioequivalence, [en ligne], http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf, consulté le 25 juillet 2013.
- [3] Guidance for Industry Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, [en ligne], <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070246.pdf>, consulté le 25 juillet 2013.
- [4] L. Z. Benet, The role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102 (2013) 34-42.
- [5] J. M. Butler, J. B. Dressman, The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99 (2010) 4940-4954.
- [6] C. A. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *Journal of Pharmacological Toxicological Methods*, 44 (2000) 235-249.
- [7] Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, and S. Onoue, Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications, *International Journal of Pharmaceutics*, 420 (2011) 1-10.
- [8] A. J. Humberstone, W. N. Charman, Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 25 (1997) 103-128
- [9] H. D. Williams, P. Sassene, K. Kleberg, M. Calderone, A. Igonin, E. Jule, J. Vertommen, R. Blundell, H. Benameur, A. Müllertz, C. W. Pouton, C. J. H. Porter, on behalf of the LFCS Consortium, Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 3: understanding supersaturation versus precipitation potential during the in vitro digestion of type I, II, IIIA, IIIB and IV lipid-based formulations, *Pharmaceutical Research*, (2013).
- [10] S. T. Buckley, K. J. Frank, G. Fricker, and M. Brandl, Biopharmaceutical classification of poorly soluble drugs with respect to "enabling formulations", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2013).
- [11] C. W. Pouton, Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29 (2006) 278-287.

- [12] The LFCS Consortium: Developing standardized tests and performance criteria for lipid formulations, Our objectifs, [en ligne], <http://www.lfcsconsortium.org/objectives.aspx>, consulté le 6 août 2013.
- [13] H. D. Williams, P. Sassene, K. Kleberg, J. C. Bakala-N'Goma, M. Calderone, V. Jannin, A. Igonin, A. Partheil, D. Marchaud, E. Jule, J. Vertommen, M. Maio, R. Blundell, H. Benameur, F. Carriere, A. Mullertz, C. J. Porter, and C. W. Pouton, Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 1: method parameterization and comparison of in vitro digestion profiles across a range of representative formulations, *J. Pharm. Sci.*, 101 (2012) 3360-3380.
- [14] H. D. Williams, M. U. Anby, P. Sassene, K. Kleberg, J. C. Bakala-N'Goma, M. Calderone, V. Jannin, A. Igonin, A. Partheil, D. Marchaud, E. Jule, J. Vertommen, M. Maio, R. Blundell, H. Benameur, F. Carriere, A. Mullertz, C. W. Pouton, and C. J. Porter, Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations. 2. The effect of bile salt concentration and drug loading on the performance of type I, II, IIIA, IIIB, and IV formulations during in vitro digestion, *Mol Pharm*, 9 (2012) 3286-3300.
- [15] J. Brouwers, M. E. Brewster, and P. Augustijns, Supersaturating drug delivery systems: The answer to solubility limited oral bioavailability?, *J. Pharm. Sci.*, 98 (2009) 2549-2572.
- [16] J. F. Cuine, C. L. McEvoy, W. N. Charman, C. W. Pouton, G. A. Edwards, H. Benameur, and C. J. Porter, Evaluation of the impact of surfactant digestion on the bioavailability of danazol after oral administration of lipidic self-emulsifying formulations to dogs, *J. Pharm. Sci.*, 97 (2008) 995-1012.
- [17] A. T. Larsen, A. G. Ohlsson, B. Polentarutti, R. A. Barker, A. R. Phillips, R. Abu-Rmaileh, P. A. Dickinson, B. Abrahamsson, J. Ostergaard, and A. Mullertz, Oral bioavailability of cinnarizine in dogs: relation to SNEDDS droplet size, drug solubility and in vitro precipitation, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 48 (2013) 339-350.
- [18] Chemical Book, ibuprofen, [en ligne], http://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=ibuprofen, consulté le 19 août 2013.
- [19] Chemical Book, cinnarizine, [en ligne], http://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=cinnarizine, consulté le 19 août 2013.
- [20] Chemical Book, piroxicam, [en ligne], http://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=piroxicam, consulté le 19 août 2013.
- [21] USP 35 - NF 30 *Pharmacopeia*, 2012.

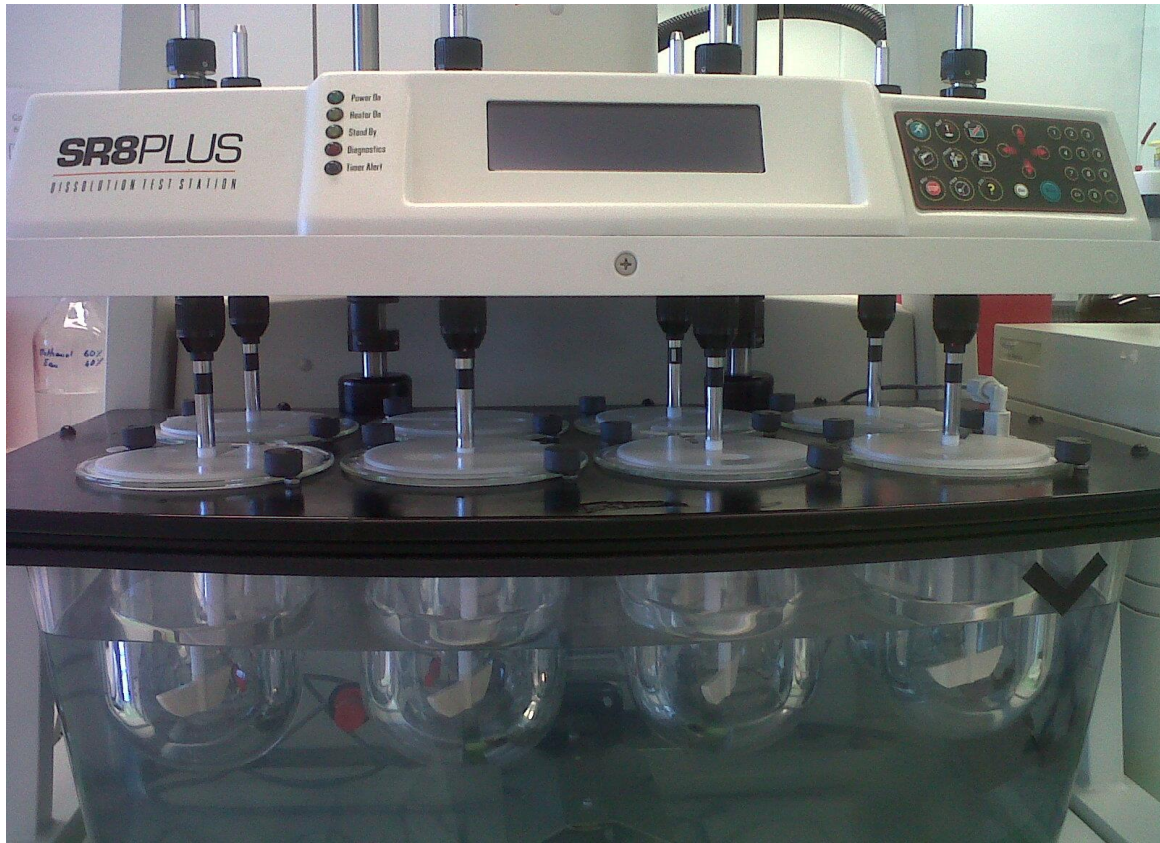
ANNEXES

Annexe I : Détermination de la valeur seuil du $SR^M > 2,5$ [14]

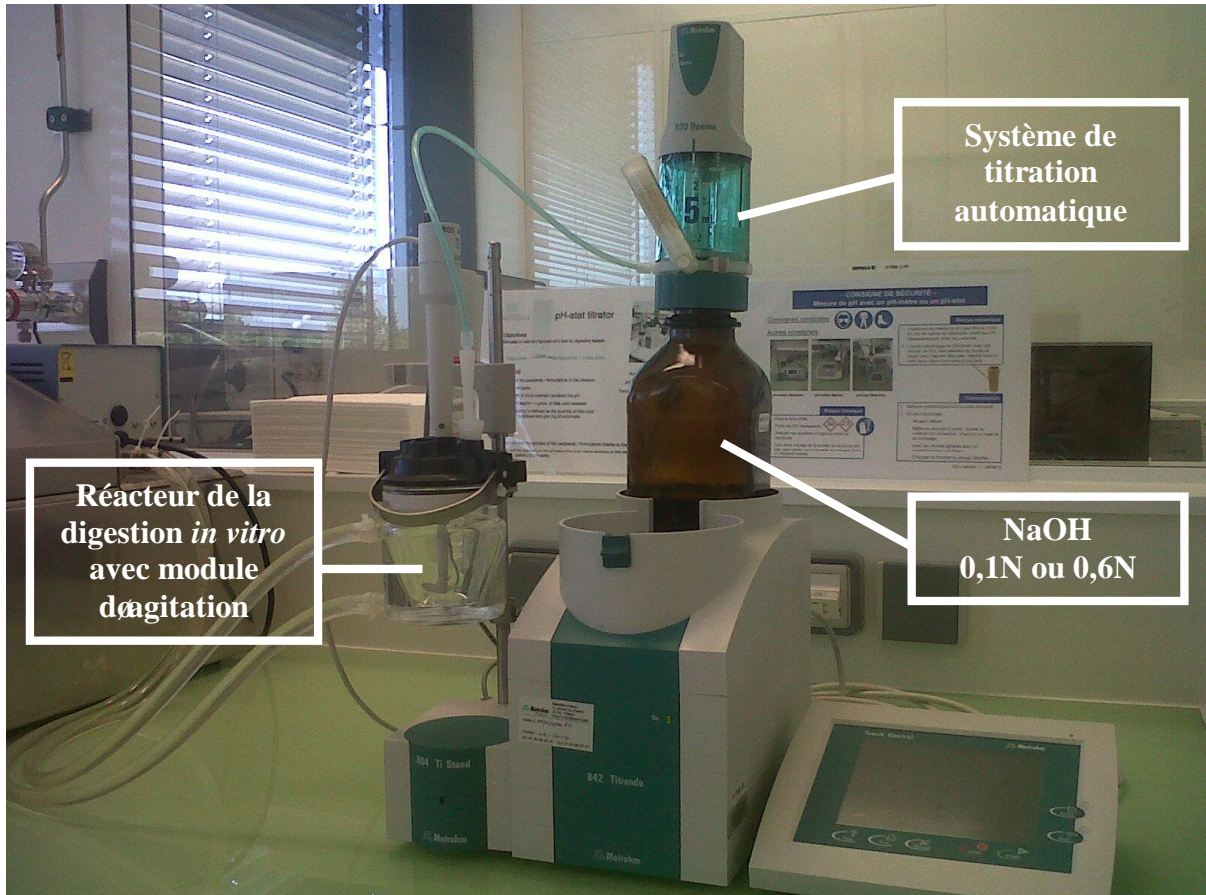
Danazol dissous dans la
phase colloïdale digérée

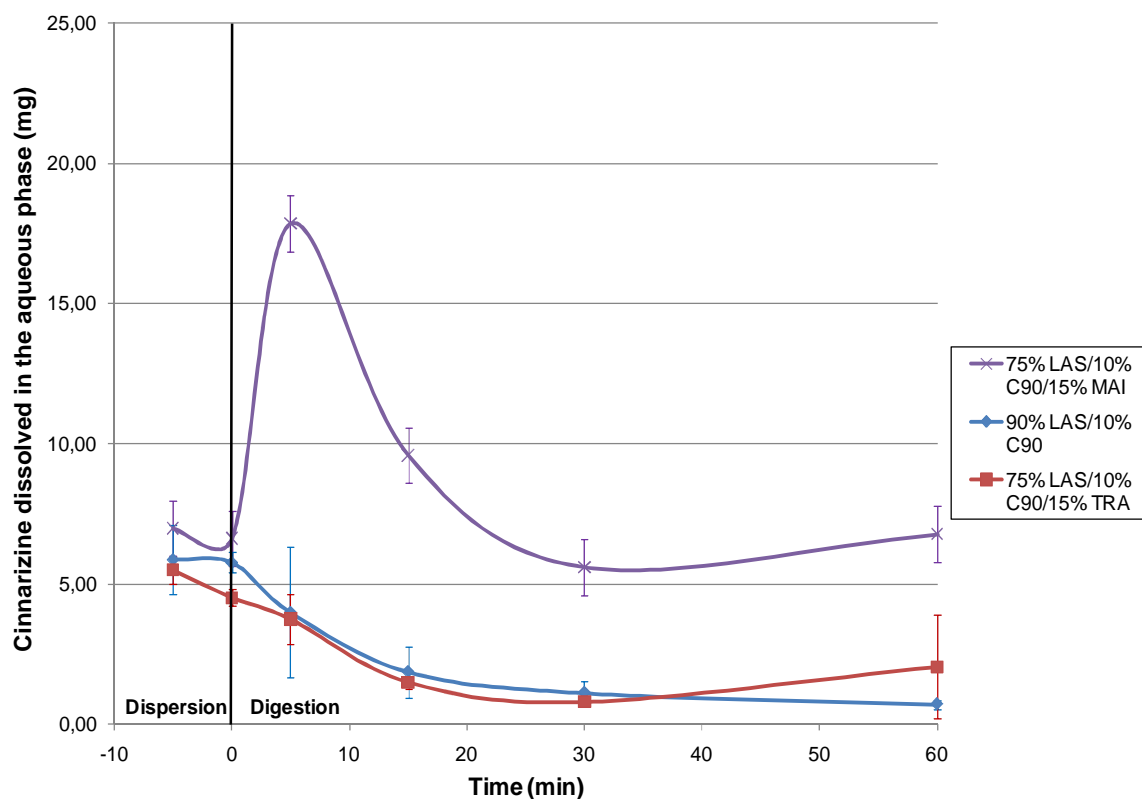


Annexe II : Appareil de dissolution type USP II (Hanson Research, SR8 Plus)



Annexe III : Appareil pH-Stat Titrando 842 (Metrohm)



Annexe IV : Test de digestion *in vitro* de formulations chargée de cinnarizine, avec ou sans Maisine[†] 35-1

Légende : en abscisses : le temps en minutes ; en ordonnées : masse de cinnarizine dissoute dans la phase aqueuse en milligrammes.