



**HAL**  
open science

# Intérêt de la réduction de taille des principes actifs peu hydrosolubles : étude bibliographique et expérimentale

Xinyan Li

► **To cite this version:**

Xinyan Li. Intérêt de la réduction de taille des principes actifs peu hydrosolubles : étude bibliographique et expérimentale. Sciences pharmaceutiques. 2014. hal-01732106

**HAL Id: hal-01732106**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732106>**

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE**

**2014**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**Intérêt de la réduction de taille des principes actifs  
peu hydrosolubles : étude bibliographique et  
expérimentale**

THESE

pour obtenir

**Le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

Présentée et soutenue publiquement le 05 septembre 2014 par

Xinyan LI

née le 04 décembre 1986 à Xi'an (Chine)

Président & directeur: M. Philippe MAINCENT, Professeur de Pharmacie Galénique, Faculté de pharmacie de Nancy

Juges : M. Eric SCHENKEL, Directeur de Preformulation & Non Clinical Formulation, Laboratoire UCB

Mme Anne SAPIN-MINET, Maître de conférences, Faculté de pharmacie de Nancy

Mme Ariane BOUDIER, Maître de conférences, Faculté de pharmacie de Nancy

M. Thibault ROQUES-CARMES, Maître de conférences, École nationale supérieure des industries chimiques

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année universitaire 2013-2014**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Président de la Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Président de la Commission Prospective Facultaire**

Jean-Yves JOUZEAU

**Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable ERASMUS :**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la filière Officine :**

Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement**

Jean-Michel SIMON

**Pharmaceutique Hospitalier :**

**Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :**

Raphaël DUVAL

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIBST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

**Faculté de Pharmacie**

**Présentation**

<b>ENSEIGNANTS</b>	<b>Section CNU*</b>	<b>Discipline d'enseignement</b>
<b>PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS</b>		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
<b>PROFESSEURS DES UNIVERSITES</b>		
Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI ✕	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND ✕	87	Environnement et Santé
Pierre LABRUDE (retraite 01-11-13)	86	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire
<b>MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS</b>		
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique

**Faculté de Pharmacie**

**Présentation**

***ENSEIGNANTS (suite)***

Section  
CNU'

Discipline d'enseignement

Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

***PROFESSEUR ASSOCIE***

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

**PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD

11      *Anglais*

⌘ *En attente de nomination*

*\*Disciplines du Conseil National des Universités :*

*80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

*81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

*82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

*85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

*86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

*87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

*32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle*

*11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes*

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX  
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES  
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES  
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

## REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à remercier **Pr Philippe Maincent** de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être président et directeur de jury de thèse. Je le remercie pour ses remarques et ses critiques pertinentes, pour son écoute et sa gentillesse au cours de mes études de pharmacie.

Je voudrais remercier **Eric Schenkel**, directeur de service de Preformulation & Non Clinical Formulation de UCB, de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir accordé son temps et sa patience à mes questions.

Je remercie vivement **Mme Anne Sapin-Minet**, mon premier maître de stage de stage en recherche, qui m'a initié à la formulation galénique avec la rigueur, la patience et la tendresse. Je suis reconnaissante pour sa gentillesse et son accompagnement durant et après ce stage.

Je remercie également **Mme Ariane Boudier** et **M. Thibault Roques-Carmes** d'avoir la gentillesse de m'accorder du temps pour participer à mon jury de thèse.

Je remercie de tout mon cœur mon maître de stage, **M. Pascal Somville**, pour toutes les expériences qu'il m'a généreusement transmises, pour tout le temps supplémentaire en dehors des heures de travail qu'il a consacré à mon sujet, pour tous ces échanges de la philosophie de la vie qui dépassent le cadre d'une simple formation scientifique.

Je tiens à remercier sincèrement tous les collègues d'équipe de Preformulation & Non Clinical Formulation pour leur sympathie et leur aide tout au long du stage. Il s'agit d'une expérience très enrichissante professionnellement et humainement qui a laissé l'empreinte dans mon esprit et mes actes. L'optimisme que j'ai appris avec vous m'aidera à traverser les tempêtes qui auront lieu sans doute sur mon parcours. Merci **Rosana, Ludovic, Florence** (flochi & flopi).

Je remercie ma grande amie fidèle **Mei**, sans toi je ne serais venue en France et mon destin ne serait jamais le même. Merci d'avoir partagé pendant ces années mes bonheurs ainsi que mes malheurs. Aimes un jour, amies toujours.

Aucun mot dans le dictionnaire ne manifeste suffisamment ma gratitude envers mes parents. L'amour le plus profond au monde est de laisser son cœur partir à son contrecœur en lui souhaitant du bonheur de tout son cœur. Merci maman, pour ta compréhension, ta confiance, et les deux vies que tu m'as donné. Merci papa, pour ton soutien, pour toutes les connaissances que tu m'as enseigné.

致我最亲爱的父母，千言万语也无法表达我的感恩之心：养育之恩，支持之恩，信任之恩 ..... 恩重如山。

至家人，友人，感谢你们的陪伴和你们的爱护。

至爷爷，奶奶，姥爷，二姑，仅以此文献给你们，希望你们在天之灵为我感到欣慰。

# Table des matières

Table des figures .....	5
Table des tableaux.....	8
Introduction .....	9
I. Revue bibliographique .....	12
I.1 La dissolution des principes actifs .....	12
I.2 Méthodes pour augmenter la solubilité .....	13
I.3 Nanosuspensions .....	16
I.3.1 Définition de nanosuspensions.....	16
I.3.2 Propriétés des nanosuspensions .....	16
I.3.3 Comparaison des nanosuspensions par rapport aux autres formulations destinées à améliorer la solubilité.....	19
I.4 Méthodes de fabrication de nanosuspensions .....	22
I.4.1 Approche « Bottom Up ».....	22
I.4.2 Approche « Top Down » .....	26
I.4.2.1 Méthode de broyage .....	26
I.4.2.2 Méthode d'homogénéisation à haute pression (HHP).....	30
I.5 Phénomènes impliqués dans la croissance des particules dans les nanosuspensions	32
I.5.1 Agglomération irréversible.....	32
I.5.2 Croissance des cristaux.....	33
I.5.3 Phénomène de mûrissement d'Ostwald.....	34
I.6 Stabilisants des nanosuspensions.....	36
I.6.1 Stabilisants ioniques.....	36
I.6.2 Stabilisants stériques.....	36
I.6.3 Revue des stabilisants des nanosuspensions .....	37

I.7	Comportement in vitro & in vivo des nanosuspensions.....	40
I.8	Exemples de nanosuspensions commercialisées .....	42
I.9	Conclusion .....	46
<b>II.</b>	<b>Partie expérimentale.....</b>	<b>47</b>
II.1	Matériels et méthodes.....	47
II.1.1	Matériels.....	47
II.1.1.1	Molécules testées.....	47
II.1.1.2	Stabilisants .....	48
II.1.2	Solvant .....	49
II.1.3	Produit anti- mousse .....	49
II.2	Equipements de fabrication .....	50
II.2.1.1	Billes et chambre de broyage :.....	51
II.2.1.2	Ultrasonicateur focalisé Covaris S220X : .....	52
II.3	Caractérisation et stabilité physique des nanosuspensions .....	53
II.3.1	Mesure de taille .....	53
II.3.2	Dosage indirect par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) après filtration.....	55
II.3.3	Mesure de potentiel zêta .....	55
II.3.4	Mesure de la viscosité .....	56
II.3.5	Vérification de la forme cristalline de la substance après le processus .....	56
II.3.5.1	Observation microscopique : .....	57
II.4	Méthode de fabrication de nanosuspensions.....	57
II.4.1.1	Broyage humide (Wet milling) .....	57
II.4.1.2	Solubilisation – reprécipitation - réduction de taille par ultrason.....	57
<b>III.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>58</b>
III.1	Résultats de procédé de « Top Down » par broyage.....	58
III.1.1	Effets de stabilisants.....	58
III.1.2	Choix de billes de broyage et de rapport vitesse / fréquence de broyeur .....	59
III.1.3	Cinétique de réduction de taille du composé A par broyeur à vibrations.....	60

III.1.4	Essais avec ou sans l'ajout de produit anti mousse .....	60
III.1.5	Cinétique de réduction de taille du composé A par broyeur planétaire .....	62
III.1.6	Essais de stabilité .....	63
III.1.7	Essais sur d'autres composés .....	64
III.1.8	Comparaison des résultats obtenus par les 2 types de broyage.....	69
III.2	Résultats de procédé « Bottom Up » avec ultrasons.....	71
III.2.1	Screening des paramètres de l'appareil ultrasons Covaris® .....	71
III.2.2	Etude cinétique de réduction de taille par ultrasonication .....	72
III.2.3	Evaluation de la corrélation entre le volume de l'échantillon et la durée de sonication .....	72
III.2.4	Essais de stabilité .....	76
III.2.5	Essais sur d'autres composés .....	77
III.3	Diffraction par rayon X .....	79
III.4	Potentiel zéta .....	81
IV.	Conclusion partie expérimentale .....	81
	Conclusion .....	83
	Bibliographie .....	85
	Annexe .....	93

## **Liste des abréviations :**

AFA : Adaptative Focused Acoustics  
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché  
BCS : Biopharmaceutical Classification System  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DSC : Differential Scanning Calorimetry  
EMA : European Medicines Agency  
FDA : Food and Drug Administration  
HPH : Homogénéisation sous Haute Pression  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
HPMC : HydroxyPropylMéthyl Cellulose  
IV : Intra-veineuse  
LD : Diffraction Laser  
NCE : New Chemical Entity  
PCS : Spectroscopie Corrélation de Photon  
PA : Principe Actif  
PK : Pharmacokinetics  
PD : Pharmacodynamics  
PDI : Polydispersity Index  
R&D : Recherche et Développement  
SDS : Sodium dodecyl sulfate  
SEDDS : Self Emulsifying Drug Delivery System  
SMDDS : Self-microemulsifying drug delivery system  
XRPD : X-ray powder diffraction

## Table des figures

Figure 1: Système de la classification du biopharmaceutique (BSC) selon la solubilité aqueuse et la perméabilité du composé.....	9
Figure 2: Rôle de la concentration sur l'effet thérapeutique du médicament.....	10
Figure 3 : Mise à disposition d'un principe actif dans l'organisme .....	12
Figure 4 : Effet de la taille des particules sur la surface de contact (77).....	17
Figure 5 : Pression de dissolution selon la forme et le diamètre des particules (13) .....	18
Figure 6 : Augmentation de solubilité du BaSO <sub>4</sub> dans l'eau en fonction de la taille particulaire calculée selon l'équation de Kelvin .....	18
Figure 7 : Principe de fabrication d'une nanosuspension par la technique solubilisation-reprécipitation .....	22
Figure 8 : Différents types d'impact mécanique mis en jeu pendant le broyage.....	27
Figure 9 : Schéma simplifié du procédé de la technique NanoCrystal® .....	28
Figure 10 : Cristaux d'un médicament nanométrique. Clichés en microscopie électronique à balayage du posaconazole (peu hydrosoluble) avant (A) et après le broyage (B). Histogrammes de distribution correspondant aux clichés avant et après broyage (8) .....	29
Figure 11 : Schéma de l'homogénéisateur gap - piston (33).....	30
Figure 12 : Phénomène de cavitation rencontré dans l'homogénéisateur "gap-piston" (33) ....	31
Figure 13 : Effets des forces de Van Der Waals sur les nanoparticules avec transformation en agglomérats irréversibles .....	33
Figure 14 : Courbe de la fréquence de nucléation J en fonction de la sursaturation $\beta$ (93) .....	33
Figure 15 : Phénomène de croissance des cristaux (a) Nucléation (b) Croissance des cristaux (c) Rassemblement des cristaux irréguliers (d) Vue microscopique des bords de cristaux rassemblés à un cristal de taille plus grande .....	34
Figure 16 Phénomène de mûrissement d'Ostwald.....	35
Figure 17 : Polymères attachés à la surface des particules colloïdales pour former des couches répulsives .....	36
Figure 18 : Influence de taille particulaire sur la vitesse de dissolution d'une molécule candidate NVS-102 de Novartis.....	40
Figure 19 : Concentrations plasmatiques de 1,3-dicyclohexylurea (DCU) après administration par voie orale (59). .....	41

Figure 20 : Exemple de la diminution de l'interférence du repas par la forme nanonisée (MA-ES) du principe actif. A gauche, concentration plasmatique des 2 formes prises sans repas ; à droite, la concentration plasmatique des 2 formes prises avec repas (61).....	42
Figure 21 : Formule développée de l'indométhacine (65) .....	48
Figure 22 : Formule développée du mébendazole .....	48
Figure 23 : Vue extérieure et intérieure de broyeur planétaire Retsch PM 100 (92) .....	50
Figure 24 : Broyeur à vibrations Cryomill® (70) .....	51
Figure 25 : Photo A : de gauche à droite, bille de ZrO <sub>2</sub> de 1cm de diamètre, bille en acier inoxydable de 2mm de diamètre, bille en ZrO <sub>2</sub> de 0,5 mm de diamètre. Photo B : bille en ZrO <sub>2</sub> de 0,5 mm de diamètre (grossissement 100x) .....	51
Figure 26 : Différents types de conteneurs utilisés (en acier inoxydable ou revêtu d'agate) dans l'étude.....	52
Figure 27 : Appareil à ultrasons focalisés (Covaris S220X) .....	52
Figure 28 : Temps d'émission d'énergie acoustique t <sub>1</sub> et période de pulsion t <sub>2</sub> dans un cycle de pulsion acoustique .....	53
Figure 29 : Rayon hydrodynamique d'une particule par rapport à son diamètre réel .....	54
Figure 30 : Schéma du système AFA .....	58
Figure 31: Résultats de screening des groupes de stabilisants.....	59
Figure 32 : Résultat de la cinétique de réduction de taille et de la PDI par broyage à vibrations (n= 3 a été réalisé pour le point de 3 heures) .....	60
Figure 33 : Préparation d'une nanosuspension du composé A par le procédé de broyage à vibrations. Photo à gauche : préparation sans additif anti-moussant; à droite : préparation avec additif anti-moussant .....	61
Figure 34 : Résultat de la cinétique de réduction de taille de la distribution de taille (PDI) par broyage planétaire (n=3 pour le point de 3 heures).....	62
Figure 35 : Impact des cycles successifs de congélation-décongélation sur la taille des particules.....	63
Figure 36 : Impact des cycles successifs de congélation-décongélation sur la polydispersité de taille des particules .....	64
Figure 37 : Résultats de la réduction de la taille et de la PDI du mébendazole par le procédé de vibro broyage .....	65
Figure 38 : Résultats de la réduction de la taille et de la PDI de l'indométhacine par le procédé de vibro broyage.....	65
Figure 39 : Test de stabilité physique (taille & PDI) de la nanosuspension du composé B.....	66

Figure 40 : Clichés microscopiques (grossissement x630 )en lumière non polarisée. Photo A: indométhacine non réduit ; photo B : mébendazole non réduit; photo C : indométhacine réduit après 3h de broyage à vibration ; photo D : mébendazole après 3h de broyage à vibration ....	67
Figure 41 : Clichés microscopiques ( grossissement x630 ). Photo A: composé B non réduit ; photo B : composé A réduit après 3h de broyage à vibration (lumière non polarisée); photo C : composé B réduit après 3h de broyage à vibration (lumière polarisée) .....	68
Figure 42: Clichés microscopiques grossissement (x630), à lumière non polarisée. Photo A: composé A non réduit ; photo B : composé A réduit après 3h de broyage planétaire; photo C : composé A réduit après 3h de broyage à vibration .....	70
Figure 43: Screening des différents paramètres (PIP/DF/CB) de Covaris pour observer l'effet de l'énergie acoustique sur la taille des particules .....	71
Figure 44 : Cinétique de la réduction de taille par ultrasons .....	72
Figure 45 : Photos de gauche à droite : Suspension de A à l'état initial cristallin; Suspension amorphe obtenue par solubilisation-précipitation du composé A; 10ml de suspension après 90' de sonication .....	75
Figure 46 : Impact des cycles successifs de congélation-décongélation sur la polydispersité de taille des particules .....	77
Figure 47 : Formulation de composé B par l'approche Bottom Up. Photo A, 2minutes après la précipitation. Photo B, suspension de composé B après 60min de sonication. Photo C : suspension de composé C après 220 min de sonication. Photo D : croissance de cristaux pendant 60 min à température ambiante et sans sonication.....	78
Figure 48 : Résultats de diffraction par rayons X sur les 4 échantillons en comparaison avec l'hydrate du PA.....	80

## Table des tableaux

Tableau I : Différentes méthodes pour augmenter l'hydrosolubilité des composés.....	15
Tableau II : Comparaison des différentes formulations potentielles pour les principes actifs peu hydrosolubles (19) .....	21
Tableau III : Résumé des différentes techniques de « Bottom Up ».....	24
Tableau IV : Revue des systèmes de stabilisants des nanosuspensions cités dans la littérature .....	38
Tableau V : Médicaments commercialisés contenant des PA sous forme de nanocristaux .....	45
Tableau VI : Résultats de taille et PDI (mesurée à T0 et après 4 h de stockage à température ambiante) de la formulation du composé A avec ou sans produit anti-mousse.....	61
Tableau VII : Résultats de la taille et de la PDI des nanosuspensions du mébendazole et de l'indométhacine obtenus par le broyage à vibrations (t =3h) .....	66
Tableau VIII : Comparaison des 2 techniques de broyage pour la production de nanosuspension du composé A .....	69
Tableau IX : Potentiel zêta des nanosuspensions du composé A avec et sans additif anti-mousse .....	81

## Introduction

Depuis ces dernières années, de plus en plus de molécules-candidates sont issues du « criblage à haut débit » qui vise à augmenter le rendement de découvertes des nouvelles entités chimiques (NCEs). Cette méthode utilise le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme solvant pour les essais, donc les nouvelles molécules issues du test ont en général une masse moléculaire et un log P élevé ce qui contribue à diminuer la solubilité du composé étudié dans l'eau (1). D'après différents auteurs, le pourcentage des candidats faiblement solubles dans l'eau est de l'ordre de 60% - 75% (2) (3), et ces molécules appartiennent aux classes II (faible solubilité, perméabilité élevée) et IV (faible solubilité, faible perméabilité) selon le système de classification biopharmaceutique (BCS ou Biopharmaceutical Classification System) (4).

La classification BSC est présentée dans la figure ci-après.

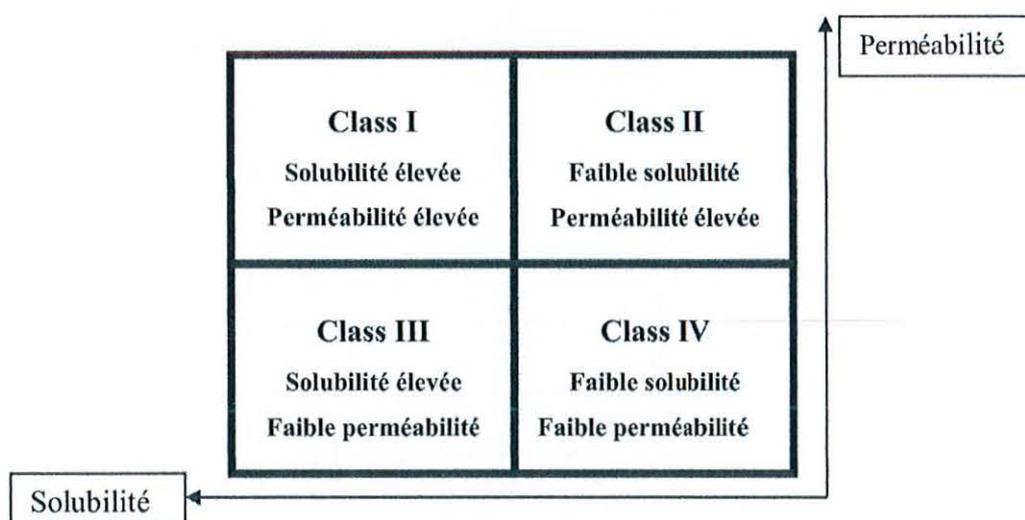


Figure 1: Système de la classification du biopharmaceutique (BSC) selon la solubilité aqueuse et la perméabilité du composé

A l'heure actuelle les laboratoires pharmaceutiques sont obligés de trouver des nouvelles pistes pour assurer leur croissance et leur bénéfice, nécessaire à leur développement, en raison de l'effet dit de ciseau, balance entre un profit en baisse à l'horizon pour l'ensemble du secteur (5) et le coût gigantesque de la recherche et du développement dans l'industrie pharmaceutique qui ne cesse de croître en affichant de plus de 800 M € en moyenne pour chaque NCE qui a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) (6).

Néanmoins, les processus de développement des nouveaux médicaments ne sont pas encore suffisamment efficaces, car pour chaque 5000 à 10000 molécules qui entrent dans les pipelines de Recherche & Développement (R&D), seulement environ 250 molécules ont réussi à entrer dans la phase d'étude préclinique, 5 molécules sont arrivées dans les essais cliniques et finalement une seule a obtenu l'AMM (7). On peut facilement conclure que la réussite des molécules-candidates est loin d'être satisfaisante.

La faible solubilité des NCEs est l'un des principaux obstacles dans la phase R&D car un composé faiblement dissout ne permet pas d'obtenir une exposition suffisante du médicament (cf. figure 2) dans les essais *in vivo*. C'est pourquoi l'effet réel thérapeutique des NCEs ne peut généralement pas être évalué. Par conséquent, une piste potentielle pour améliorer cette situation morose serait d'augmenter le taux d'introduction des NCEs en essais cliniques en leur assurant une exposition suffisante. En résolvant le problème de solubilité on pourrait ainsi espérer un gain important. Selon certains auteurs, même si 40% des composés dans la bibliothèque chimique sont faiblement hydrosolubles, grâce à des formulations galéniques appropriées, l'efficacité de découverte pourrait être améliorée de 67% (8).

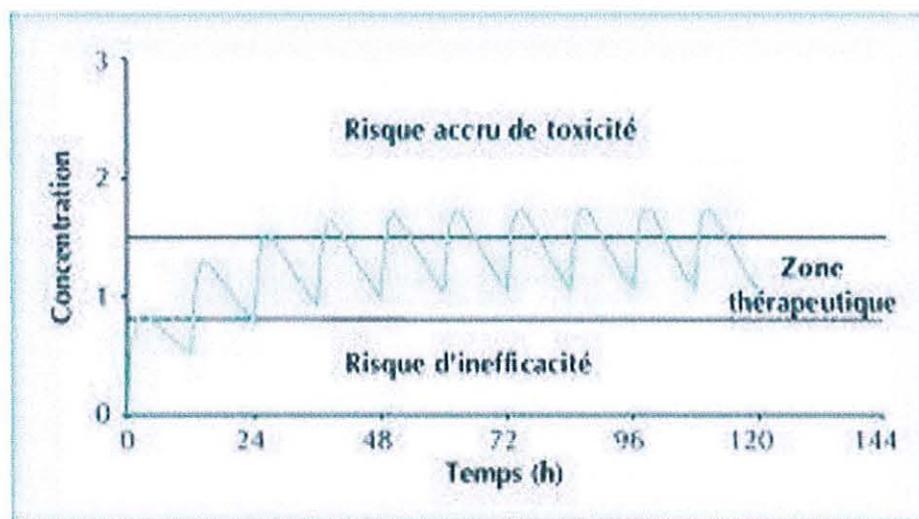


Figure 2: Rôle de la concentration sur l'effet thérapeutique du médicament

Depuis longtemps ce problème de solubilité a attiré l'attention des industriels ainsi que des chercheurs académiques. Suite à de longues années de travail, beaucoup d'approches sont actuellement disponibles afin d'augmenter la solubilité de ces molécules dont notamment les approches de fabrication de nanosuspensions.

La première partie de ce travail exposera les théories fondamentales qui permettent de comprendre le mécanisme à la base de l'augmentation de solubilité dans le cas des nanosuspensions, puis les principales techniques de fabrication seront décrites avec des exemples issus de la recherche ou de médicaments commercialisés.

Dans une seconde partie, nous aborderons le volet expérimental de notre travail : Dans un premier temps le contexte du projet sera présenté, puis les matériels et méthodes utilisés. Ensuite, les résultats expérimentaux obtenus lors de l'étude de différentes méthodes de fabrication de la nanosuspension seront abordés.

# I. Revue bibliographique

---

## I.1 La dissolution des principes actifs

Un principe actif (PA) doit être dissout avant de franchir les membranes biologiques (cf. figure 3) même s'il ne vise qu'à exercer une action locale. Si la dissolution est trop lente ou incomplète, la fraction disponible pour l'absorption sera beaucoup plus faible que la quantité administrée (9), donc il existe un risque important de ne pas obtenir une concentration suffisante dans la zone thérapeutique.



Figure 3 : Mise à disposition d'un principe actif dans l'organisme

Il est à noter que plusieurs facteurs interviennent sur les propriétés de la dissolution :

### a. Structure chimique du produit à dissoudre

Deux processus peuvent être mis en jeu ; qui sont :

- Solubilité par ionisation : la dissolution s'effectue par dissociation des molécules en ions, par exemple le chlorure de sodium (NaCl)
- Solubilité par polarité : les substances riches en groupements polaires (par exemple OH, COOH) sont surtout solubles dans les solvants polaires. Les substances riches en groupements apolaires (par exemple, CH<sub>3</sub>) sont solubles dans les solvants apolaires ou peu polaires.

### b. La température

Une augmentation de la température augmente la solubilité du produit dans la plupart des cas.

### c. La surface de contact.

La surface de contact, la vitesse de renouvellement du solvant à la surface du produit dissous et le temps de contact interviennent également positivement selon l'équation de Noyes-Whitney (10)

$$\frac{dm}{dt} = A \frac{D}{d} (C_s - C_b)$$

$\frac{dm}{dt}$  : taux de dissolution

m : masse de la matière dissoute

t : temps

A : surface de l'interface entre le solvant et la substance à dissoudre

D : coefficient de diffusion, qui est une caractéristique intrinsèque de la substance

d : épaisseur de la couche de solvant à la surface de la substance à dissoudre

C<sub>s</sub> : concentration de la substance à la surface

C<sub>b</sub> : concentration de la substance au sein du solvant

## 1.2 Méthodes pour augmenter la solubilité

L'obtention d'une solubilité aqueuse suffisante est difficile et fait objet de nombreuses études et recherches. Beaucoup de méthodes (résumées dans le tableau I) ont été développées dans les dernières années.

A un stade avancé de la phase de recherche, pour résoudre le problème de solubilité, la piste de la formulation galénique est privilégiée par rapport à des modifications de la structure chimique de la molécule en question (8). En effet, cette modification structurale du composé est d'une part plus coûteuse et d'autre part présente le risque de modifier les propriétés de la molécule avec le risque que les autorités compétentes exigent des industriels des données supplémentaires pour garantir la sécurité, l'efficacité et la qualité du médicament candidat (11) ; ceci entraîne non seulement une dépense supplémentaire mais aussi un retard dans l'obtention de l'AMM donc du temps de protection sous brevet perdu, voire même conduire à l'échec du projet.

Nous allons voir que la technique dite de nanosuspension permet de résoudre beaucoup de problèmes liés à cette faible solubilité aqueuse

Tableau I : Différentes méthodes pour augmenter l'hydrosolubilité des composés

Modification chimique	Modification du solvant	Ingénierie cristalline	Réduction de taille	Amorphisation	Système de transporteur	Formulation lipidique
Pro-drug	Co-solvant	Formation de co-cristaux	Micronisation	Système solide amorphe	Complexation avec cyclodextrine	Emulsion, micro-émulsion
Formation de sel	Ajustement du pH		Nanosuspension		Vecteur nanoparticulaire	SEDDS, SMEDDS
						Liposomes

## **I.3 Nanosuspensions**

Parmi les techniques d'augmentation de la solubilité, la micro/ nanonisation est une méthode presque universelle pour les molécules de classe II afin d'obtenir une dissolution plus rapide et une meilleure biodisponibilité

### **I.3.1 Définition de nanosuspensions**

Les nanosuspensions médicamenteuses sont des dispersions colloïdales sub-microniques de particules pures de principe actif (aussi appelés nanocristaux) qui sont stabilisées par un système de surfactants et /ou polymères (12). Le milieu de dispersion peut être l'eau, une solution aqueuse ou un milieu non aqueux (par exemple, huiles, Polyéthylène Glycol liquide) (13).

### **I.3.2 Propriétés des nanosuspensions**

#### **A. Augmentation de la vitesse de dissolution par l'accroissement de surface**

La diminution de taille des particules conduit à une augmentation de la surface de contact (cf. figure 4), et comme démontré par l'équation de Noyes-Whitney citée précédemment, ceci augmente la vitesse de dissolution (14) ; cet effet est très important lors que la taille descend au rang nanométrique. Dans la plupart des cas, une faible vitesse de dissolution est corrélée à une faible solubilité de saturation (13).

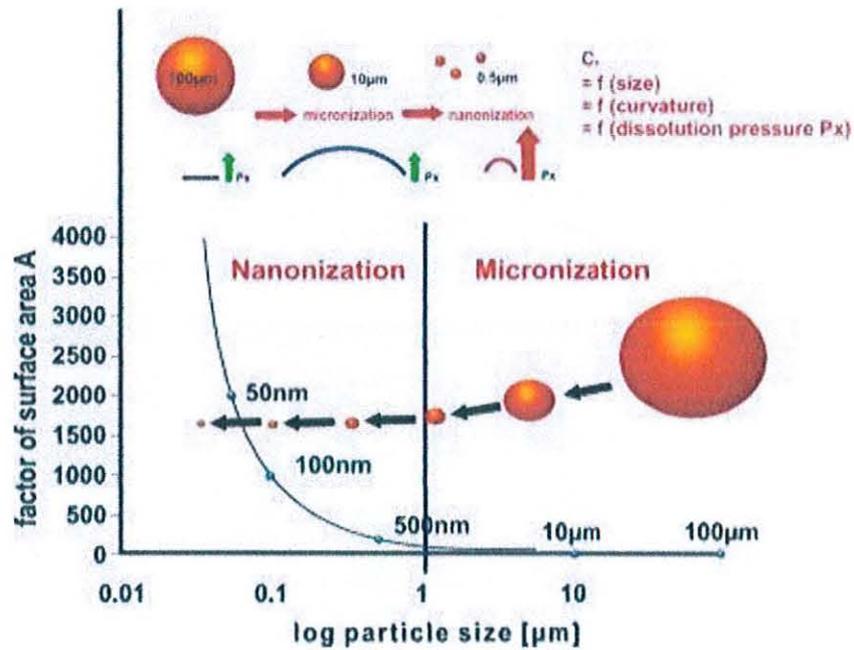


Figure 4 : Effet de la taille des particules sur la surface de contact (77)

#### B. Augmentation de la solubilité à saturation

La solubilité à saturation ( $C_s$ ) est considérée comme une constante dépendant du composé, du milieu de dissolution et de la température du milieu. Toutefois, la taille des particules n'intervient sur ce paramètre que quand elle descend en dessous de la taille critique de 1 – 2  $\mu\text{m}$ . Les nanocristaux ont une solubilité à saturation augmentée, comme théorisé par l'équation d'Ostwald-Freundlich (15) qui est la transposition de l'équation de Gibbs-Kelvin pour un mélange solide-liquide (16).

Equation d'Ostwald-Freundlich :

$$\text{Log} (C_s/C_\alpha) = 2\delta V/2,303 RT \rho r$$

$C_s$  : concentration à saturation

$C_\alpha$  : solubilité des particules constituants

$\delta$  : tension interfaciale de la substance

$V$  : volume molaire de la substance

$R$  : constant de gaz

$T$  : température absolue

$\rho$  : densité du solide

$r$  : radius (diamètre)

Le transfert de molécules entre la phase solide (nanoparticules) et la phase liquide (milieu de dispersion) a le même principe que dans le transfert depuis la phase liquide vers la phase gazeuse: d'après l'équation de Kelvin, la pression de vapeur d'une goutte de liquide dans la phase gazeuse augmente avec la croissance de la courbure de surface donc avec une diminution de taille particulaire. Dans ces conditions, la pression de vapeur est équivalente à la pression de dissolution. Dans le cas d'une solution saturée, il y a équilibre entre la dissolution et la recristallisation, et cet équilibre pourrait être déplacé s'il y a augmentation de la pression de dissolution (cf. figure 5), donc par conséquent une solubilité à saturation plus importante.

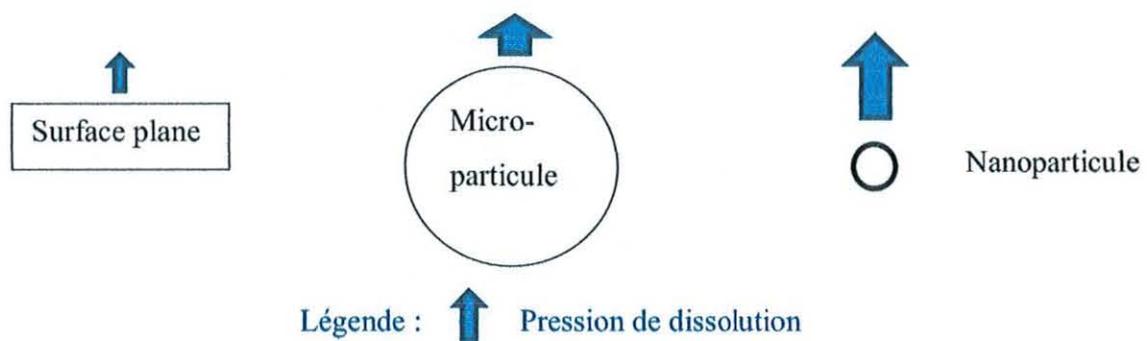


Figure 5 : Pression de dissolution selon la forme et le diamètre des particules (13)

Comme montré par la figure 6, la solubilité à saturation du sulfate de baryum est fonction de la taille des particules (calculée selon l'équation de Kelvin). L'augmentation de solubilité est plus importante pour les nanoparticules par rapport aux particules micrométriques (13).

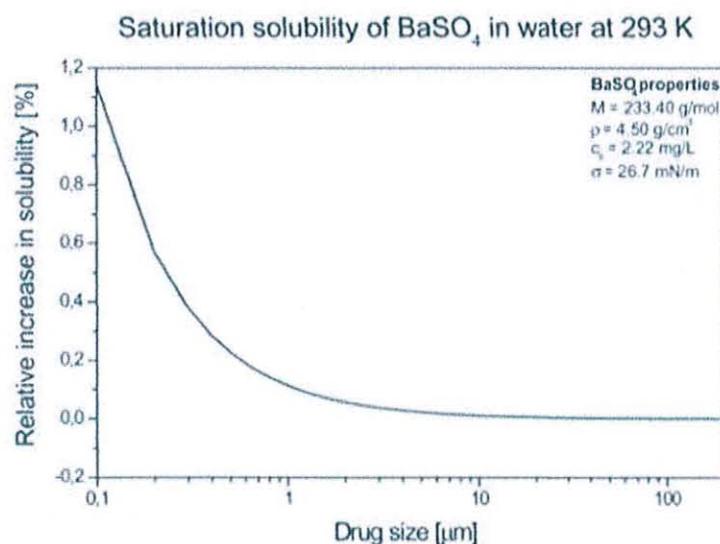


Figure 6 : Augmentation de solubilité du BaSO<sub>4</sub> dans l'eau en fonction de la taille particulaire calculée selon l'équation de Kelvin

L'augmentation de la solubilité à saturation a deux avantages :

1. Amélioration de la vitesse de dissolution selon la formule de Noyes et Whitney, car le rapport de  $dc/dt$  est proportionnel au gradient de concentration  $(C_s - C_x)/h$ , dans lequel  $C_x$  est la concentration du milieu et  $h$  est la distance de diffusion.
2. Le gradient de concentration entre le sang et le tube digestif augmente en raison de l'accroissement de  $C_s$ , donc l'absorption via la diffusion passive est facilitée (13).

### **I.3.3 Comparaison des nanosuspensions par rapport aux autres formulations destinées à améliorer la solubilité**

Chaque approche visant à améliorer la solubilité des composés peu hydrosolubles présentent ses avantages et ses limites, donc leur choix est fonction de plusieurs aspects comme par exemple : la voie d'administration, la forme galénique, les caractéristiques physico-chimique des composés... Un résumé est présenté dans le tableau II.

Par rapport aux formulations lipidiques, les nanosuspensions sont utilisables pour les médicaments ni hydrosolubles ni liposolubles qui possèdent une énergie réticulaire élevée donc traduite par un point de fusion élevé. La conséquence est une tendance à la réduction de dissolution des cristaux quel que soit le solvant. Les nanosuspensions réussissent à contourner cet obstacle de dissolution et à maintenir les principes actifs à l'état cristallin avec une taille suffisamment petite pour satisfaire aux besoins pharmaceutiques.

La technique de nanosuspension a comme avantage d'avoir une charge en masse par unité de volume élevée, contrairement aux approches de formulation des principes actifs par des vecteurs (par exemple les cyclodextrines) qui nécessitent l'utilisation d'excipient de haut rapport molaire. Cette charge relativement élevée en principe actif permet de réduire la dose à administrer dans le cas où un faible volume d'administration est nécessaire (par exemple, les injections intramusculaires et les collyres).

L'autre avantage des nanosuspensions est la réduction de la quantité de solvants organiques nécessaires par rapport à la technique en co-solvant, qui demande en effet une quantité importante de solvants organiques pour solubiliser le composé. Malheureusement dans ce dernier cas ce n'est pas sans poser un problème de toxicité (1) et les effets secondaires générés par les solvants peuvent être graves. Par exemple, le Cremophor EL<sup>®1</sup> qui est souvent

---

<sup>1</sup> Cremophor EL<sup>®</sup> est un est un huile de ricin polyéthoxylé produit par la société BASF

utilisé comme véhicule de formulation pour les principes actifs peu hydrosolubles augmente la toxicité du paclitaxel. Ce dernier est un agent antimétabolique utilisé dans certains traitements de cancers. L'utilisation de Cremophor EL® pour formuler le paclitaxel s'est avérée être responsable de sévères toxicités néphrologique, cardiologique et neurologique (17).

Le diamètre des nanocristaux est en général compris entre 200- 400 nm, ce qui est largement inférieure à la taille des plus fins capillaires qui mesurent environ 5 µm. Par conséquent, les nanosuspensions paraissent adaptées à la voie parentérale si les stabilisants du système sont autorisés par les autorités. En employant les nanosuspensions, théoriquement tous les médicaments peuvent atteindre une biodisponibilité de 100%. Par définition, la biodisponibilité absolue (=100%) est équivalente à la surface sous la courbe calculée dans le sang obtenue après l'injection intraveineuse d'une même dose (18).

Tableau II : Comparaison des différentes formulations potentielles pour les principes actifs peu hydrosolubles (19)

Formulation	Potentiel de charge en principe actif	Adapté aux principes actifs thermolabiles	Convient aux principes actifs à point de fusion élevé	Formulation liquide (L) ou solide (S)	Voie d'administration	Complexité de la technologie
Nanonisation	Haut	Oui	Oui	L + S	Orale + IV	Complexe
Micronisation	Haut	Oui	Oui	L + S	Orale	Simple
Incorporation dans cyclodextrine	Bas	Oui	Oui	L + S	Orale + IV (limité)	
Formation de sel	Haut	Oui	Oui	S	Orale	Simple
Ajustement de pH	Bas	Oui	Oui	L	Orale + IV	Simple
Co-cristaux	Haut	Oui	Oui	S		Moyen
Formulations lipidiques	Bas	Limité	Limité	L + S		Simple

## I.4 Méthodes de fabrication de nanosuspensions

Deux approches de fabrication des nanosuspensions sont aujourd'hui utilisées : l'approche « Bottom Up » et l'approche « Top Down ».

### I.4.1 Approche « Bottom Up »

#### A. Principe

Une des méthodes conventionnelles de fabrication de nanosuspension est appelée « Bottom Up technology » : le médicament est d'abord dissout dans un solvant organique et ensuite cette solution est mélangée avec un non-solvant aqueux miscible. La solubilité du médicament est faible dans le mélange eau-solvant organique, donc la précipitation a lieu en générant des fins cristaux ou des particules solides amorphes. Cette croissance est très rapide en raison de la valeur élevée de la solubilité à saturation, ce qui amène à une nucléation rapide (20) ; l'apparition des particules solides amorphes est favorisée par la sursaturation quand la solubilité de l'état amorphe est dépassée. Cette préparation doit être couplée avec un processus de haute force de cisaillement pour ensuite réduire la taille des précipités de manière homogène (21).

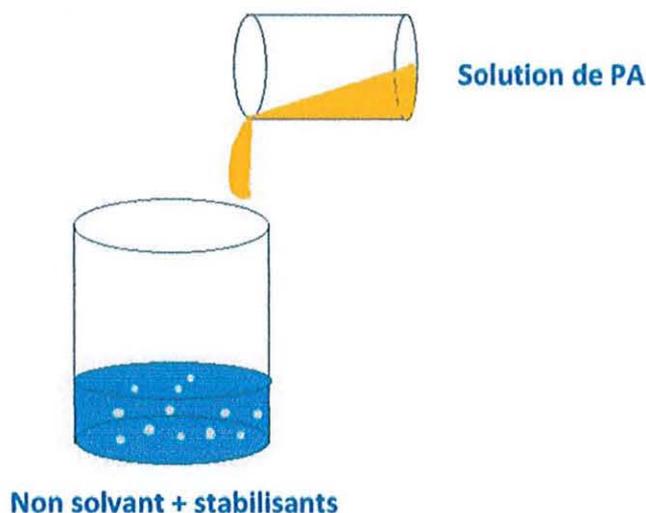


Figure 7 : Principe de fabrication d'une nanosuspension par la technique solubilisation- reprecipitation

Les techniques de formulation de nanosuspension « Bottom – Up » peuvent être considérées comme les méthodes les plus anciennes pour fabriquer les nanocristaux. En effet, elles ont été développées depuis des années soixantes. Le tableau III récapitule les techniques citées dans la littérature.

Tableau III : Résumé des différentes techniques de « Bottom Up »

Méthode de préparation	Description	Principaux inconvénients	Année
Fusion à chaleur	Refroidissement rapide d'un fondu de mélange eutectique de PA et de stabilisants	Décomposition possible du médicament par la chaleur	<b>1961</b>
Evaporation du solvant	Évaporation du solvant qui contient le PA et les stabilisants	Contamination par solvant, problème de toxicité	<b>1965 (22)</b>
Hydrosol	Précipitation à partir d'un solvant organique par addition d'eau	Difficulté de contrôler la taille des particules	<b>1988 (23)</b>
Gaz anti-solvant recristallisation	Saturation de la solution de PA avec un fluide supercritique	Difficulté d'éliminer le solvant organique	<b>1991 (24)</b>
Expansion rapide de solution supercritique	Diminution rapide de la pression du fluide supercritique dans lequel le PA est dissout	Solubilité de PA dans le fluide supercritique	<b>1999 (25)</b>
Cristallisation contrôlée pendant lyophilisation	Lyophilisation du mélange de PA, d'eau et de solvant organique à une température relativement élevée	Temps de procédé long	<b>2008 (26)</b>

## B. Exemples de procédé

Le procédé « Nanoedge » de Baxter International Inc. est une « boîte à outils » pour les PA peu hydrosolubles ayant un point de fusion et un log P élevé.

La première étape consiste en la microprécipitation après avoir dissout le principe actif dans un solvant organique miscible à l'eau pour former une solution, puis cette solution est mélangée avec un second solvant pour former une présuspension. De l'énergie est appliquée pour former des particules de diamètre d'environ 400 nm à 2 µm (27). Cette énergie est fournie par les méthodes qui provoquent des forces de cisaillement, des chocs ou encore des forces de cavitation, par exemple la sonication, l'homogénéisation ou la microfluidisation. La suspension produite peut être administrée directement après une stérilisation appropriée (28).

« Nanomorph » d'Abbott est un autre exemple de méthode par précipitation permettant de préparer les nanoparticules amorphes des composés peu hydrosolubles à partir du composé à l'état cristallin. Les solvants miscibles à l'eau sont employés pour dissoudre le principe actif en question suivi d'une précipitation par des solutions aqueuses contenant des polymères. Dans cette technique, la suspension du principe actif dans le solvant est introduite dans une chambre où elle est mélangée rapidement avec un autre solvant. La suspension est transformée immédiatement en solution, puis, l'ajout de la solution aqueuse contenant les polymères provoque la précipitation du composé. Les polymères maintiennent l'état nanoparticulaire du composé en empêchant l'agrégation ou la croissance. Une poudre redispersible dans l'eau peut être obtenue par les procédés traditionnels (par exemple atomisation) à partir de la nanosuspension.

## C. Avantages & inconvénients

Les méthodes « Bottom Up » sont plutôt utilisées à l'échelle du laboratoire et peu de médicaments sur le marché sont issus de ce type de procédé probablement en raison de la difficulté de la transposition d'échelle.

Les inconvénients principaux de ces techniques sont : l'utilisation de solvants organiques, la difficulté d'éviter la croissance des nanocristaux qui deviendront alors des microparticules, l'impossibilité d'appliquer la technique aux composés qui sont à la fois peu hydrosolubles et peu liposolubles. (29)

## **I.4.2 Approche « Top Down »**

Contrairement à la technique « Bottom Up » qui reconstitue des nanocristaux à partir d'une solution, l'approche « Top Down » consiste à réduire la taille des grosses particules par divers moyens en vue d'obtenir des nanocristaux.

### **I.4.2.1 Méthode de broyage**

#### **A. Principe**

Le broyage à boulets a été déjà utilisé dès la première partie du 20<sup>ème</sup> siècle pour produire les suspensions ultrafines et reste le mode de production le plus couramment utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Cinq médicaments sont fabriqués par cette approche et ont obtenu une AMM aux Etats-Unis et/ ou en Europe (cf. Tableau IV).

Le principe du broyage est plutôt simple : les boulets broyeurs, le milieu de dispersion (souvent l'eau), le principe actif et au moins un stabilisant sont chargés dans la chambre de broyage. Les forces de cisaillement et les chocs générés par le mouvement des boulets broyeurs conduisent à la réduction de taille des particules (cf. figure 8). Contrairement à l'homogénéisation à haute pression, la méthode de broyage est une technique à basse énergie. Des boulets broyeurs de taille variée peuvent être utilisés en fonction des spécifications du produit. Ces billes de broyages sont constituées de céramique dont le dioxyde de zirconium stabilisé par du cérium ou de l'yttrium, de l'acier inoxydable, du verre ou encore des billes enveloppées de résine de polystyrène extrudé.

Il y a 2 principes pour provoquer le mouvement du milieu de broyage : soit le milieu de broyage est entraîné par un agitateur, soit le conteneur entier possède un mouvement complexe qui provoque le mouvement du milieu de broyage. Pour les lots de volume important, il est plus difficile d'avoir le conteneur entier en mouvement, donc le broyage avec agitateur est plus facile dans ce cas-là. Dans la production industrielle actuelle, l'agitateur entraînant les billes en mode de recirculation est couramment utilisé (19).

Le temps de broyage dépend de plusieurs facteurs, par exemple la dureté du PA, la viscosité du milieu, la température, l'énergie fournie, la taille des billes de broyage.... (13)

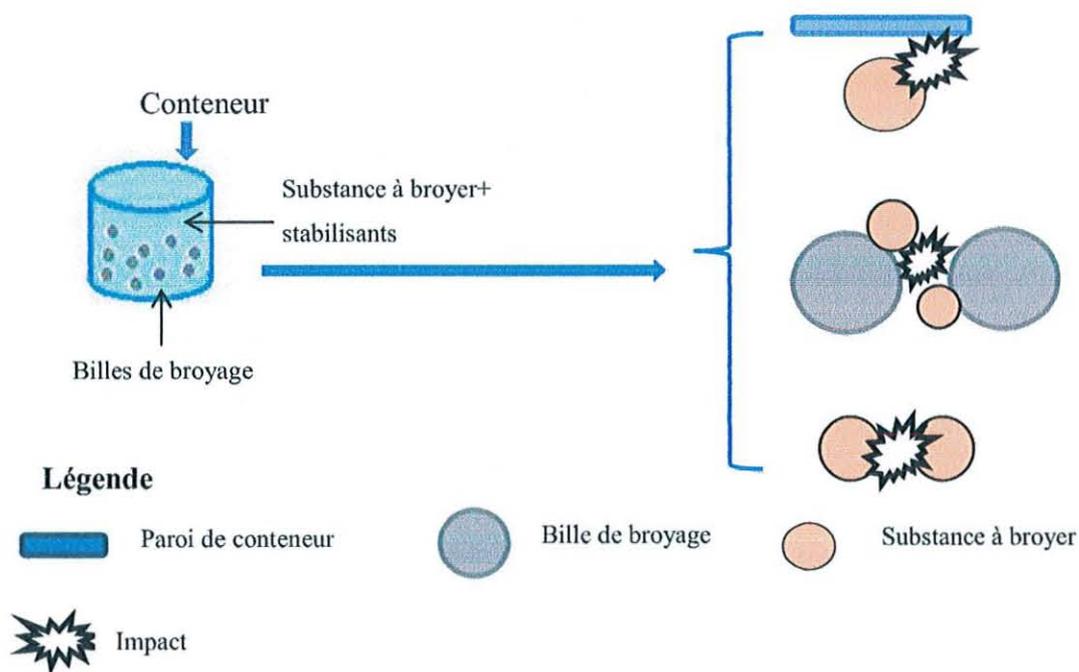


Figure 8 : Différents types d'impact mécanique mis en jeu pendant le broyage

#### B. Exemple de procédé de fabrication :

La technique NanoCrystal® de la société Elan est basée sur le principe du broyage à bille qui a connu un succès commercial important. C'est une technique leader de ce domaine et sa capacité de production est suffisamment large pour pouvoir répondre à des besoins très variés depuis l'échelle de recherche jusqu'à l'échelle industrielle (500 – 1000 kg de PA par lot).

Le procédé de broyage est similaire quelle que soit l'échelle de production comme illustré dans la figure 9 : le conteneur (contenant les billes de broyage) est chargé en PA peu hydrosoluble. Dans un deuxième temps, le moteur active la pompe, le milieu, les particules de PA et la paroi du conteneur en générant les forces d'impact et de cisaillement très importantes qui vont par conséquent réduire la taille du principe actif de quelques centaines de microns au rang nanométrique. Les nanoparticules formées sont maintenues par les stabilisants ajoutés dans le conteneur. En fonction de la charge initiale, deux types de système peuvent être distingués reposant principalement sur la façon d'alimenter le conteneur ; donc soit il s'agit de broyage vertical pour petite échelle, soit de plateforme de recirculation horizontale pour grande échelle.

Les types de billes de broyage peuvent être variés selon le besoin et les caractéristiques du produit. Par exemple, les billes PollyMill® (billes enveloppées par résine de polystyrène

extrudé) sont couramment employées et elles ont été rigoureusement testées pour maximiser la réduction de taille tout en minimisant la trace des impuretés dans le produit fini (8).

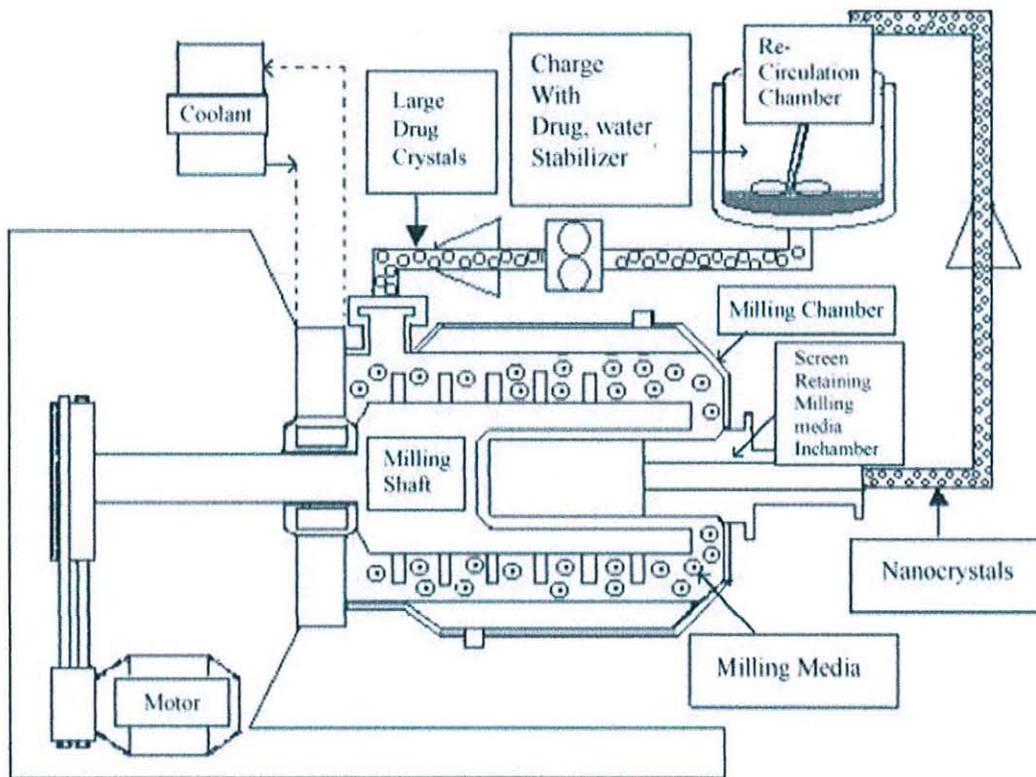


Figure 9 : Schéma simplifié du procédé de la technique NanoCrystal®

### C. Avantages et inconvénients de la méthode de broyage

La méthode de broyage est largement utilisée non seulement dans l'industrie pharmaceutique mais aussi dans d'autres secteurs comme l'industrie agro-alimentaire ou l'industrie de la peinture en vue d'obtention des particules fines et ultrafines. Cette méthode possède de nombreux avantages : c'est une technique mature, facile à monter en échelle donc simple pour satisfaire aux besoins de la production industrielle. De plus, le broyat a en général une distribution de taille étroite comme représenté dans la figure 10.

Un problème récurrent pour tous les types de broyage est l'érosion des éléments broyeurs pendant le procédé. Pour éviter ceci, l'enrobage des billes peut s'avérer efficace. Il existe notamment un procédé breveté (Method of grinding pharmaceutical substances) permettant d'éviter des contaminations inacceptables. Pour ce faire, ce procédé utilise les billes de broyage enrobées de résines polymériques inertes chimiquement et physiquement (30).

La méthode de broyage a un autre inconvénient qui est l'adhésion du produit sur la paroi du conteneur et la surface des billes, ce qui peut engendrer une perte de principe actif.

Certains procédés utilisent une énergie relativement basse ce qui exige une opération de broyage longue pouvant durer plusieurs jours (2)

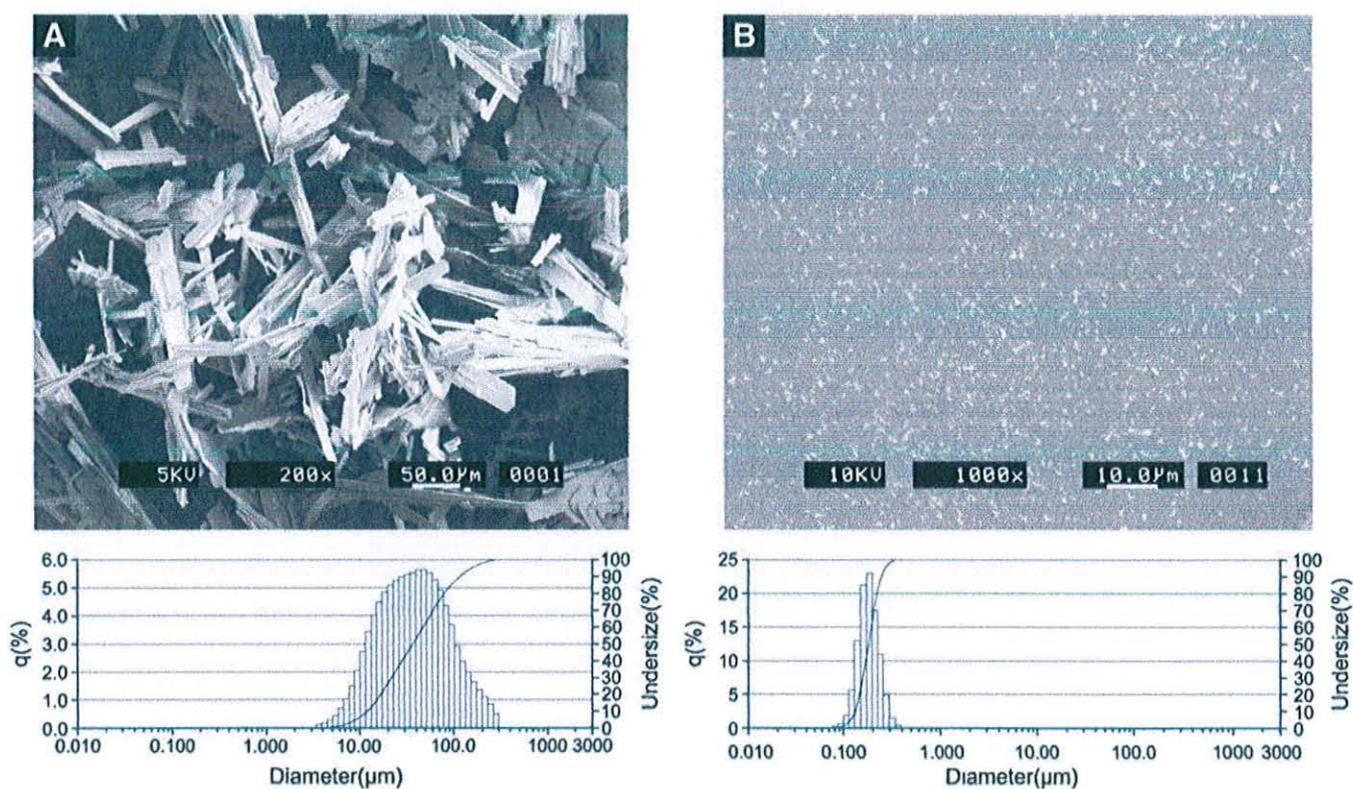


Figure 10 : Cristaux d'un médicament nanométrique. Clichés en microscopie électronique à balayage du posaconazole (peu hydrosoluble) avant (A) et après le broyage (B). Histogrammes de distribution correspondant aux clichés avant et après broyage (8)

### 1.4.2.2 Méthode d'homogénéisation à haute pression (HHP)

La méthode de HHP est la deuxième méthode la plus souvent rencontrée de l'approche « Top Down » pour fabriquer les nanocristaux. Il existe deux types d'homogénéisateur :

1. Homogénéisateur par microfluidisation
2. Homogénéisateur piston – gap

#### A. Principes

L'homogénéisateur par microfluidisation fonctionne sur le principe de jet de courant. dans un premier temps on fait entrer le produit à réduire dans le système, puis la pompe à haute pression propulse le produit dans la « chambre d'interaction » à très haute vitesse (par exemple, 400 m/s) (31). La chambre d'interaction possède une géométrie exclusive de forme « Z » ou « Y », et ces formes conduisent aux changements de direction (forme de Z) ou encore à la division de courant (forme de Y), et ceux-ci provoquent des forces de cisaillements et des collisions qui vont réduire la taille des particules (32).

Dans l'homogénéisateur de type « piston – gap », le fonctionnement consiste à faire traverser la suspension du principe actif à travers une petite lumière à une forte vitesse (cf. figure 11). Dans cette petite lumière, les cristaux sont réduits par le phénomène de cavitation, ou encore par la force de cisaillement et les collisions entre les cristaux ou avec la paroi.

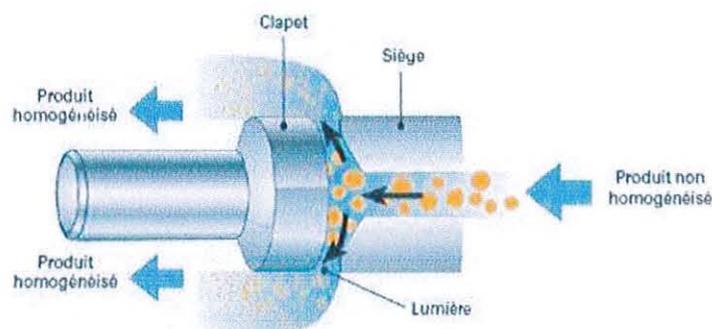


Figure 11 : Schéma de l'homogénéisateur gap - piston (33)

Mécanismes de réduction de taille mis en œuvre dans l'homogénéisateur « gap-piston » :

- Cisaillement : il est le résultat du laminage et des variations brutales de vitesse du produit. Ce principe ne s'applique que si le rapport entre les viscosités des phases dispersées et de la phase dispersante est inférieur à 4.
- Cavitation : Le principe de la cavitation (cf. figure 12) repose sur le fait que le produit est accéléré au contact de la lumière du clapet qui est beaucoup plus étroit que le conduit d'alimentation. Donc selon la loi de Bernoulli (cf. annexe 3), dans la lumière, la pression statique du liquide chute en dessous de sa tension de vapeur. Par conséquent, ce liquide commence à bouillir en formant des microbulles de vapeur pendant une fraction de seconde. Puis dès que la pression remonte, c'est-à-dire dès que le produit est ralenti, les bulles implosent et génèrent une cavitation vigoureuse. La cavitation met les cristaux en vibration, divisant ceux qui ont une taille supérieure à une certaine taille critique, qui dépend de la viscosité et de la tension superficielle des deux phases dispersée et continue (33).

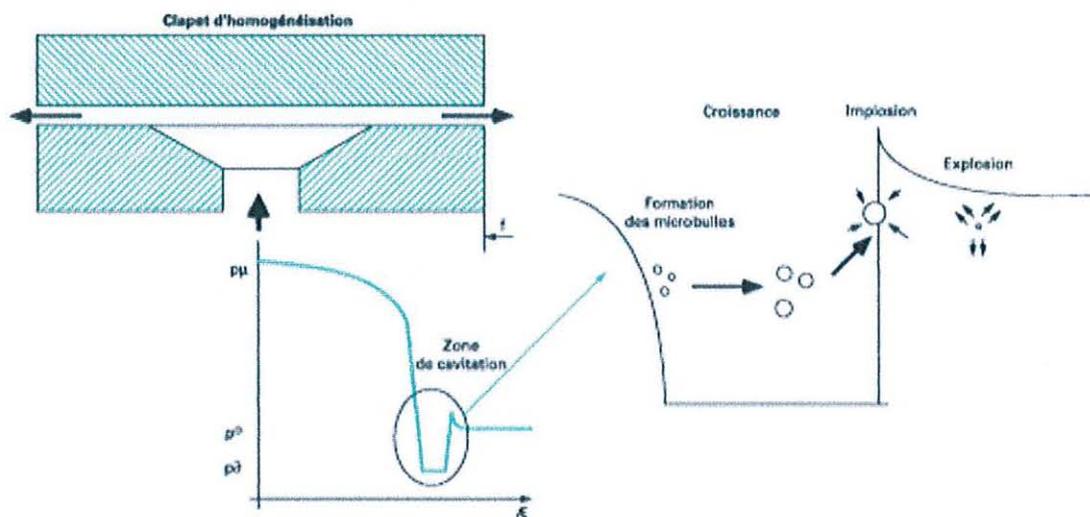


Figure 12 : Phénomène de cavitation rencontré dans l'homogénéisateur "gap-piston" (33)

## B. Exemple de procédé de fabrication

La technique Disso Cube<sup>®</sup> de la société Skyepharma fait partie de l'homogénéisateur gap-piston. Le principe actif est dispersé dans une solution aqueuse contenant des surfactants, puis cette suspension est poussée à travers une petite lumière sous haute pression de 1500 à 2000 bars en moyenne, pouvant atteindre jusqu'à 4000 bars. Selon la loi de Bernoulli, ceci conduit

à une élévation de vitesse du fluide donc une augmentation de sa pression dynamique ( $\frac{\rho v^2}{2}$ ), et en parallèle une diminution de sa pression statique. Lorsque la pression statique descend en dessous de la pression de vapeur de la phase aqueuse, l'eau commence à bouillir et forme des bulles. Ces bulles explosent quand le liquide aura fini de traverser la petite lumière, et la réduction de taille des principes actifs est due aux énergies dégagées par la cavitation. La taille des principes actifs obtenus dépend de la pression de l'homogénéisateur, du nombre de cycle de passage dans l'homogénéisateur, et de la dureté des principes actifs (34).

### **C. Avantages & inconvénients**

La technique HHP peut monter en échelle ce qui permet de traiter de quelques centaines de litres à des milliers de litres par heure en mode continu. (34)

La taille des particules peut être contrôlée par le nombre de cycles de passage et la pression dans l'homogénéisateur.

En revanche, ce processus de haute pression risque de changer la structure cristalline de certaines composées et peut générer des fractions de structure amorphe (35).

## **1.5 Phénomènes impliqués dans la croissance des particules dans les nanosuspensions**

Suite à l'augmentation de la surface de contact par réduction de taille particulaire, les nanocristaux génèrent un gain de tension interfaciale et l'énergie libre du système augmente fortement, ce qui est la source de l'instabilité du système (36).

### **1.5.1 Agglomération irréversible**

Les forces d'interaction strictement interparticulaires rencontrées sont principalement des forces moléculaires parmi lesquelles se trouvent les forces d'attraction de Van Der Waals qui agissent à courte distance. Les forces de Van Der Waals qui sont des liaisons non covalentes existent toujours quelle que soit la nature du matériau. A l'échelle nanométrique elles entrent

en jeu et la force attractive croit rapidement quand les particules s'approchent avec comme résultat une agglomération irréversible (37).

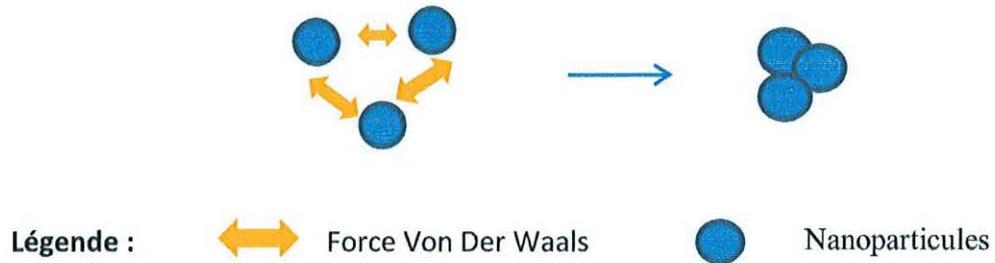


Figure 13 : Effets des forces de Van Der Waals sur les nanoparticules avec transformation en agglomérats irréversibles

### I.5.2 Croissance des cristaux

Dans une nanosuspension, de nouveaux cristaux peuvent aussi être formés dans la solution sursaturée de cette suspension contenant des « cristaux mères », même si les conditions de sursaturation ne permettent pas une production spontanée de nuclei. Ce processus de formation de cristaux est appelé nucléation secondaire. La nucléation secondaire s'oppose à la nucléation primaire qui consiste en un phénomène d'apparition des cristaux lorsqu'une solution atteint un degré de sursaturation ( $\beta$ ) excédant la sursaturation limite ( $\beta_{lim}$ ) (cf. figure 14).

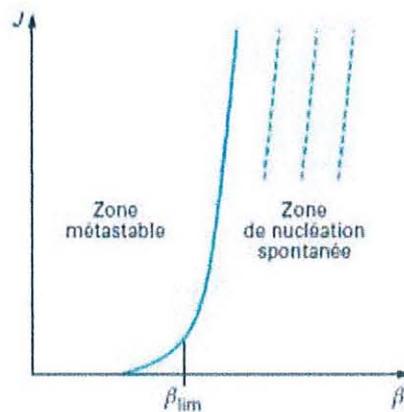


Figure 14 : Courbe de la fréquence de nucléation  $J$  en fonction de la sursaturation  $\beta$  (93)

Ensuite survient le phénomène de croissance des cristaux dans lequel les unités de croissance s'intègrent préférentiellement aux sites d'intégration où l'énergie pour les insérer dans le réseau cristallin est la plus faible. Plus la surface mise en commun entre la surface cristalline et l'unité de croissance est importante et plus cette énergie est faible (38), d'où la facilité de formation des cristaux plus grands dans un système de nanosuspension.

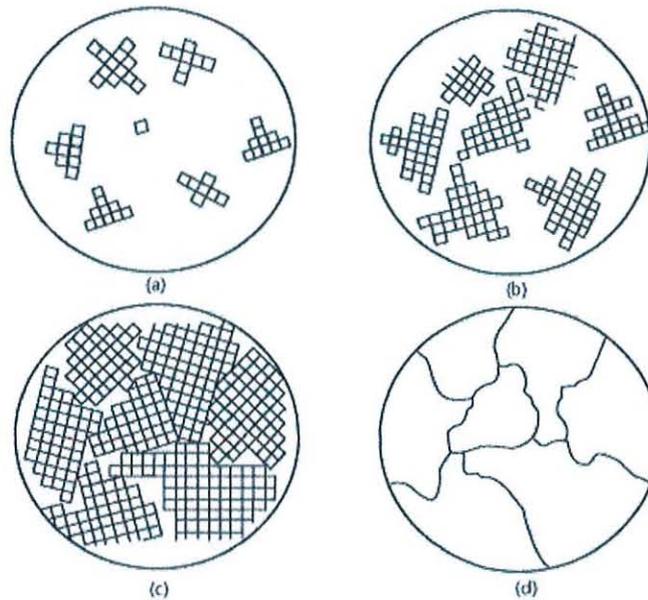


Figure 15 : Phénomène de croissance des cristaux (a) Nucléation (b) Croissance des cristaux (c) Rassemblement des cristaux irréguliers (d) Vue microscopique des bords de cristaux rassemblés à un cristal de taille plus grande

### 1.5.3 Phénomène de mûrissement d'Ostwald

Le phénomène de mûrissement d'Ostwald est un processus dans lequel les particules plus grosses grandissent par la consommation des particules plus petites due à l'effet Kelvin (cf. figure 16). Ce phénomène est plus important lorsque la taille des particules est inférieure à  $0.5 \mu m$ .

La force motrice de ce phénomène est la différence des solubilités entre les particules polydispersées, et la solubilité d'une particule qui est inversement proportionnelle à sa taille, comme décrite par la loi de Gibbs-Thomson :

$$C_s(r) - C_\infty = C_\infty * \left( \exp\left(\frac{a}{r}\right) - 1 \right) \approx C_\infty * a/r$$

$$\text{Et } a = 2 * \sigma * V_m / vRT$$

$C_s(r)$  : solubilité d'une particule de rayon  $r$

$C_\infty$  : solubilité d'une particule de rayon  $r = \infty$

$\sigma$  : tension entre la particule et la solution

$V_m$  : volume molaire de particule

$v$  : nombre de produits que la particule génère lors de sa dissolution

$R$  : constante des gaz parfaits

$T$  : température absolue

La vitesse de mûrissement dépend de la distribution de taille, de la cinétique de croissance des cristaux et des propriétés de transport de la phase liquide (39).

Par exemple, dans une dispersion simple qui est constituée de particules sphériques dont la croissance des particules est contrôlée par la diffusion, la vitesse de mûrissement s'écrit :

$$r = kV_m(C(\text{solution}) - C_s(r)), \text{ et } k = D/\delta$$

$D$  : coefficient de diffusion

$\delta$  : épaisseur de la couche de diffusion autour d'une particule

Donc la vitesse est mûrissement est augmentée pour les particules de grande taille.

Pour diminuer l'effet de ce phénomène, 2 pistes sont relativement simples et efficaces à mettre en œuvre : réduire la distribution de taille des nanocristaux et éviter les changements brusques de température qui provoquent la variation de solubilité (par exemple, les conditions de stockage) (18).

A cause du phénomène de mûrissement d'Ostwald, les principes actifs dont la solubilité est supérieure à une certaine valeur ne sont pas favorables à la formulation de nanosuspension en raison d'une dissolution trop importante qui favoriserait la croissance des nanoparticules ; ce phénomène est donc un obstacle à la stabilité du produit durant le stockage.

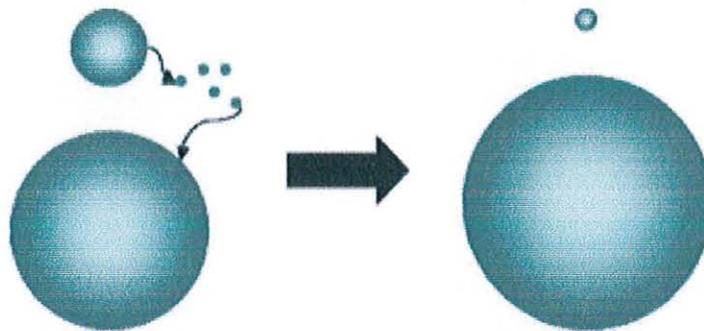


Figure 16 Phénomène de mûrissement d'Ostwald

## I.6 Stabilisants des nanosuspensions

Un des plus grands challenges lors de la fabrication de nanosuspension est donc la stabilité pour les raisons évoquées précédemment. Par conséquent les stabilisateurs ont un rôle important dans la formulation des nanosuspensions pour garantir leur stabilité physique en fournissant une barrière stérique et/ ou ionique. Le type et la quantité des stabilisants ont un grand impact à la fois sur la stabilité physique et le comportement *in vivo* des nanosuspensions. Le rapport principe actif / stabilisants peut varier considérablement donc une étude au cas par cas est nécessaire lors du développement de la formulation.

### I.6.1 Stabilisants ioniques

Les stabilisants ioniques s'adsorbent sur la surface des particules en suspension et génèrent une interaction électrostatique répulsive entre la double couche électrique à l'interface des particules solides et du milieu. La stabilité de la nanosuspension dépend également d'autres facteurs, comme par exemple, la densité et la distribution de taille des particules, le pH et la force ionique du milieu ... (40)

### I.6.2 Stabilisants stériques

Les polymères possédant une masse molaire  $>10000$  D et les chaînes permettant d'envisager une distance interparticulaire compatible avec l'attraction de Van der Waals peuvent générer une répulsion qui leur confient la possibilité de stabiliser un système colloïdal par effet stérique.

Un effet de stabilisation des particules colloïdales est obtenu par greffage de macromolécules à la surface des particules en formant des couches à leur surface (cf. figure 17). (41)

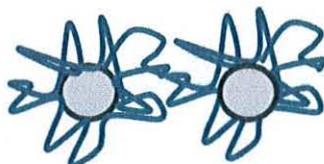


Figure 17 : Polymères attachés à la surface des particules colloïdales pour former des couches répulsives

Un effet synergique peut avoir lieu entre les deux types de stabilisants. L'ajout d'un polymère neutre permet une meilleure couverture de la surface particulaire par un stabilisant ionique (42)

### **1.6.3 Revue des stabilisants des nanosuspensions**

Malgré une longue liste théorique de stabilisants, les articles de recherche et les brevets indiquent un groupe plus restreint de stabilisants utilisables dans la fabrication des nanosuspensions (cf. Tableau IV). Malgré de nombreuses publications scientifiques, le potentiel des différents systèmes de stabilisants reste largement inconnu. Par conséquent il n'y a pas d'approche de formulation rationnelle à l'heure actuelle. De plus, à notre connaissance il n'existe pas encore d'investigation pour bien comprendre la faisabilité de production des nanosuspensions (choix des stabilisants) en fonction des caractéristiques du principe actif (43).

Tableau IV : Revue des systèmes de stabilisants des nanosuspensions cités dans la littérature

Système de stabilisants (% m/m au médicament)	Médicament (% m/v ou m/m dans la suspension)	BB/HHP/NP <sup>2</sup>	Littérature Références
1. Systèmes à un seul stabilisant			
1.1. Surfactants			
Cremophor® EL (100%)	13-Dicyclohexyl urée (1%)	BB	(44)
Lecithin (20%/40%/167%)	RMKP 22 (3%)	HHP	(45)
Poloxamer 188 (10%-100%)	Oméprazole (1%-10%)	HHP	(46)
Povidon 30 (100%, 25%, 10%)		BB	(43)
Vitamine E TPGS (5%)	Molécules modèles de Novartis	BB	(47)
Sodium lauryl sulfate (5%)	Spironolactone (10%)	HHP	(48)
Tween® 80 (30%)	RMKP 22 (1%)	HHP	(49)
1.2. Polymers			
Hydroxypropylcellulose (60 kDa; 16.7%)	PA de test (1.8%/6.1%/11.5%)	BB	(50)
Hydroxypropylméthylcellulose (Methocel E5 0,5%)	Indométhacine ( 5 %, 0,5%)	HHP	(51)
2. Systèmes à plusieurs stabilisants			
Vitamine E TPGS (3%), Poloxamer(Pluronic F68) (2%),	NVS-102 de Novartis (5 %)	BB	(42)
Vitamine E TPGS (3%), Sodium lauryl sulfate (1%),	NVS-102 de Novartis (5 %)	BB	(42)
Poloxamer 188, Polyvinylpyrrolidone K30, Polysorbate (Tween 80), Sodium lauryl sulfate	Fénofibrate (0,5%)	HHP	(52)
Sodium lauryl sulfate (0,5%, 1%), HPC (1,25%, 2,5%),	Miconazole (5%, 10%)	BB	(53)

<sup>2</sup> BB/ HHP/NP : Broyage à boulet / Homogénéisation à haute pression / Nanoprécipitation

HPMC (1,25%, 2,5%), PVP (1,25%, 2,5%)			
HPMC (0,2%) sodium lauryl sulphate (0,05%), Polyvinylpyrrolidone K30 (Kollidon© 30) (0,2%)	Hydrocortisone (1%)	NP	(54)
Span 85 (0,5%), Lécithine (0,5%)	Budesonide (1%)	HHP	(55)
Tyloxapol (0,2%), Lécithine (0,5%)	Budesonide (1%)	HHP	(55)
Tyloxapol (0,2%), Hexadécanol (0,5%)	Budesonide (1%)	HHP	(55)
Poloxamer (Lutrol F108) (5%), Cremophor® EL	PA (2%, 3,3%)	BB	(56)

## 1.7 Comportement *in vitro* & *in vivo* des nanosuspensions

Depuis des années 90, beaucoup de travaux ont été menés dans le milieu pharmaceutique pour investiguer les techniques de fabrication des nanosuspensions, leurs propriétés physico-chimiques liées à leur composition, leur structure cristalline ou amorphe, leur solubilité, etc. Plus récemment les articles décrivant le comportement et les corrélations *in vivo*/*in vitro* des nanosuspensions sont de plus en plus nombreux. Les résultats montrent le potentiel de ce type de formulation au niveau pharmacocinétique, pharmacodynamique et notamment un effet de ciblage pour les composés initialement peu hydrosolubles.

L'hypothèse de l'augmentation de vitesse de la dissolution des principes actifs peu hydrosolubles par augmentation de la surface d'exposition selon la théorie de Noyes-Whitney a été confirmée par des études cinétiques de dissolution *in vitro* (42) (57) (58) comme reporté dans la figure 18 : dans cet essai *in vitro*, les nanosuspensions ont été préparées par le même procédé et en employant le même stabilisant (5% de vitamine E TPGS). La vitesse initiale de dissolution est directement proportionnelle à la taille particulaire ; celles ayant un diamètre moyen de 250 nm se dissolvent plus rapidement que celle de 330 nm surtout pendant les premières 40 minutes.

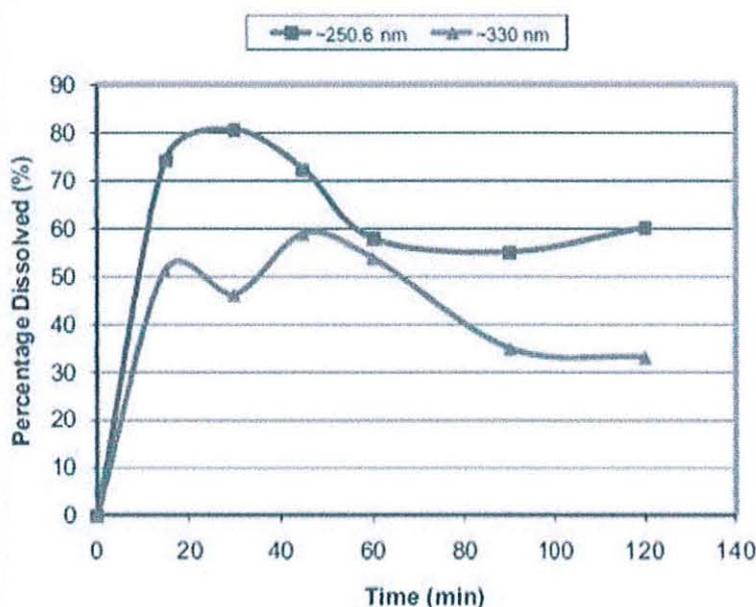


Figure 18 : Influence de taille particulaire sur la vitesse de dissolution d'une molécule candidate NVS-102 de Novartis

La nanosuspension permet d'augmenter la biodisponibilité des médicaments de classe II selon les théories évoquées précédemment. Les essais *in vivo* ont confirmé cette amélioration de biodisponibilité des principes actifs peu hydrosolubles via la nanonisation (59) (60).

Dans l'étude de traitement de l'hypertension par le 1,3-dicyclohexylurée chez les rats, les nanoparticules ont considérablement augmenté l'exposition du principe actif par voie orale (cf. figure 19). Les rats (n=2 dans chaque groupe) ont reçu par voie orale 30 mg/kg de 1,3-dicyclohexylurée nanonisé ou non. Deux heures après administration, la fraction du principe actif non liée aux protéines plasmatiques a été dosée dans les 2 groupes, et la concentration plasmatique du principe actif est 75 fois plus élevée dans le groupe ayant reçu la forme nanonisée que celui qui a reçu la forme non broyée (59).

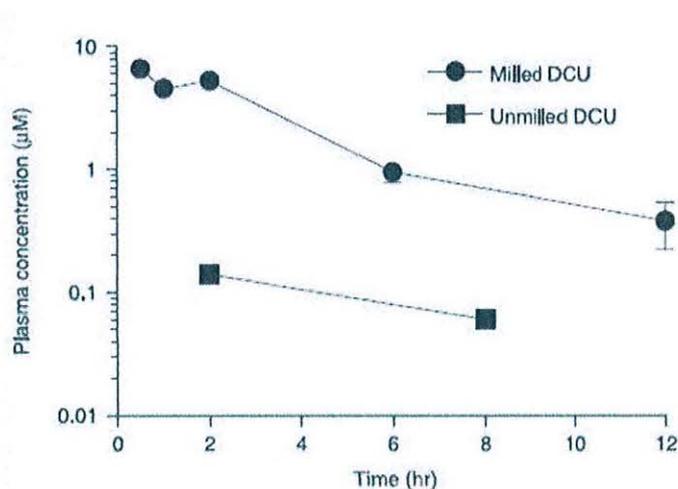


Figure 19 : Concentrations plasmatiques de 1,3-dicyclohexylurée (DCU) après administration par voie orale (59).

L'autre avantage des nanomédicaments repose sur la diminution de l'interférence du repas. Ceci est particulièrement important pour les principes actifs à marge thérapeutique étroite. Dans l'exemple de Megace ES<sup>®</sup> (Enhanced Stability) qui contient de l'acétate de mégestrol nanonisé (diamètre 50 fois inférieure à la forme précédente), l'effet du repas se manifeste sur l'ancienne forme micronisée, comme montrée dans la figure 20. ,

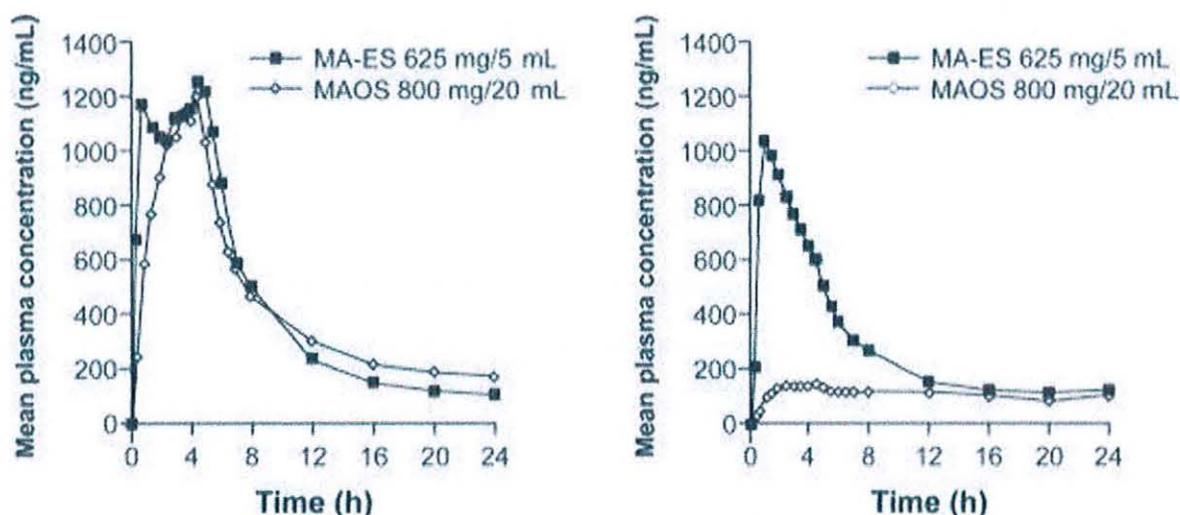


Figure 20 : Exemple de la diminution de l'interférence du repas par la forme nanonisée (MA-ES) du principe actif. A gauche, concentration plasmatique des 2 formes prises sans repas ; à droite, la concentration plasmatique des 2 formes prises avec repas (61)

Les concentrations plasmatiques sont similaires pour les 2 formes lorsque le médicament est administré sans repas, mais elle sont largement diminuées dans le cas de l'ancienne forme micronisée (MAOS) lorsque la prise est effectuée avec un repas.

## 1.8 Exemples de nanosuspensions commercialisées

Jusqu'à maintenant les techniques de « Top Down » sont les seules approches employées pour la production industrielle des médicaments contenant des principes actifs sous la forme de nanocristaux. Le tableau V récapitule les principales caractéristiques des médicaments « nanocristaux » actuellement sur le marché.

Les spécialités suivantes sont obtenues par la technologie « Top Down ».

### Rapamune®

Le principe actif de la spécialité est le Sirolimus qui est un immunosuppresseur issu de la fermentation de *Streptomyces Hygroscopicus*. Le Rapamune® a été commercialisé pour la première fois par Wyeth Pharmaceuticals (AMM délivrée par la FDA en 1999). Deux formes galéniques sont disponibles à savoir une suspension buvable et un comprimé (contenant les nanocristaux). L'avantage principal des nanocristaux dans ce cas est l'amélioration de l'observance des patients grâce à une meilleure biodisponibilité et la simplicité d'administration par rapport à la suspension (62).

Une fois le comprimé désagrégé après administration par voie orale, les nanocristaux forment une nanosuspension dans le tube digestif dont la biodisponibilité est de 21% plus élevée que celle de la forme suspension.

Toutefois, il existe un seuil de charge en nanocristaux dans les comprimés. Une fois ce seuil dépassé, les nanocristaux pourront rentrer en contact avec un risque de fusion pendant la compression en donnant des cristaux plus grands. Dans le cas de Rapamune®, les comprimés de 1mg et 2mg ne contiennent que 365µg et 1mg de PA respectivement, sachant que la suspension possède une concentration en PA supérieure qui est de 1mg/ml. (13)

#### Emend®

Le principe actif de cette spécialité est l'aprépitant qui est un antiémétique. L'aprépitant est un antagoniste sélectif à haute affinité pour les récepteurs de la substance P neurokinine 1 (NK1) humaine, et ne possède pas d'affinité pour les récepteurs sérotoniques, dopaminergiques ou encore corticoïdes.

Emend® n'est absorbé que par la partie supérieure du tractus gastro-intestinal. Ici les nanoparticules sont nécessaires pour obtenir une vitesse de dissolution et d'absorption plus rapide. (13)

#### Tricor®

Le principe actif de Tricor® est le fénofibrate. Commercialisé aux USA, le Tricor® est prescrit dans les hypercholestérolémies en vue d'augmenter le HDL-cholestérol et de diminuer le LDL-cholestérol et les triglycérides.

Les nanoparticules permettent de supprimer l'effet du repas Les études *in vivo* menées par le laboratoire sur les autres formes non- nanonisées ont montré que le fait de prendre le fénofibrate avec un repas augmente l'absorption de 35%, ce qui présenterait un risque de dépasser la zone de concentration thérapeutique. Le fénofibrate ne possède pas de groupe ionique donc sa solubilité est indépendante du pH. L'effet du repas sur l'absorption pourrait être expliqué par la présence de lipides et surfactants (par exemple cholestérol) dans l'alimentation ce qui favoriserait la solubilisation des cristaux de fénofibrate de grande taille. (63)

#### Megace ES®

Le Megace ES® (Enhanced Stability) contient de l'acétate de mégestrol nanonisé (diamètre 50 fois inférieure à la forme précédente) qui exerce le même effet que la progestérone naturelle.

Le mécanisme d'action antinéoplasique de l'actétate de mégestrol dans le cancer du sein repose sur un effet antiestrogénique. Un mécanisme cytotoxique direct a aussi été évoqué pour expliquer le mécanisme d'action antitumorale du médicament.

La nanosuspension obtenue dans le tube digestif permet d'avoir une plus grande surface disponible du principe actif ce qui conduit à une dissolution plus rapide et une meilleure absorption. Ceci permet de diminuer le volume de prise par rapport à l'ancienne forme car la biodisponibilité du principe actif est augmentée (64).

#### Sustenna®

Le principe actif de Sustenna® est le palmitate de paliperidone, indiqué dans le traitement de la schizophrénie. L'utilisation par voie intramusculaire du principe actif à une échelle nanométrique permet une administration mensuelle au lieu d'une prise quotidienne par voie orale. Cette forme nanonisée permet évidemment d'améliorer l'observance ce qui est un point très important dans les pathologies psychiques.

Tableau V : Médicaments commercialisés contenant des PA sous forme de nanocristaux

Médicament, PA,	Date de l'AMM	Technique de réduction de taille	Voie d'administration	Indication thérapeutique	Compagnie
Rapamune®, Sirolimus	1999 FDA 2001 EMA	NanoCrystal®	Orale	Prévention du rejet d'organe chez les patients adultes présentant un risque immunologique faible à modéré recevant une transplantation rénale.	Pitzer
Emed®, Aprépitant	2003 FDA, EMA	NanoCrystal®	Orale	Prévention des nausées et des vomissements aigus et retardés associés à une chimiothérapie anticancéreuse hautement émétisante comprenant du cisplatine chez l'adulte.	Merck
Tricor®, Lipantyl®, fénofibrate	2004 FDA	NanoCrystal®	Orale	Traitement d'une hypertriglycéridémie sévère associée ou non à un faible taux de HDL-cholestérol	Abbott
Triglide®, fénofibrate	2005 FDA	IDD-P®	Orale	Traitement d'une hypertriglycéridémie sévère associée ou non à un faible taux de HDL-cholestérol	Schionogi Pharma Inc.
Megace®, acétate de megestrole	2005 FDA	NanoCrystal®	Orale	Traitement palliatif des carcinomes du sein	PAR Pharmaceuticals
Invega® Sustenna® Xeplion®, palmitate de paliperidone	2009 FDA 2007 EMA	NanoCrystal®	Parentérale, intramusculaire	Désordres psychiques, Schizophrénie	Janssen-Cilag International NV

## 1.9 Conclusion

Cette synthèse bibliographique souligne l'apparition de plus en plus de molécules peu hydrosolubles dans les pipelines des sociétés pharmaceutiques depuis les deux dernières décennies, ce qui fait que de très nombreux travaux ont été réalisés dans le but d'améliorer la solubilité. Plusieurs types de formulations sont disponibles pour résoudre le problème de solubilité.

Une approche privilégiée repose sur les diverses méthodes de fabrication de nanosuspension, ce qui fait l'objet de cette thèse. Cette forme galénique relativement récente est s'avérée posséder plusieurs avantages dont l'amélioration de la solubilité, la diminution de l'interférence du repas, l'augmentation de la biodisponibilité. Grâce à ces avantages, plusieurs médicaments commercialisés l'ont déjà adopté, et encore plus de principes actifs en nanocristaux sont en étude.

Le principe des 2 approches de fabrication des nanosuspensions (Top Down et Bottom Up) ainsi que les exemples correspondants brevetés ont été décrits.

Le système de nanosuspension n'est pas stable à cause de l'augmentation de la surface résultant de la division des particules ce qui augmente l'énergie libre du système. Plusieurs mécanismes interviennent pour diminuer cette augmentation de l'énergie libre, comme l'agglomération, la croissance des cristaux et le mûrissement d'Ostwald. Par conséquent, la stabilisation des nanosuspensions est une des difficultés majeures de la formulation. Deux types de stabilisants sont rencontrés dans la littérature : stabilisant ionique et stabilisant stérique. Leur association peut donner un effet synergique.

Suite à cette revue, la première partie expérimentale de cette thèse a pour but de vérifier les résultats de la littérature sur les stabilisants. Ensuite les travaux vont être ciblés sur l'évaluation de différents équipements de fabrication des nanosuspensions en testant plusieurs principes actifs. Une fois les nanosuspensions obtenues, les caractérisations (mesure de la viscosité, mesure de taille des nanoparticules, mesure du potentiel zêta, observation microscopique, détermination de l'état cristallin / amorphe) par différentes techniques seront réalisées.

## II. Partie expérimentale

---

Lors de mon stage au service de Préformulation & Non Clinical Formulation d'UCB, il m'a été demandé d'aborder le sujet de la formulation des nanosuspensions, de l'évaluation du potentiel des différents équipements, ainsi que de la détermination des paramètres critiques impliqués dans la formulation des nanosuspensions.

Dans ce chapitre, seront présentés successivement les matières premières utilisées ainsi que les méthodes mises en œuvre au cours de cette étude, et enfin les résultats obtenus et les conclusions qui ont pu en être tirées.

### II.1 Matériels et méthodes

#### II.1.1 Matériels

##### *II.1.1.1 Molécules testées*

##### **Composé A<sup>3</sup>**

Il s'agit d'une molécule neutre cristalline, de masse moléculaire de 375,45Da, très peu soluble dans l'eau dont la solubilité est inférieure à 1 µg/ml quand pH varie de 1.2 à 10.0.

##### **Composé B**

Il s'agit d'une molécule neutre cristalline, sa masse moléculaire est d'environ 400Da, très peu soluble dans l'eau (solubilité de 4 µg/ml à pH neutre).

##### **Indométhacine**

L'indométacine (Sigma-Aldrich, Belgique) est un anti-inflammatoire non stéroïdien, appartenant au groupe des indoliques (cf. figure 21). Il s'agit d'un inhibiteur des cyclo-oxygénases qui possède des propriétés anti-inflammatoire, antalgique, antipyrétique, et d'inhibition des fonctions plaquettaires.

Sa masse molaire est de 357,788 Da et sa solubilité dans l'eau est de 2,4 µg/ml (65).

---

<sup>3</sup> Pour des raisons de confidentialités, la molécule est représentée par une lettre

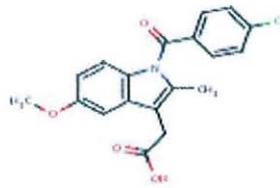


Figure 21 : Formule développée de l'indométhacine (65)

## Mébendazole

Le mébendazole (Sigma-Aldrich, Belgique) (cf. figure 22) est un médicament antiparasitaire indiqué dans le traitement de kystes hépatiques dus aux *Echinococcus granulosus*.

Sa masse molaire est de 295,29 Da. La solubilité de mébendazole est inférieure à 0,05% dans l'eau et certains solvants organiques (par exemple, alcools, éther, chloroformes) (66).

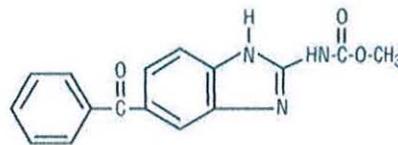


Figure 22 : Formule développée du mébendazole

### II.1.1.2 Stabilisants

D'une façon simplifiée, le processus de fabrication des nanosuspensions comporte 2 phénomènes opposés : la réduction de taille et l'aggrégation, qui ont lieu simultanément. Par conséquent, les stabilisants sont primordiaux pour inhiber l'aggrégation ou croissance des cristaux.

A une moindre échelle, j'ai aussi été amenée à travailler sur des stabilisants couramment cités dans la littérature. Les combinaisons des stabilisants ioniques et stériques ont été testés car une association des 2 types de stabilisant montre plus d'intérêt par effet synergique (42)

#### 1. Excipient A<sup>4</sup>

Il s'agit d'un tensioactif anionique compatible avec une administration orale non clinique.

#### 2. Excipient B

<sup>4</sup> Pour des raisons de confidentialités, les stabilisants sont identifiés par une lettre.

Le produit B est un polymère semi-synthétique non ionique et très stable, compatible avec une administration orale non clinique.

### **3. Excipient C**

Le composé C est un excipient neutre amphiphile ayant des propriétés solubilisantes compatibles avec une administration orale non clinique.

### **4. Excipient D**

L'excipient D est un composé neutre présentant des propriétés surfactantes et émulsifiantes, compatibles avec une administration orale non clinique.

### **5. Excipient E**

Le composé E est un copolymère à caractère amphiphile présentant des propriétés surfactantes, émulsifiantes, solubilisantes, compatibles avec une administration orale non clinique.

### **6. Excipients F, FS**

Il s'agit d'une série d'homopolymères synthétiques ayant des propriétés d'adhésion, d'activation de la surface, compatibles avec une administration orale non clinique.

## **II.1.2 Solvant**

Le Diméthylsulfoxyde (DMSO) est un solvant polaire organique (organosulfuré), aprotique. Il se présente comme un liquide incolore, qui dissout à la fois des composés polaires et non-polaires, et qui est miscible dans une large gamme de solvants organiques, ainsi que dans l'eau. Il est souvent utilisé dans les préparations topiques en raison de sa pénétration très facile et rapide de la peau avant de diffuser dans tout l'organisme. Ses propriétés pharmaceutiques sont analgésiques et anti-inflammatoires (67).

## **II.1.3 Produit anti- mousse**

Le Dow Corning® 1510 est une émulsion blanchâtre de silicone ayant la propriété d'anti-mousse (Dow Corning Europe S.A), il est autorisé par la FDA en tant que additif alimentaire (68).

## II.2 Equipements de fabrication

Différents types d'équipements ont été utilisés durant ce travail pour obtenir des nanosuspensions par les techniques « Top Down » et « Bottom Up ». Ces matériels sont cités ci-dessous.

### **Broyeur planétaire Retsch PM100**

Le broyeur planétaire PM100 (Retsch, Allemagne) est un appareil de paillasse compact avec une station de broyage (cf. figure 23).

Le bol de broyage est disposé excentriquement sur la roue solaire du broyeur planétaire à billes. La roue solaire tourne dans le sens contraire à celui de la rotation du bol de broyage. Les billes de broyage situées dans le bol subissent une déviation résultant de mouvements de rotation superposés, responsables de ladite force de Coriolis (cf Annexe 2). Les différences de vitesse entre les billes et le bol de broyage entraînent une interaction entre des forces d'impact et de friction libérant des énergies dynamiques importantes. La combinaison de ces forces se traduit par le degré de broyage élevé et très efficace des broyeurs planétaires à billes.



Figure 23 : Vue extérieure et intérieure de broyeur planétaire Retsch PM 100 (92)

### **Vibro broyeur Restch CryoMill®**

Le bol de broyage du CryoMill® (cf. figure 23) (Restch, Allemagne) est soumis à des mouvements oscillatoires sur un plan horizontal. Les billes qui sont à l'intérieur viennent frapper avec une énergie élevée l'échantillon provoquant le broyage de ce dernier. Il est

adapté pour un broyage à sec ou humide à la température ambiante ou cryogénique pour un volume qui ne dépasse pas 20 ml.

Cet appareil est destiné à la réduction de taille, à l'homogénéisation, au mélange etc. Il est qualifié pour les utilisations pharmaceutiques (69).



Figure 24 : Broyeur à vibrations Cryomill® (70)

### II.2.1.1 Billes et chambre de broyage :

Différents types de billes et de chambres de broyage ont été testés dans ce travail : des billes en acier inoxydable ou en dioxyde de zirconium de différents diamètres ; des conteneurs en acier inoxydable ou revêtus d'agate ont été employés (cf. figure 21, 22).

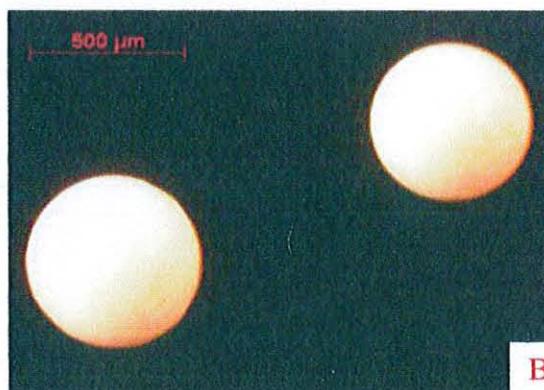


Figure 25 : Photo A : de gauche à droite, bille de ZrO<sub>2</sub> de 1cm de diamètre, bille en acier inoxydable de 2mm de diamètre, bille en ZrO<sub>2</sub> de 0,5 mm de diamètre. (grossissement 100x) Photo B : bille en ZrO<sub>2</sub> de 0,5 mm de diamètre



Figure 26 : Différents types de conteneurs utilisés (en acier inoxydable ou revêtu d'agate) dans l'étude

### II.2.1.2 Ultrasonicateur focalisé Covaris S220X :

L'appareil d'ultrasons focalisés S220X (cf. figure 27) (Covaris, USA) est un système polyvalent, à haute énergie conçu initialement pour les préparations d'échantillons pré-analytiques (permettant par exemple l'accélération de la désintégration des cellules) combiné avec la technique de « Adaptive Focused Acoustics™ » (AFA) breveté par la société Covaris. Elle fonctionne à haute fréquence (500KHz) et contrairement aux sonicateurs traditionnels de basse fréquence, AFA est inaudible donc ne nécessite pas de protections supplémentaires pour l'opérateur (71).



Figure 27 : Appareil à ultrasons focalisés (Covaris S220X)

Les trois paramètres énergiques de l'appareil sont :

- PIP (Peak Incident Power) correspond à l'amplitude de l'onde sinusoïdale et PIP est proportionnelle à l'énergie acoustique.

- DF (Duty Factor) est le résultat de  $t_1 / t_2$  où  $t_1$  est le transducteur émetteur d'énergie acoustique et  $t_2$  est la période de pulsion (somme des temps sommet et vallée). Autrement dit DF est le pourcentage du temps pendant lequel le transducteur transmet réellement énergie acoustique (cf. figure 28).
- CB (Cycles per burst) représente le nombre d'ondes sinusoïdales dans une pulsion. Un CB élevé est utilisé pour favoriser les bulles de cavitation (72).

### One acoustic burst

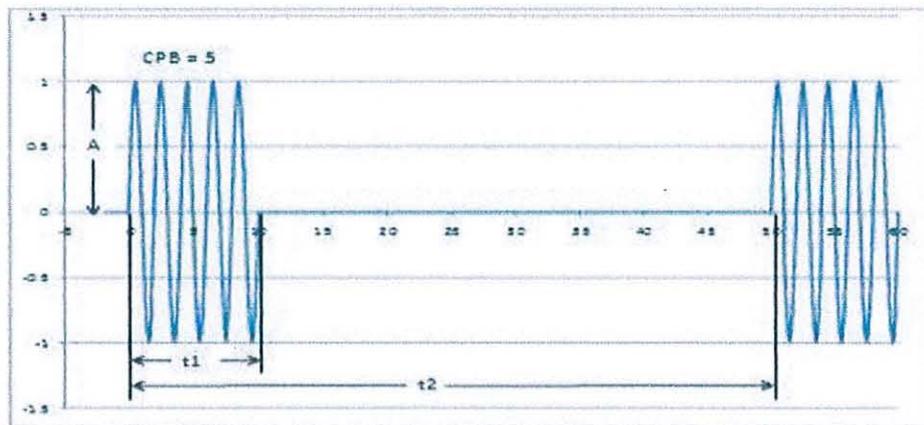


Figure 28 : Temps d'émission d'énergie acoustique  $t_1$  et période de pulsion  $t_2$  dans un cycle de pulsion acoustique

## II.3 Caractérisation et stabilité physique des nanosuspensions

Les nanosuspensions ont été caractérisées par la taille des particules, le potentiel zêta, la viscosité, l'observation microscopique, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la diffractométrie de rayons X.

### II.3.1 Mesure de taille

Une des plus importantes caractéristiques des nanosuspensions est la détermination de la taille particulaire. Trois techniques sont couramment utilisées : la spectroscopie par corrélation de photon (PCS), la diffraction laser (LD) et la microscopie électronique à transmission.

L'avantage majeur de la PCS est d'abord l'intervalle de mesure (50 nm – 2  $\mu$ m) qui est bien adapté aux nanoparticules. L'autre avantage par rapport à la LD est l'utilisation de moins de diluant donc une minimisation de la perturbation des stabilisants et de risque de dissolution des très petites particules.

La taille moyenne des nanoparticules a été mesurée par PCS en utilisant le Zetasizer<sup>®</sup> Nano ZS (Malvern Instrument, UK). Le principe de cette technique repose sur la mesure du mouvement brownien des particules. La fréquence et l'amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du solvant. A une viscosité donnée, plus les particules sont petites, plus leur mouvement brownien présente une fréquence et une amplitude importantes. L'appareil mesure la lumière diffusée pour déterminer la taille et la distribution de taille des nanoparticules en utilisant la formule de Stokes-Einstein (cf. formule suivante) (73). Pour une mesure optimale il nécessite 100 -200 kilo comptes par seconde et un récepteur du laser situé à environ 2mm de l'échantillon.

### Formule de Stokes-Einstein

$$d(H) = \frac{kT}{3 \pi \eta D}$$

d (H) : diamètre hydrodynamique

k : constant de Boltzmann

T : température absolue

$\eta$  : viscosité

D : coefficient de diffusion

La valeur de « Z Average » exprime la moyenne du diamètre hydrodynamique des particules. Ce diamètre correspond au rayon de la sphère avec une couche du milieu ayant le même coefficient de diffusion (cf. figure 29).

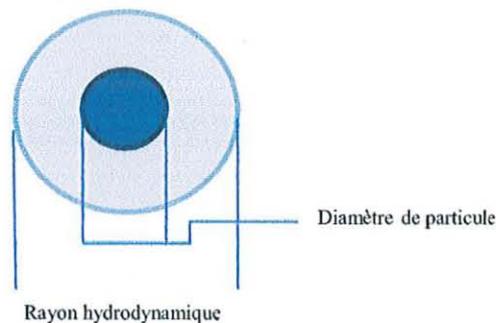


Figure 29 : Rayon hydrodynamique d'une particule par rapport à son diamètre réel

Le « Polydispersity Index » (PDI) est un indicateur important qui donne la « largeur » de la distribution de taille, une distribution étroite de la taille des particules aura moins de risque de phénomène de « mûrissement Ostwald » (74).

$$PDI = \frac{\sigma}{Z \text{ average}}$$

$\sigma$  et  $Z$  average représentent respectivement la distribution de taille et la moyenne de taille des particules (75).

Pour effectuer la mesure, 70  $\mu$ l de nanosuspension non diluée sont déposés dans une cuvette de mesure. La mesure est réalisée 3 fois et le résultat correspond à la moyenne  $\pm$  écart-type.

### **II.3.2 Dosage indirect par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) après filtration**

Parallèlement à l'étude PCS, cette technique permet d'avoir une approche des pourcentages des nanocristaux présents. En effet, les nanocristaux sont recueillis dans le filtrat.

Pour l'analyse, des filtres disques d'ouverture de maille de 1,1  $\mu$ m ont été utilisés. Après filtration, le filtrat est analysé par une méthode CLHP générique du laboratoire. Le résultat est exprimé par le rapport entre la quantité de PA restant dans le filtrat et la quantité initiale présente dans la suspension.

### **II.3.3 Mesure de potentiel zêta**

La charge particulaire est l'un des facteurs déterminants de la stabilité des suspensions. Plus la charge est importante (de manière homogène) plus la répulsion électrostatique entre les particules est grande et plus le système est stable. Cette charge ou potentiel zêta correspond à la différence de potentiel entre le milieu de dispersion et la couche stationnaire de fluide qui entoure les particules dispersées (76). La valeur de potentiel zêta est calculée à partir de l'équation de Henry selon la mobilité électrophorétique. La mobilité électrophorétique est obtenue par la mesure de vitesse de migration électrostatique des particules par le vélocimètre de laser Doppler.

$$\text{Equation de Henry : } U_E = \frac{2\xi z f(Ka)}{3\eta}$$

$U_E$  : mobilité électrophorétique

$\xi$  : constant diélectrique

$z$  : potentiel zéta

$f(Ka)$  : fonction de Henry

$\eta$  : viscosité

200 $\mu$ l de la nanosuspension ont été dilués dans 4,8 ml d'eau déionisée, puis la suspension diluée est injectée dans la cellule d'analyse du Zetasizer® (Malvern Instrument,UK). La mesure est réalisée 3 fois et le résultat correspond à la moyenne  $\pm$  écart-type.

### **II.3.4 Mesure de la viscosité**

La viscosité est un paramètre très important dans la mesure de la taille et du potentiel zéta des nanosuspension comme évoqué précédemment. La viscosité des préparations a été mesurée à 25°C avec le Wells–Brookfield Cone / Plate Digital viscosimètre (BRROKFIELD, USA) qui a un domaine de mesure de 1,7 à 32700 mPa.S.

### **II.3.5 Vérification de la forme cristalline de la substance après le processus**

#### **Diffraction par rayon X (XRPD)**

La diffractométrie de rayons X est une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X par la matière. La synchronisation de phase des rayons diffractés n'ayant lieu que sur la matière cristalline, cette dernière a été employée dans cette étude pour déceler d'éventuelles amorphisation du PA pendant les processus de réduction de taille.

Les culots de centrifugation de nanosuspensions ont été examinés au moyen du X-ray diffractometer Bruker AXS D8 Advance en mode rapide( $t=2,4'$ ) et en mode standard ( $t=12'$ ).

### ***II.3.5.1 Observation microscopique :***

Les échantillons de nanosuspensions ont été observés par microscopie (AXIO, Zeisse, Allemagne) avec une caméra numérique, à la lumière non polarisée et la lumière polarisée. On pourra ainsi déterminer la présence des grands agglomérats de taille supérieure à 2  $\mu\text{m}$  (limite de détection de Zetasizer<sup>®</sup>) qui ont pu se former pendant le stockage ou des particules dont la taille n'a pas été suffisamment réduite par le processus.

## **II.4 Méthode de fabrication de nanosuspensions**

Il existe plusieurs approches de fabrication des nanosuspensions : l'approche « Bottom-Up » consiste à précipiter la solution du composé en question dans un non solvant, et l'approche « Top-Down » consiste à réduire la taille des particules à partir des particules plus grandes. (77)

### ***II.4.1.1 Broyage humide (Wet milling)***

Le Broyage humide fait partie des approches « Top-Down » qui consiste à obtenir des nanoparticules à partir de celles de grande taille qui sont broyées dans une chambre de broyage contenant un milieu de dispersion (souvent de l'eau) et des stabilisants ioniques et/ou stériques. (77) La taille des particules obtenues est fonction de l'intensité du stress mécanique et du nombre de points de contact qui peut être augmenté par l'utilisation de billes de diamètre inférieur. L'énergie mécanique du système (rotatif, vibratoire ou sonique) est communiquée aux cristaux en question par compression-contrainte de cisaillement (1) (cf. figure 8). Les nanoparticules obtenues sont stabilisés par les stabilisants pour minimiser l'agglomération due à l'augmentation d'interface de contact entraînant une élévation de l'énergie de Gibbs qui est défavorable pour la stabilité du système (78).

### ***II.4.1.2 Solubilisation - réprécipitation - réduction de taille par ultrason***

Il s'agit de l'exploration de la méthode « Bottom - Up » dont le composé est dissous dans un solvant organique. Dans un second temps la solution est versée directement dans le milieu aqueux contenant des stabilisants entraînant la formation des cristaux, après. Puis cette suspension est soumise à l'ultrasonication pour réduire la taille des cristaux néoformés qui n'ont pas encore eu le temps de former des mailles bien solides.

Le système d'ultrasonication utilisé est le "Adaptative Focused Acoustics" (AFA) fonctionnant par transmission de paquets d'ondes d'énergie acoustique focalisée depuis un transducteur à l'échantillon (cf Figure 30). Les ondes d'énergie acoustique convergent vers une petite zone de l'échantillon ; cette énergie traverse l'échantillon et provoque des bulles à partir du gaz initialement dissout, puis l'énergie est libérée en générant un jet de soluté localisé à une vitesse élevée et intense quand les bulles s'éclatent. En raison du grand nombre de bulles (environ 100000 bulles par seconde) et du court l'intervalle du temps (micro secondes), la capacité de mixer/ désintégrer du processus est remarquable.

La longueur d'onde est de 1 mm et les fréquences peuvent varier de 500 to 1000 kHz (79).

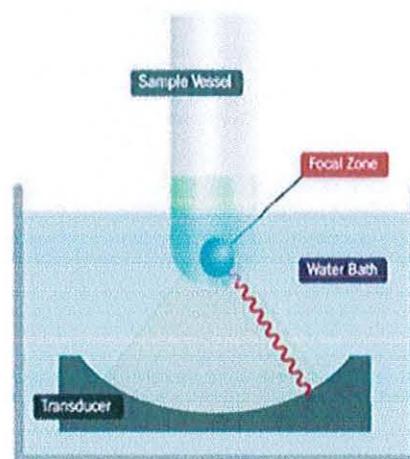


Figure 30 : Schéma du système AFA

### III. Résultats

#### III.1 Résultats de procédé de « Top Down » par broyage

##### III.1.1 Effets de stabilisants

Un screening de différentes associations de polymères et de stabilisants ioniques les plus couramment cités dans la littérature a été réalisé dans un premier temps. Les nanosuspensions ont été fabriquées avec la méthode de broyage dans des conditions identiques : 50 billes de 2 mm en acier inoxydable et 4 ml de mélange de stabilisants avec PA sont chargés dans la chambre de broyage (12 ml en acier inoxydable). La durée de broyage au broyeur planétaire est de 3 h à la vitesse de 650 rpm. Ensuite la taille est mesurée par la méthode filtration-

dosage CLHP, le résultat est exprimé en pourcentage de particules ayant traversé le filtre par rapport à la quantité initiale du principe actif.

Quel que soit le procédé de fabrication, l'effet des stabilisants reste constant. Le résultat de ce screening est présenté dans la figure 31.

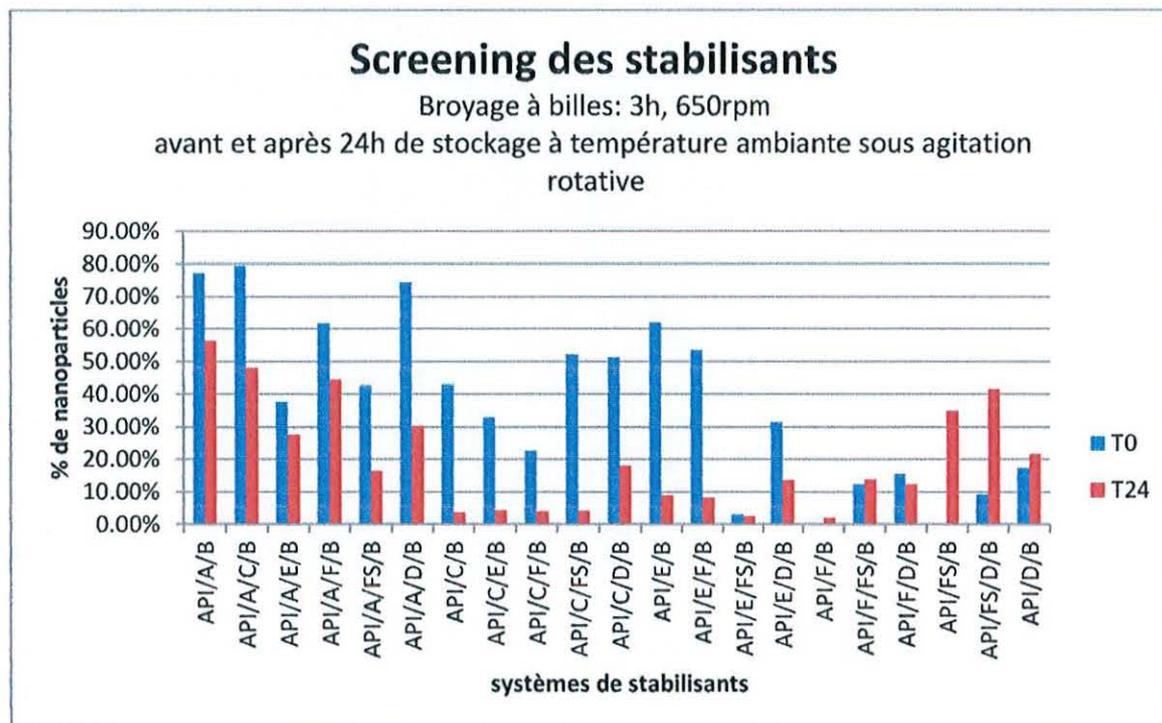


Figure 31: Résultats de screening des groupes de stabilisants

Le groupe contenant le stabilisant A a montré un meilleur potentiel après 24 heures de stockage à température ambiante sous agitation rotative. Les tests suivants ont été réalisés avec ce groupe de stabilisants quel que soit le procédé de fabrication

### III.1.2 Choix de billes de broyage et de rapport vitesse / fréquence de broyeur

Suite aux tests d'orientation en utilisant les différents types de billes cités précédemment, celles en oxyde de zirconium de diamètre de 0,5 mm ont été choisies pour le reste des essais.

La vitesse de rotation a été fixée à 650rpm pour le broyeur planétaire Retsch PM100, et la fréquence de vibration du Cryomill® a été fixée à 30Hz. Ces paramètres sont fixés pour la suite des essais.

### III.1.3 Cinétique de réduction de taille du composé A par broyeur à vibrations

Une étude cinétique est nécessaire pour comprendre l'évolution de la réduction de taille au fil du temps. L'étude a été réalisée avec 3 suspensions de 2ml, dont chacune contient 10mg/ml du composé A et les stabilisants sélectionnés dans l'étape précédente. La fréquence de vibration est de 30Hz. Aux différents temps (1h, 1,5h, 3h, 4h), 70  $\mu$ l de nanosuspension ont été prélevés à chaque point pour effectuer la mesure de taille et 10  $\mu$ l ont été dédiés à l'observation microscopique. La cinétique de réduction de taille est décrite dans la figure 32.

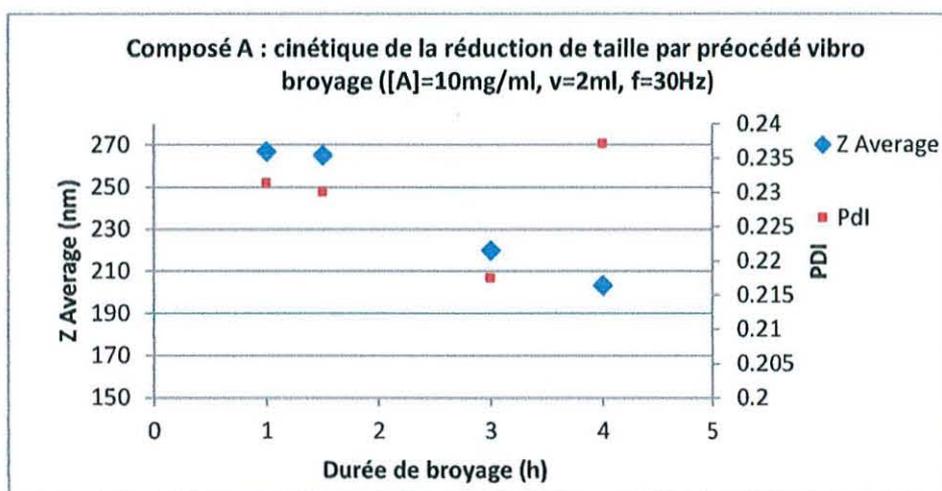


Figure 32 : Résultat de la cinétique de réduction de taille et de la PDI par broyage à vibrations (n= 3 a été réalisé pour le point de 3 heures)

Pour le point  $t=3$  h qui offre une valeur de Z Average et de PDI satisfaisante, les essais ont été répétés 3 fois ; peu de variabilité a été constatée entre les préparations (Z average = 219,8  $\pm$  10 nm, et PDI = 0,217  $\pm$  0,01).

La vitesse de diminution de taille est importante au début du processus (0-1 h) puis elle est ensuite ralentie. Une durée plus longue est donc nécessaire pour observer davantage de réduction de taille (de 1 à 3 h). Ce type de profil est souvent rencontré dans la réduction de taille quel que soit le procédé employé.

### III.1.4 Essais avec ou sans l'ajout de produit anti mousse

Le procédé par vibro broyage génère beaucoup de bulles très fines en raison de sa fréquence relativement élevée (30Hz) et de la présence de surfactant dans le système de stabilisant. Cette présence de bulles pose des difficultés pour récupérer la nanosuspension du conteneur

car les billes de broyage sont mélangées dans les bulles. Aussi, les bulles de très petite taille perturbent la mesure de taille des nanoparticules par Zetasizer®.du composé en question Par conséquent, un anti-mousse dont le Dow Corning® 1510 a été ajouté à 0,1% (m /m) dans la formulation pour optimiser le procédé. Comme montré figure suivante, l'efficacité anti-mousse de Dow Corning® 1510 est incontestable par rapport à la formulation sans anti-mousse issue du procédé identique.



Figure 33 : Préparation d'une nanosuspension du composé A par le procédé de broyage à vibrations. Photo à gauche : préparation sans additif anti-moussant; à droite : préparation avec additif anti-moussant

Une mesure de taille a été réalisée pour les 2 échantillons après le broyage et après un stockage statique à température ambiante pendant 4 heures. La présence de Dow Corning® 1510 ne semble pas favoriser la croissance des nanocristaux après 4 heures de stockage<sup>5</sup> (cf. tableau VI).

Tableau VI : Résultats de taille et PDI (mesurée à T<sub>0</sub> et après 4 h de stockage à température ambiante) de la formulation du composé A avec ou sans produit anti-mousse

Nanosuspension du composé A (10mg/ml)	Taille à T <sub>0</sub> (nm) (n=3)	PDI à T <sub>0</sub> (n=3)	Taille à T = 4 h (nm) (n=3)	PDI à T = 4 h (n=3)
Sans anti-mousse	203,55 ±12	0.23±0.02	192,45 ± 2	0,217 ±0,02
Avec anti-mousse	185,77 ± 9	0,24 ±0,02	206,99 ± 32	0,271 ± 0,09

<sup>5</sup> Dans le cadre des études précliniques, les 4 heures correspondent au délai maximal entre la formulation et la fin d'administration chez les animaux.

### III.1.5 Cinétique de réduction de taille du composé A par broyeur planétaire

Une étude cinétique est nécessaire pour comprendre l'évolution de la réduction de taille au fil du temps. L'étude a été réalisée avec 3 suspensions de 2ml contenant 10mg/ml de composé A et des stabilisants sélectionnés dans l'étape précédente (cf. figure 34). La vitesse de rotation est de 650rpm. 70  $\mu$ l de nanosuspension ont été prélevés aux différents temps (1h, 2h, 3h) pour effectuer la mesure de taille et 10  $\mu$ l ont été dédiés à l'observation microscopique.

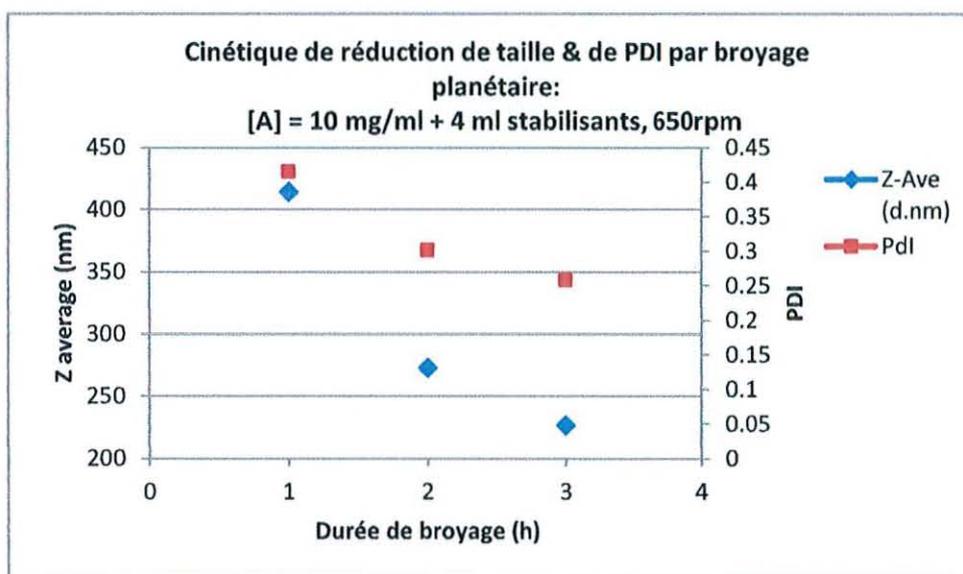


Figure 34 : Résultat de la cinétique de réduction de taille de la distribution de taille (PDI) par broyage planétaire (n=3 pour le point de 3 heures)

Pour le point  $t=3$  h qui offre une valeur de Z Average et de PDI satisfaisante, les essais ont été répétés 3 fois. Peu de variabilité a été constatée entre les préparations : Z average =  $231,72 \pm 15$  nm, et PDI =  $0,26 \pm 0,04$ .

La vitesse de diminution de taille est importante au début du processus (0-1 h), car la taille de la poudre est descendue à l'échelle micrométrique (moins de 500nm), puis cette vitesse est ensuite ralentie. Une durée plus longue est donc nécessaire pour observer davantage de réduction de taille (de 1 à 3 h). Ce type de profil est souvent rencontré dans la réduction de taille quel que soit le procédé employé.

### III.1.6 Essais de stabilité

Les essais de stabilité des nanosuspensions ont été réalisés par 3 cycles successifs de congélation-décongélation : 3 nanosuspensions de 4 ml du composé A (obtenus par le broyeur planétaire Retsch PM 100) ont été congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  puis décongelées dans un bain-marie thermostaté à  $25^{\circ}\text{C}$ . A chaque cycle, une mesure de taille par Zetasizer<sup>®</sup> a été effectuée, dont les résultats sont exposés dans les figures suivantes.

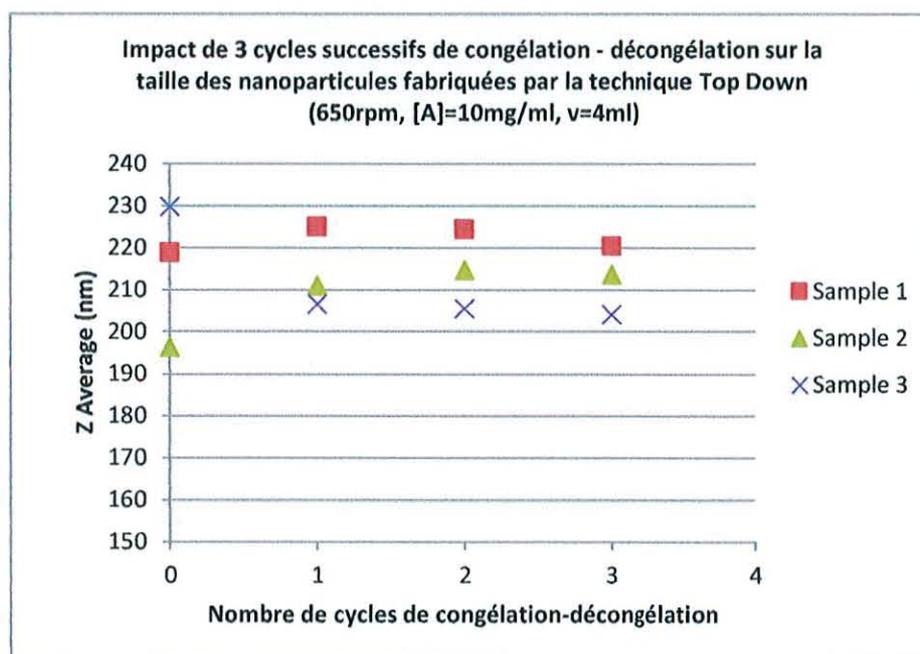


Figure 35 : Impact des cycles successifs de congélation-décongélation sur la taille des particules

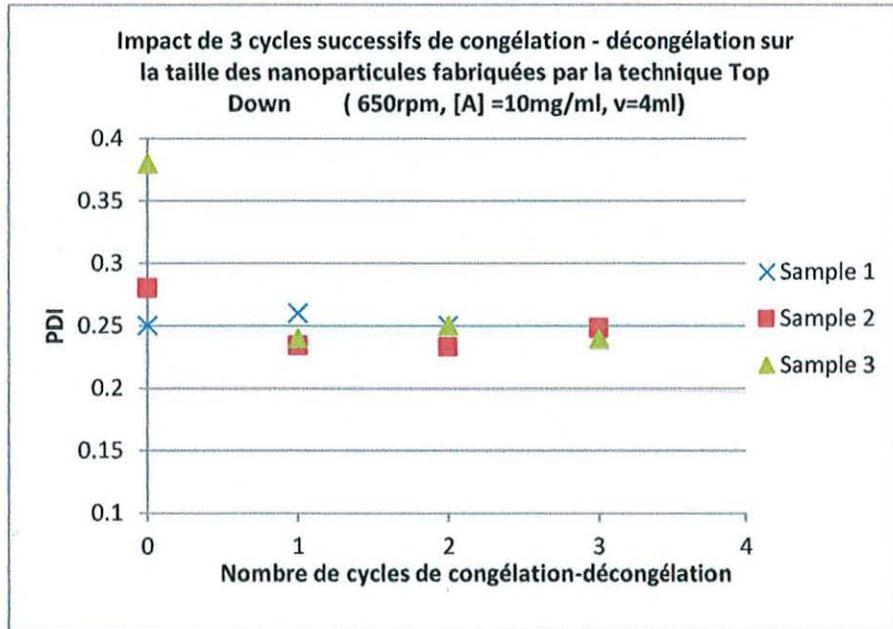


Figure 36 : Impact des cycles successifs de congélation-décongélation sur la polydispersité de taille des particules

Au cours des 3 cycles, il n'y a pas de grossissement significatif des particules, et la distribution de taille (traduit par l'indice de polydispersité) reste aussi stable.

### III.1.7 Essais sur d'autres composés

Pour connaître les paramètres critiques de la technique « Top Down » déterminés préalablement avec le composé A, deux autres molécules (indométhacine, mébendazole) ont été testées selon les mêmes conditions, les résultats de la réduction de taille sont présentés dans les figures 37 et 38.

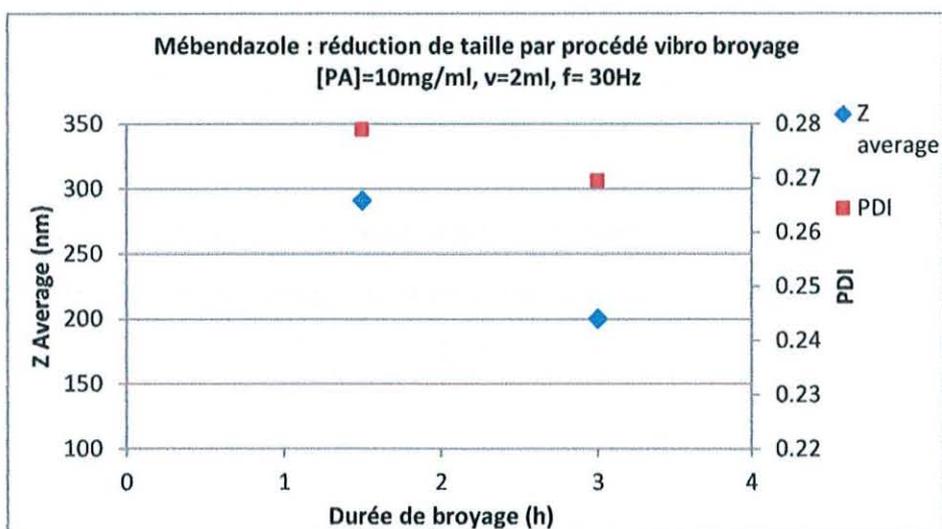


Figure 37 : Résultats de la réduction de la taille et de la PDI du mébendazole par le procédé de vibro broyage

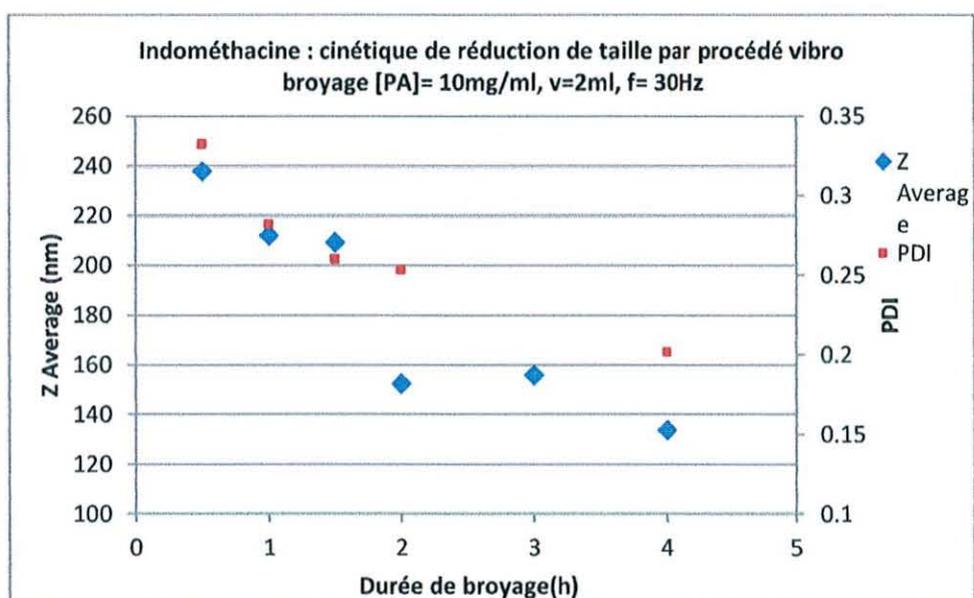


Figure 38 : Résultats de la réduction de la taille et de la PDI de l'indométhacine par le procédé de vibro broyage

La réduction de taille et de distribution de taille a été aussi efficace pour ces 2 molécules en employant les mêmes conditions que pour le composé A. Les essais ont été répétés 3 fois pour

chaque molécule pendant une durée de 3 heures, les résultats sont exposés dans le tableau suivant :

**Tableau VII : Résultats de la taille et de la PDI des nanosuspensions du mébendazole et de l'indométhacine obtenus par le broyage à vibrations (t =3h)**

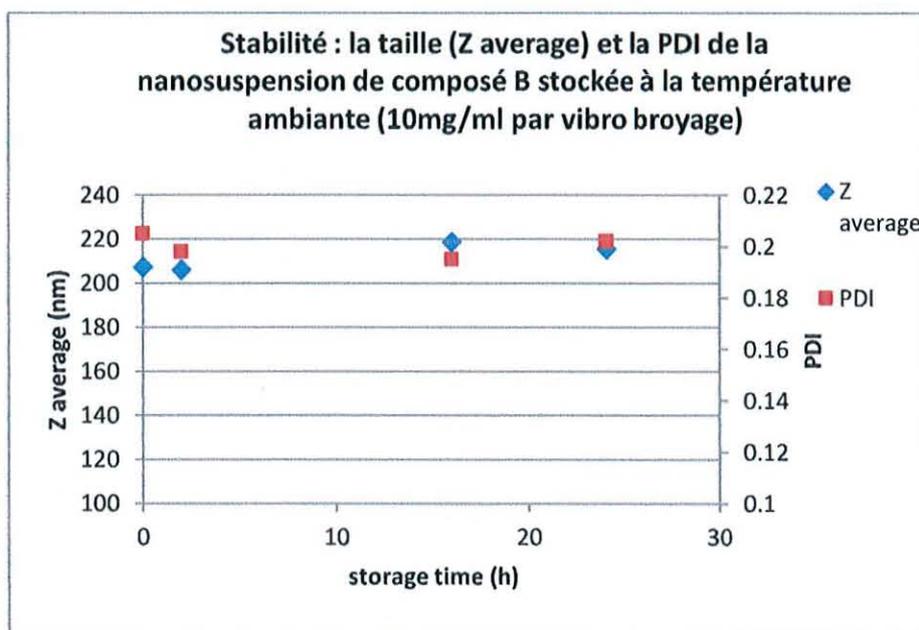
Molécule	Taille (nm) (n=3)	PDI (n=3)
Mébendazole	200,2 ± 3	0,27 ± 0,02
Indométhacine	152,5 ± 14	0,25 ± 0,07

Le composé B a été formulé dans les mêmes conditions. Etant donné qu'il s'agit d'une molécule en cours de développement, la quantité de produit disponible pour les essais était restreinte, donc la formulation n'a été réalisée qu'une seule fois.

La taille moyenne obtenue après le processus de broyage à vibration est de 207,3 nm, et la PDI est de 0,205. Donc les résultats sont comparables aux autres composés testés.

Les photos du microscope optique des deux composés avant et après la réduction de taille sont présentées dans les figures 40 et 41.

La stabilité de cette nanosuspension a été testée, en plaçant l'échantillon à la température ambiante pendant 24 heures et la mesure de taille a ensuite été réalisée aux différents temps. Cette nanosuspension reste stable pendant 24 heures comme le montrent les résultats de la figure 39.



**Figure 39 : Test de stabilité physique (taille & PDI) de la nanosuspension du composé B**

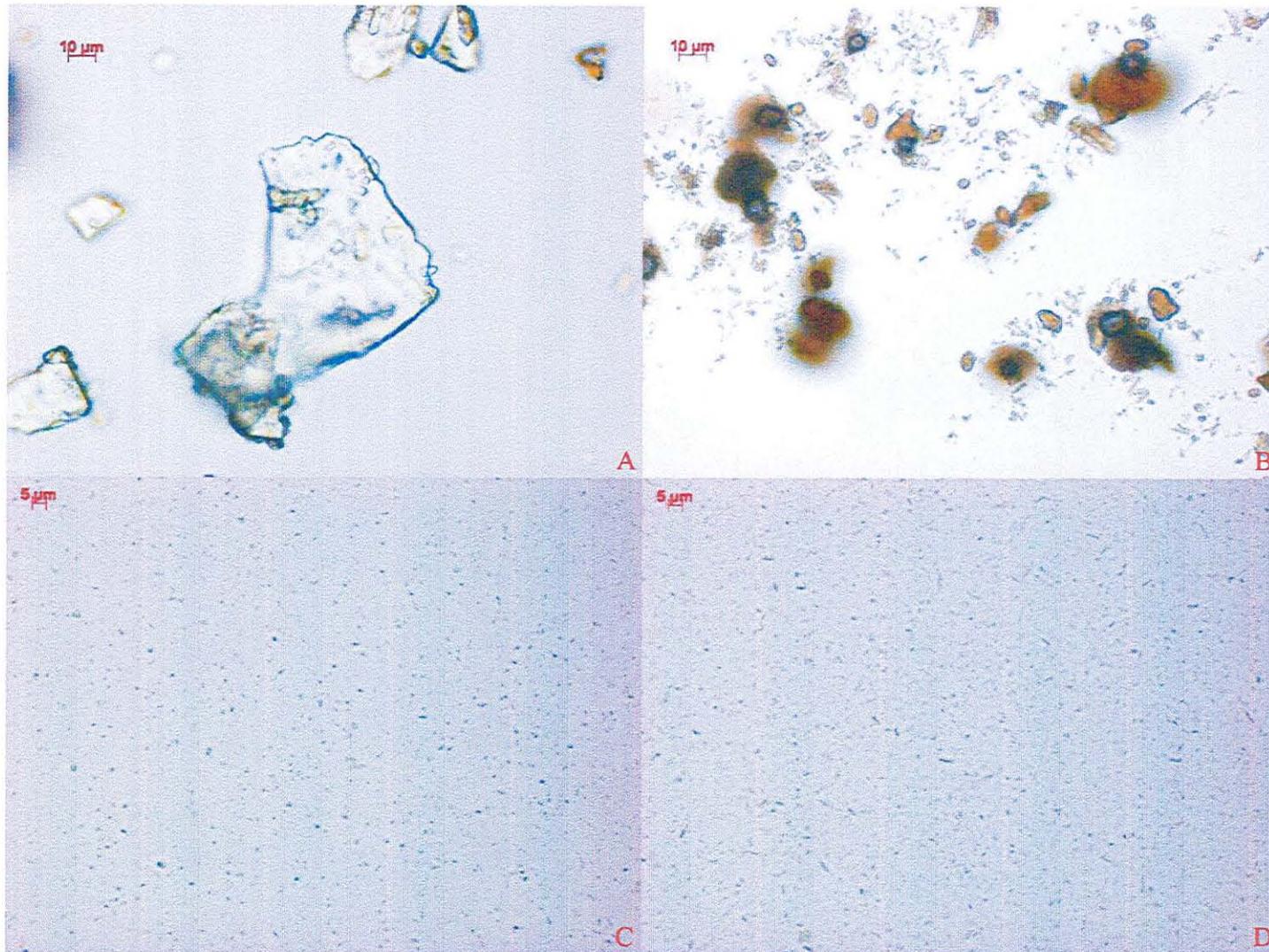


Figure 40 : Clichés microscopiques (grossissement x630) en lumière non polarisée. Photo A: indométhacine non réduit ; photo B : mébendazole non réduit; photo C : indométhacine réduit après 3h de broyage à vibration ; photo D : mébendazole après 3h de broyage à vibration

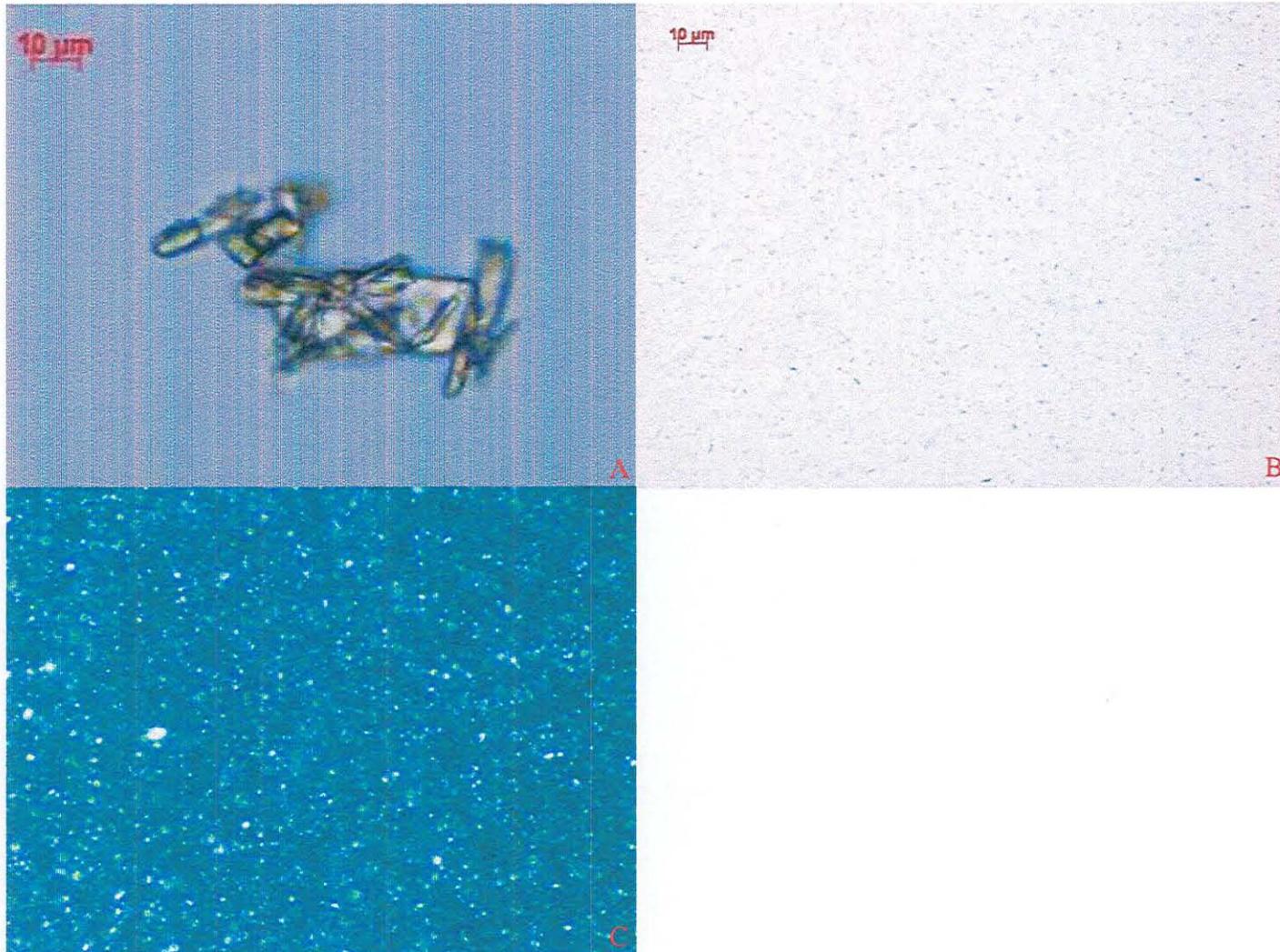


Figure 41 : Clichés microscopiques ( grossissement x630 ). Photo A: composé B non réduit ; photo B : composé A réduit après 3h de broyage à vibration (lumière non polarisée); photo C : composé B réduit après 3h de broyage à vibration (lumière polarisée)

### III.1.8 Comparaison des résultats obtenus par les 2 types de broyage

Le vibro broyage et le broyage planétaire font partie tous les deux de la technique « Top Down », donc le principe de réduction de taille est identique. Les études (n=3) ont été réalisées dans les conditions similaires : diamètre de bille de broyage de 0,5 mm, ratio volume de bille / volume de conteneur de 0,5, concentration en principe actif de 10 mg/ml. Le même système de stabilisant a été utilisé pour les 2 approches et la durée de broyage était de 3 h.

Les 2 techniques sont efficaces en termes de réduction de taille et de sa distribution comme l'indique le tableau VII.

Tableau VIII : Comparaison des 2 techniques de broyage pour la production de nanosuspension du composé A

	Z Average (nm) (n=3)	PDI (n=3)	Contrôle de la température	Présence de mousse
Vibro Broyeur	219 ± 10	0,217 ± 0,01	Possible	+++
Broyeur planétaire	231 ± 15	0,26 ± 0,04	Impossible	+

Le réchauffement dû aux forces de broyage est important dans les deux cas ; une élévation de température de 30°C de la suspension a été constatée après 3 h de broyage.

Les photos du microscope optique du composé A avant et après la réduction de taille par les 2 types de broyage sont présentées dans la figure 42.

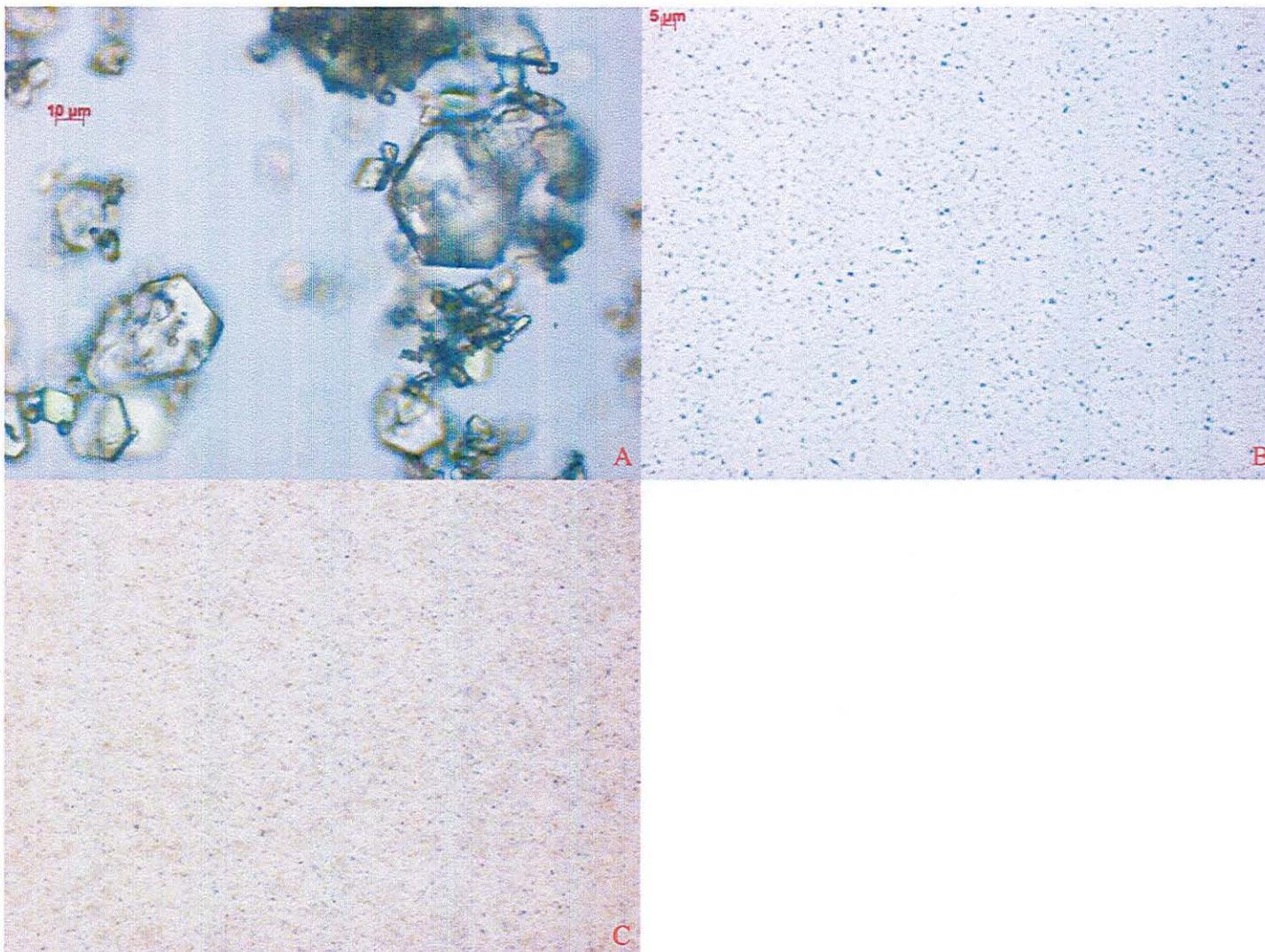


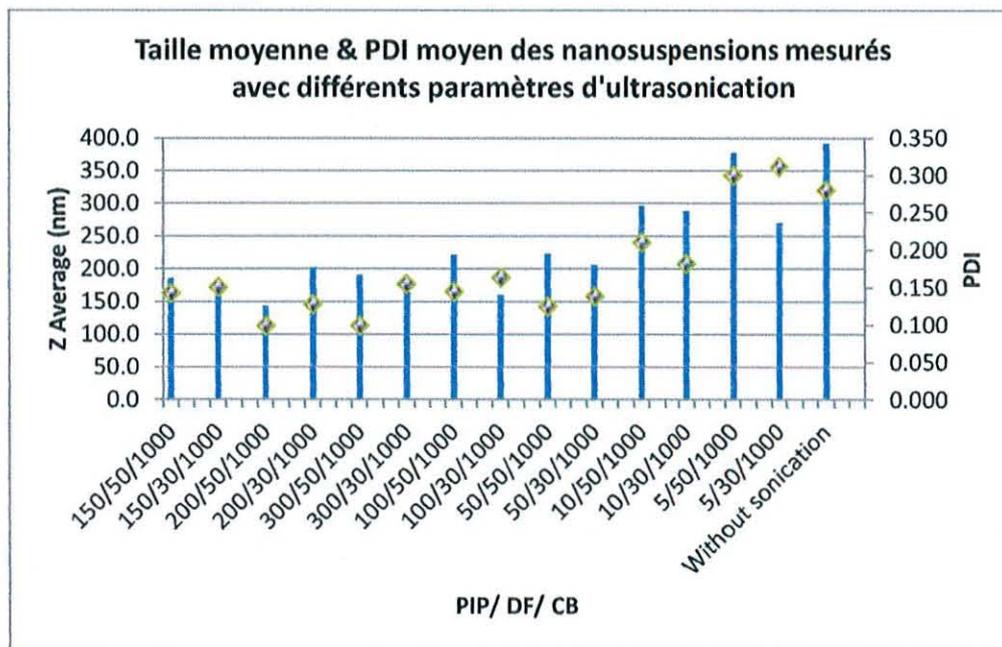
Figure 42: Clichés microscopiques grossissement (x630), à lumière non polarisée. Photo A: composé A non réduit ; photo B : composé A réduit après 3h de broyage planétaire; photo C : composé A réduit après 3h de broyage à vibration

## III.2 Résultats de procédé « Bottom Up » avec ultrasons

### III.2.1 Screening des paramètres de l'appareil ultrasons Covaris®

Puisque les 3 paramètres PIP/DF/CB conditionnent l'énergie acoustique totale transmise à l'échantillon, un screening des 3 paramètres permet de comprendre la relation entre la taille des particules et l'énergie envoyée. L'étude a été réalisée avec des suspensions de 1ml chacune contenant 10mg de composé A et du même groupe de stabilisant sélectionné précédemment. Après 20 minutes de sonication selon les différents niveaux d'énergie, 70  $\mu$ l de nanosuspension ont été prélevés pour effectuer la mesure de taille et 10  $\mu$ l pour observation microscopique.

Comme démontré par la figure 43, il existe un niveau d'énergie minimale du procédé nécessaire pour obtenir une nanosuspension possédant taille moyenne et PDI satisfaisante ; lorsque le processus descend en dessous de ce seuil les particules restent proches de l'état de précipitation sans sonication.

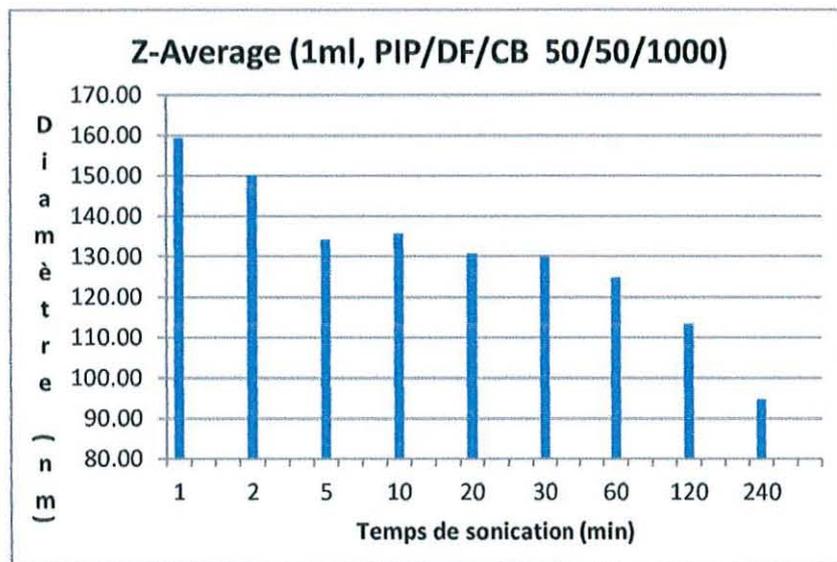


**Légende :** ■ Z Average de la nanosuspension mesuré à t=0      ✦ PDI de la nanosuspension mesuré à t=0

Figure 43: Screening des différents paramètres (PIP/DF/CB) de Covaris pour observer l'effet de l'énergie acoustique sur la taille des particules

### III.2.2 Etude cinétique de réduction de taille par ultrasonication

Une étude cinétique est nécessaire pour comprendre l'évolution de la réduction de taille au fil du temps. L'étude a été réalisée avec des suspensions de 1ml contenant chacune 10mg de composé A. Ensuite 70  $\mu$ l de nanosuspension ont été prélevés pour effectuer la mesure de taille et 10  $\mu$ l pour observation microscopique. La vitesse de diminution de taille est importante au début du processus (0-5 min) puis elle est ralentie. Une durée plus longue est donc nécessaire pour observer davantage de réduction de taille (120 min à 240 min). Ce type de profil est souvent rencontré dans la réduction de taille quel que soit le procédé employé.



Légende :  Valeur de Z Average mesurée après la sonication

Figure 44 : Cinétique de la réduction de taille par ultrasons

### III.2.3 Evaluation de la corrélation entre le volume de l'échantillon et la durée de sonication

Etant donné que le système AFA focalise les ondes acoustiques en un point de l'échantillon, le paramètre temps est critique pour avoir un processus de réduction de taille homogène et ceci est dépendant du volume de l'échantillon. L'énergie communiquée à l'échantillon est cumulable, donc une prolongation exagérée de la sonication risque de dégrader ou d'amorphiser la substance initiale. L'écart-type et la moyenne ont été calculés (n=3) pour les essais dont le premier test a montré une réduction de taille homogène et suffisante (cf. table

1). Peu de variabilité a été constatée entre ces différents échantillons du même volume issus du même procédé.

Les photos microscopiques des suspensions du composé A à chaque étape du procédé sont présentées dans la figure 68. On peut constater qu'il n'existe pratiquement plus de particules visibles au microscope optique pour 10ml de suspension après 90' de sonication.

Table 1 : Adaptation de la durée et de l'énergie de sonication en fonction du volume pour obtenir une nanosuspension homogène. n=3 a été réalisé pour les conditions minimales réussites

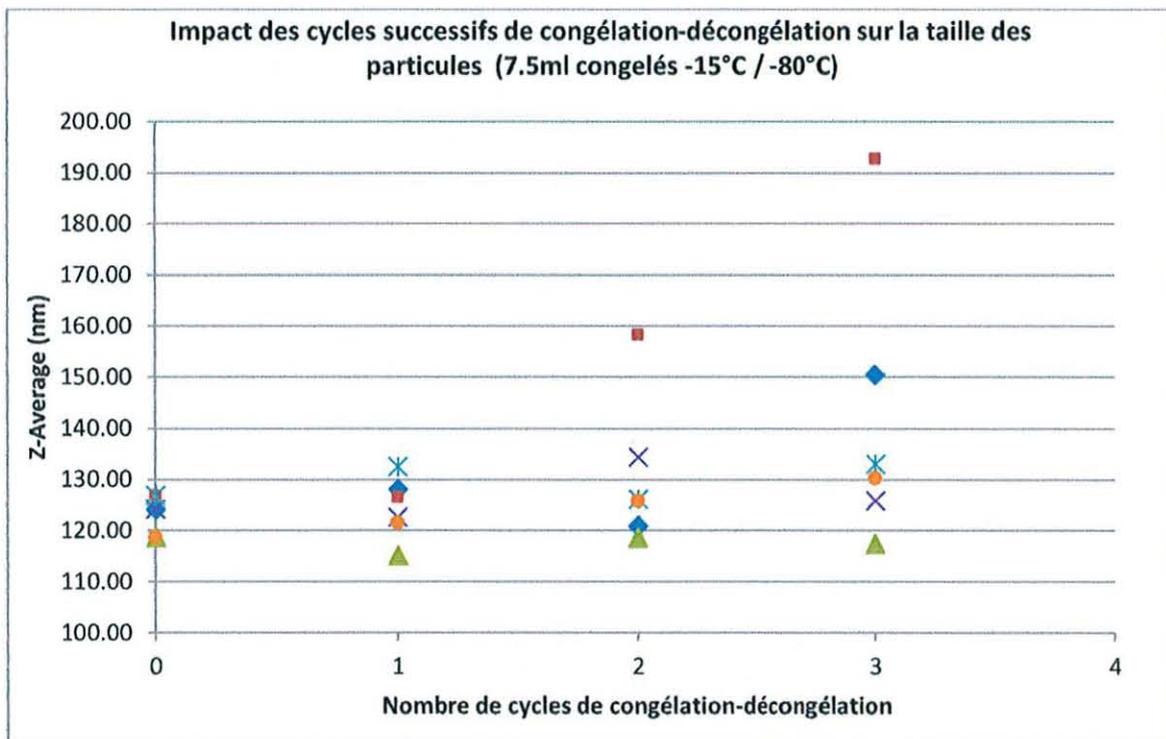
Sonication duration (min)	PIP 50w												PIP 300w							
	1ml 20min				2ml 30min				5ml 90min				10ml 90min				15ml (300w 60min)			
	Z average (nm)	Ecart type taille (nm)	PDI	Ecart type PDI	Z average (nm)	Ecart type taille (nm)	PDI	Ecart type PDI	Z average (nm)	Ecart type taille (nm)	PDI	Ecart type PDI	Z average (nm)	Ecart type taille (nm)	PDI	Ecart type PDI	Z average (nm)	Ecart type taille (nm)	PDI	Ecart type PDI
20	131.733	8.7	0.145	0.018	147.2667		0.203		141.867		0.1613									
30					144.1667	5.8452	0.194	0.040	135.73		0.15		148.63		0.19		133.43		0.13	
40					136.533		0.143		135.27		0.17									
50																				
60									141.33		0.21						133.22	3.06	0.16	0.032066
70													143.40		0.20					
90									128.42	7.59	0.14	0.02	135.81	1.51	0.16	0.03	139.5		139.5	



Figure 45 : Photos de gauche à droite : Suspension de A à l'état initial cristallin; Suspension amorphe obtenue par solubilisation-précipitation du composé A; 10ml de suspension après 90' de sonication

### III.2.4 Essais de stabilité

Les essais de stabilité des nanosuspensions obtenues par le procédé solubilisation – précipitation – sonication ont été réalisés par 3 cycles successifs de congélation-décongélation : 3 différentes préparations de 15 ml de nanosuspension ont été séparées en 2 (7,5ml) et congelé à différentes températures (-80°C & -15°C) ensuite décongelé dans un bain marie thermosté à 25°C. A chaque cycle, une mesure de taille par Zetasizer® a été effectuée, les résultats sont exposés dans les figures suivantes.



**Légende :**

- ◆ Echantillon 1 conservé à -15°C
- Echantillon 2 conservé à -15°C
- ▲ Echantillon 3 conservé à -15°C
- × Echantillon 1 conservé à -80°C
- × Echantillon 2 conservé à -80°C
- Echantillon 3 conservé à -80°C

Les 3 nanosuspensions congelées à -80°C sont restées stables durant les essais. En revanche, l'échantillon N°2 conservé à -15°C a connu une augmentation de taille après chaque cycle.

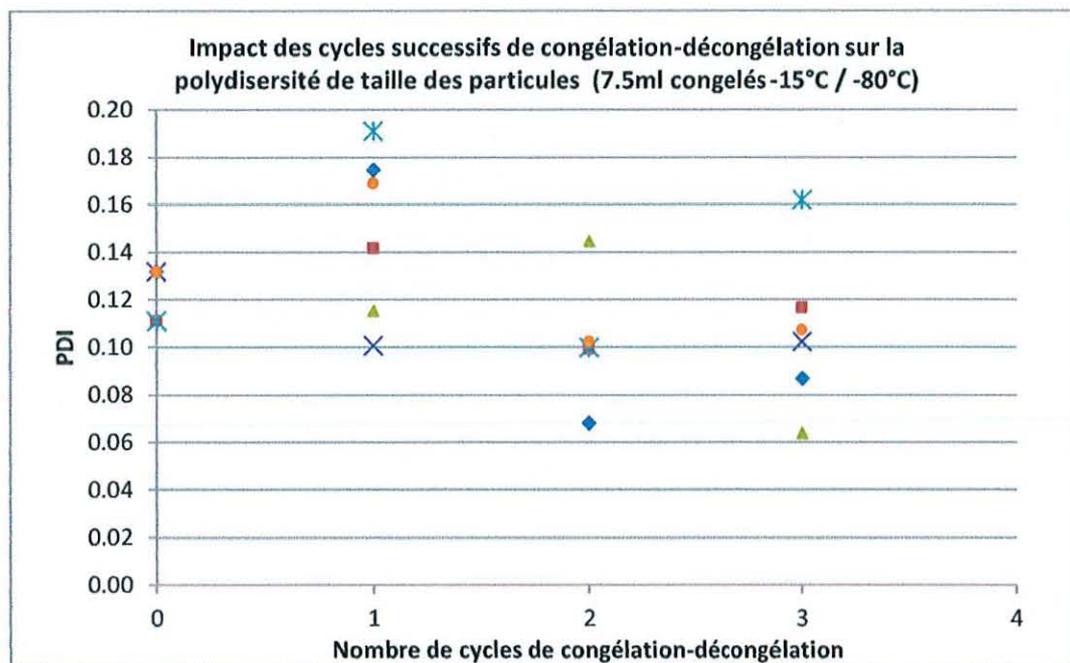


Figure 46 : Impact des cycles successifs de congélation-décongélation sur la polydispersité de taille des particules

### III.2.5 Essais sur d'autres composés

L'indométhacine et le mébendazole qui sont de molécules peu hydrosolubles, ont été testés avec la même approche consistant en la solubilisation des principes actifs dans du DMSO, puis précipitation dans une solution aqueuse contenant des stabilisants déterminés précédemment. La suspension formée subit ensuite une sonication.

Certaines difficultés ont été observées pendant ces expériences :

- La réduction de taille de l'indométhacine par ultrasons conduit à une très forte augmentation de la solubilité à saturation. La sonication conduit facilement à une solution sursaturée (liquide limpide) même si l'énergie communiquée et la durée restent modestes par rapport aux protocoles usuels (80) (81) et aux données obtenues avec le composé A. Cette solution sursaturée est métastable et des floclés ont été observés après 24 heures de stockage statique à température ambiante.

- Le mébendazole a connu un problème de solubilisation, il est quasi insoluble dans les alcools, et sa solubilité dans le DMSO est inférieure à 50 mg/ ml. Par conséquent, la concentration finale dans la suspension est faible donc ne répond pas aux besoins des essais précliniques.

L'approche Bottom Up n'a pas permis d'obtenir d'une nanosuspension stable de composé B, contrairement à l'approche Top Down. En effet, la croissance des cristaux a eu lieu pendant la sonication mais avec une cinétique plus importante. On a donc observé des cristaux de taille de plus en plus importante comme on peut le voir dans la figure suivante.

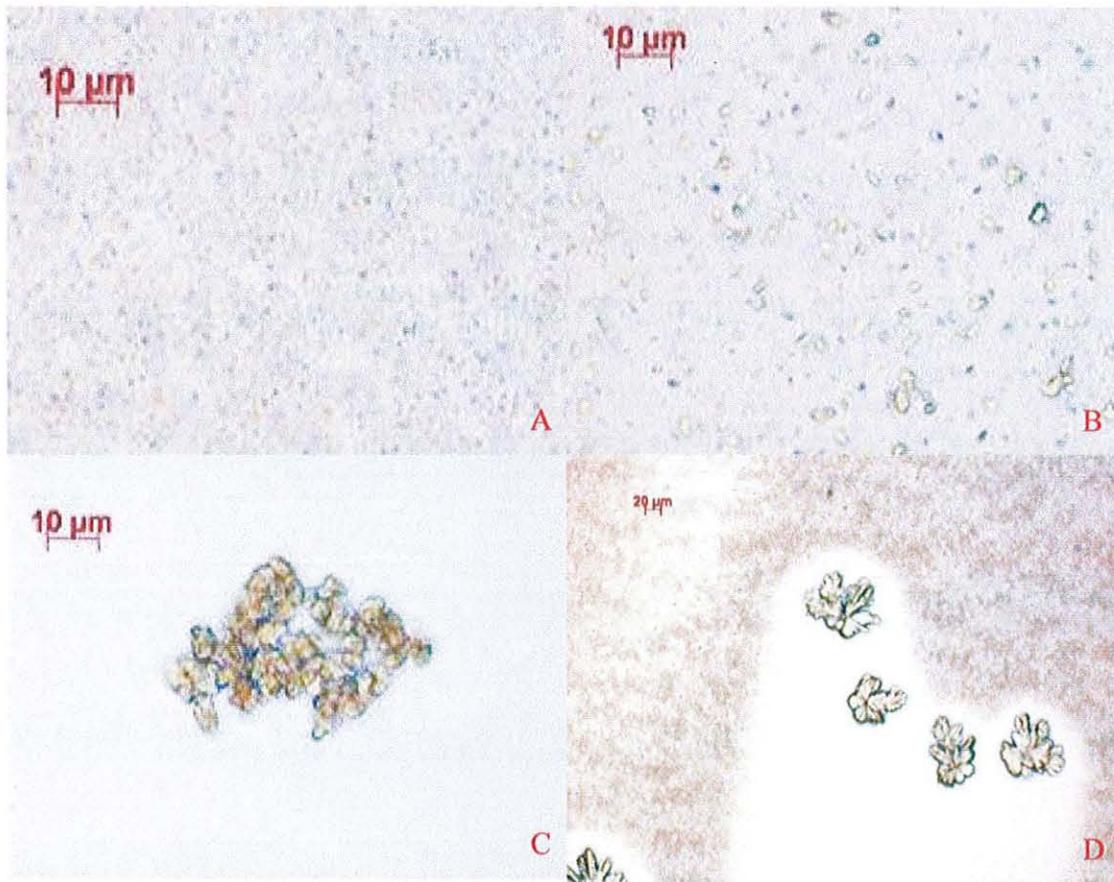
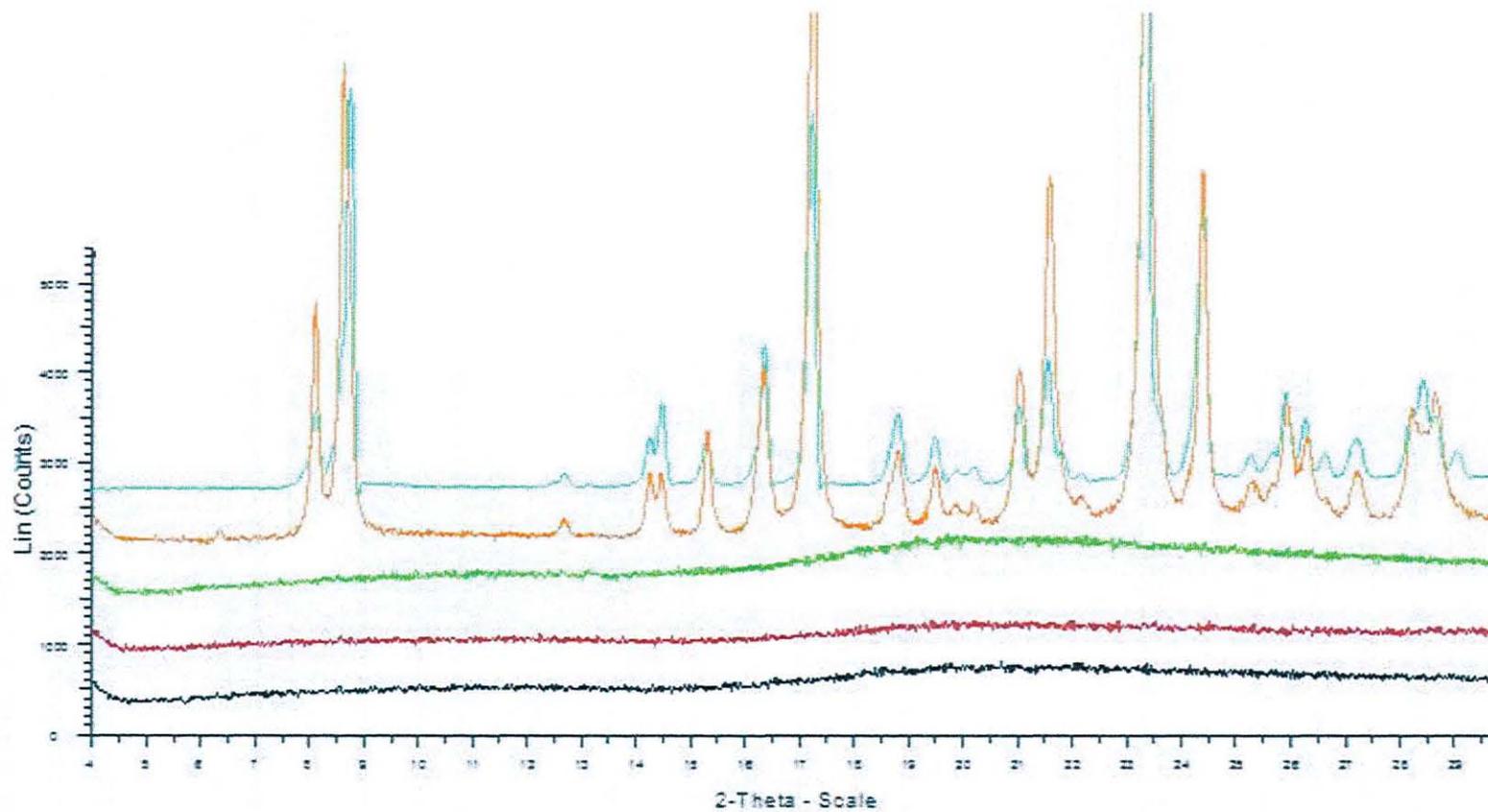


Figure 47 : Formulation de composé B par l'approche Bottom Up. Photo A, 2minutes après la précipitation. Photo B, suspension de composé B après 60min de sonication. Photo C : suspension de composé C après 220 min de sonication. Photo D : croissance de cristaux pendant 60 min à température ambiante et sans sonication

### III.3 Diffraction par rayon X

Quatre échantillons de nanosuspension du composé A ont été examinés, dont une nanosuspension préparée par broyage à vibration, une par solubilisation-précipitation-sonication ainsi que 2 échantillons des tests de stabilité conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  /  $-15^{\circ}\text{C}$ . Le résultat montre que le procédé « solubilisation-précipitation-sonication » a amorphisé le principe actif et cet état amorphe est conservé lors du stockage en phase congelée. En revanche, le procédé de vibro-broyage a conservé la forme cristalline du principe actif puisque son profil XRPD correspond à la forme hydratée du principe actif en question. Les résultats de XRPD sont présentés dans la figure 48.



**Légende :**    — Echantillon de la nanosuspension du composé A congelé à -80°C    — Nanosuspension du composé A obtenue par approche Bottom-Up  
                  — Echantillon de la nanosuspension du composé A congelé à -15°C    — Nanosuspension du composé A obtenue par vibro-broyage  
                  — Forme hydratée du composé A comme référence de comparaison

Figure 48 : Résultats de diffraction par rayons X sur les 4 échantillons en comparaison avec l'hydrate du PA

décongélation) ; vérification de l'état cristallin/ amorphe des nanoparticules par la diffraction par rayon X.

Deux types de techniques de fabrication des nanosuspensions ont été employées durant ce travail : broyage à bille et solubilisation - reprécipitation- sonication.

La technique par broyage est la méthode la plus utilisée dans la fabrication industrielle de nanocristaux. Mais le procédé de broyage risque de générer des petites particules de matériels de broyage dûes aux collisions et forces de cisaillement entre les billes et le conteneur de broyage, donc risque de contamination de la formulation ce qui n'est pas acceptable dans l'industrie pharmaceutique. Cette contamination a été observée pendant les essais avec différentes billes de broyage. Il est avéré que le dioxyde de zirconium est le matériau de choix pour ce type de procédé grâce à sa dureté élevée. Par ailleurs on constate également que les billes de faible diamètre donc de moindre masse, ont moins de force d'impact pendant le procédé et permettent par conséquent de diminuer le risque de perte en matériau de broyage.

## Conclusion

---

Depuis deux décennies, de plus en plus de molécules peu hydrosolubles sont entrées dans le pipeline des industriels pharmaceutiques. Plusieurs approches galéniques sont maintenant disponibles pour améliorer la solubilité dans l'eau de ces molécules-candidates de classe II et de classe IV du BCS (par exemple, systèmes de dispersions solides amorphes, formation de sel ou de prodrug, complexation avec les excipients hydrosolubles, self-emulsifying drug-delivery systems (SEDDS), etc...

Les nanosuspensions font partie de ces nouvelles approches et elles possèdent de nombreux avantages par rapport aux autres techniques. Ce travail a abordé la fabrication des nanosuspensions dans le cadre du stage réalisé dans le service de la formulation préclinique d'UCB. Les 2 principales approches de fabrication (Top Down, Bottom -Up) ont été investiguées.

L'effet des stabilisants a été étudié sur un groupe restreint de mélange de polymères et de surfactants qui ont été présélectionnés selon les résultats de la littérature. L'effet de stabilisation a été vérifié lors du stockage des nanosuspensions à la température ambiante et les cycles successifs de congélation-décongélation. Pour une meilleure stabilité physique, il faut conserver les nanosuspensions à -80°C.

Deux équipements de broyage ont été utilisés (approche Top Down), dont le broyeur planétaire Retsch PM100 et le broyeur à vibration Cryomill<sup>®</sup>. Les billes de broyage en dioxyde de zirconium de 0,5 mm ont été choisies pour minimiser l'érosion des matériels de broyage. Les 2 équipements sont capables de réduire la taille de particules micrométriques à l'échelle nanométrique de manière homogène après 3 heures de broyage ; les mêmes résultats ont été obtenus avec 3 molécules différentes.

La méthode de solubilisation - précipitation – sonication par ultrasons focalisés (approche Bottom Up) a montré une grande efficacité et une excellente performance en termes de réduction de taille pendant un temps plus court par rapport aux méthodes de broyage. Un avantage par rapport aux méthodes de broyage est d'éviter la contamination de la nanosuspension par les matériels utilisés.

L'efficacité extrême de la méthode de solubilisation – précipitation – sonication en termes de réduction de taille présente un risque d'augmentation importante de la solubilité à saturation de certains composés, ce qui peut amener à la dissolution des nanoparticules et conduire à une solution métastable. Donc dans une prochaine étape, il faudrait analyser la corrélation entre les caractéristiques de la molécule (par exemple le point de fusion, la dureté du composé) et l'énergie critique de l'appareil à ultrasons. Cette compréhension permettra d'élaborer un arbre décisionnel pour formuler les nouvelles molécules avec cette technique.

Pendant ce stage, de nombreuses techniques ont été utilisées, les données générées pourront participer à la construction de l'espace de conception au sein du service. Cette démarche facilitera le futur travail du service de préformulation qui doit faire face très souvent à des nouvelles entités chimiques aux caractéristiques très différentes des anciennes molécules.

## Bibliographie

1. **BARRETT RAINBOW.** *Nanosuspensions in drug delivery.* Nature. 3, 785-796, 2004.
2. **MERISKO-LIVERSIDGE E, LIVERSIDGE GG, COOPER ER.** *Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds.* European Journal of Pharmaceutical Sciences. 18, 427-440, 2003.
3. **DI L, FISH PV, MANO T.** *Bridging solubility between drug discovery and development.* Drug Discovery Today. 17, 486-495, 2012.
4. **GL AMIDON, HANS LENNERNAS, VINO P. SHAH, JHON R. CRISON.** *The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability.* Pharmaceutical Research. 12, 413-420, 1995.
5. **LEGRAIN YVES.** *Les biomédicaments : Des opportunités à saisir pour l'industrie pharmaceutique.* Avis et rapports du Conseil Economique, Social et Environnemental. Séance des 9 et 10 juin 2009.
6. **MICHAEL DISKSON, JEAN PAUL GAGNON.** *Key factors in the rising cost of new discovery and development.* Nature Reviews. 3, 417-429, 2004.
7. **SHAH AK, AGNIHOTRI SA.** *Recent advances and novel strategies in pre-clinical formulation development: an overview.* Journal of Controlled Release. 156, 281-296, 2011.
8. **ELAINE MERISKO-LIVERSIDGE, GARY G. LIVERSIDGE.** *Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology.* Advanced Drug Delivery Reviews. 63, 427- 440, 2011.
9. **PANDIT, NITA K.** *Introduction To The Pharmaceutical Sciences.* Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore. 2007. Page 149. ISBN-10: 0781744784.
10. **MICHEL VAUBOURDOLLE.** *Médicaments (3ème édition).* WOLTERS KLUWER, Rueil-Malmaison. 2007. Page 197. ISBN 978-2-915585-41-4.
11. **LEI GAO, DIANRUI ZHANG, MINGHUI CHEN.** *Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system.* Journal of Nanoparticle Research. 10, 845-862, 2008.
12. **NA G. C.** *Physical stability of ethyl diatrizoate nanocrystalline suspension in steam sterilization.* Pharmaceutical Research. 16, 569- 574, 1999.
13. **JENS-UWE A H JUNGHANNS, RAINER H MULLER.** *Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications.* International journal of nanomedicine. 3, 295- 309, 2008.

14. **VLADIMIR TORCHILIN.** *Nanoparticulates as Drug Carriers.* Imperial College Press, London, 2006. Page 308. ISBN 1-86094-630-J.
15. **V B PATRAVALE, ABHIJIT A DATE, R M KULKARNI.** *Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy.* Journal of Pharmacy and Pharmacology. 56, 827- 840 2004.
16. **JENNIFER, JONES.** *Étude des interfaces électrodes/électrolyte et des phénomènes de solubilité dans l'accumulateur lithium-ion.* Université François-Rabelais, 2010. Thèse d'université.
17. **H GELDERBLOM, J VERWEIJ, K NOOTER, A SPARREBOOM.** *Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation.* European Journal of Cancer. 37, 1590- 1598, 2001.
18. **RAINER H. MULLER, CORNELIA M. KECK.** *Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles.* Journal of Biotechnology. 113, 151–170, 2004.
19. **MOSCHWITZER JAN P.** *Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process.* International Journal of Pharmaceutics. 453, 142–156, 2012.
20. **WOLFGANG PEUKER A, HANS-CHRISTOPH SCHWARZER B, FRANK STENGER.** *Control of aggregation in production and handling of nanoparticles.* Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 44, 245–252, 2004.
21. **MITESH PATEL ET AL.** *Nano suspension: a novel approach for drug delivery system.* Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research. 1, 1-10, 2011.
22. **TARO TACHIBANA, AKIO NAKAMURA.** *A methode for preparing an aqueous colloidal dispersion of organic materials by using water-soluble polymers: Dispersion of B-carotene by polyvinylpyrrolidone.* BF01507758. 1965
23. **LIST M, SUCKER H.** *Pharmaceutical colloidal hydrosols for injection.* 2200048. GB Patent, 1988.
24. **M. P. COFFEY, P. M. GALLAGHER, VAL J. KRUKONIS.** *Gas anti-solvent recrystallization process.* US 5360478 A USA. U.S. PATENT, 1991.
25. **ANTHONY GODINAS, INGE B. HENRIKSEN, VAL KRUKONIS, K. Awadhesh Mishra, Gary W. Pace, G. Michael Vachon.** *Processes to generate submicron particles of water-insoluble compounds.* WO1999065469 A3. WO PATENT, 1999.

26. **H. DE WAARD, W.L.J. HINRICHS, H.W. FRIJLINK.** *A novel bottom-up process to produce drug nanocrystals: Controlled crystallization during freeze-drying.* Journal of Controlled Release. 128, 179- 183, 2008.
27. **JAMES E. KIPP, JOSEPH CHUNG TAK WONG, MARK J. DOTY, CHRISTINE L. REBBECK.** *Microprecipitation method for preparing submicron suspensions.* US7037528 B2 USA. U.S. PATENT, 2001.
28. **VIVEK KHARB, MEENAKSHI BHATIA, HARISH DUREJA, DEEPAK KAUSHIK.** *Nanoparticle Technology for the Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs.* Pharmaceutical Technology. 30, 82, 2006.
29. **HINRICHS, HANS DE WAARD, HENDERIK W. FRIJLINK, WOUTER L. J.** *Bottom-Up Preparation Techniques for Nanocrystals of Lipophilic Drugs.* Pharmaceutical Research. 28, 1220-1223, 2011.
30. **JOSEPH A. BRUNO, et al.** *Method of grinding pharmaceutical substances.* US5518187 A USA. U.S. PATENT, 1994.
31. **Microfluidics.** How It Works: Particle Size Reduction. [Consulté le 04/05/2013] [http://www.microfluidicscorp.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=49&Itemid=6](http://www.microfluidicscorp.com/index.php?option=com_content&view=article&id=49&Itemid=6).
32. **CORNELIA M. KECK, RAINER H. MULLER.** *Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 62, 3-16, 2006.
33. **ROUSTEL SEBASTIEN.** *Homogénéisation à haute pression des dispersions alimentaires liquides.* Techniques de l'Ingénieur. F2710, 2010.
34. **RAINER H. MULLER, C JACOBS, O KAYSER.** *Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future.* Advanced Drug Delivery Reviews. 47, 3-19, 2001.
35. **JUAHUI HU, KEITH P. JOHNSTON, ROBERT O. Williams III.** *Nanoparticle Engineering Processes for Enhancing the Dissolution Rates of Poorly Water Soluble Drugs.* Drug Development & Industrial Pharmacy. 30, 233- 245, 2004.
36. **C.N.R. RAO, A. MULLER, A.K. CHEETHAM.** *Nanomaterials Chemistry.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2007. Page 139-151. ISBN: 978-3-527-31664-9.
37. **PRANAMI GAURAV.** *Thesis "Understanding nanoparticle aggregation".* Iowa state university, 2009.

38. **SUNAGAWA ICHIRO.** *Crystal: Growth, Morphology and Perfection.* Cambridge university presse, Cambridge. 2007. Page 44-45. ISBN - I3 978 0-521-84189-4.
39. **M. KAHLWEIT.** *Ostwald ripening of precipitates.* Advances in colloid and interface science. 5, 1-35, 1975.
40. **EMIL CHIBOWSKI, LUCYANA HOLYSZ, KONRAD TERPILOWSKI, AGNIESZKA EWA WIACEK.** *Influence of Ionic Surfactants and Lecithin on Stability of Titanium Dioxide in Aqueous Electrolyte Solution.* CROATICA CHEMICA ACTA. 80, 395-403, 2007.
41. **SHI JINGYU.** *Steric Stabilization.* The Ohio State University, Group Inorganic Materials Science, 2002.
42. **INDRAJIT GHOSH, SONALI BOSE, RADHA VIPPAGUNTA, FERRIS HARMON.** *Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth.* International Journal of Pharmaceutics. 409, 260-268, 2011.
43. **BERNARD VAN EERDENBRUGH, JAN VERMANT, JOHAN A. MARTENS, LUDO FROYEN, JAN VAN HUMBEECK, PATRICK AUGUSTIJNS, GUY VAN DEN MOOTER.** *A Screening Study of Surface Stabilization during the Production of Drug Nanocrystals.* Pharmaceutical Nanotechnology. 6, 2091-2103, 2009.
44. **JAN L WAHLSTROM, PO-CHANG CHIANG, SARBANI GHOSH, CHAD J WARREN, STEVE P WENE, LESLEY A ALBIN, MARK E SMITH, STEVEN L ROBERDS.** *Pharmacokinetic evaluation of a 1,3-dicyclohexylurea nanosuspension formulation to support early efficacy assessment.* Nanoscale Research Letters. 2, 291-296, 2007.
45. **KATRIN PETERS, RAINER H. MULLER, DUNCAN Q.M CRAIG.** *An investigation into the distribution of lecithins in nanosuspension systems using low frequency dielectric spectroscopy.* International Journal of Pharmaceutics. 184, 53-61, 1999.
46. **MOSCHWITZER J.A, ACHLEITNER G.B, POMPER H.B, RAINER H. MULLER.** *Development of an intravenously injectable chemically stable aqueous omeprazole formulation using nanosuspension technology.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 58, 615- 619, 2004.
47. **MAYA GEORGE, INDRAJIT GHOSH.** *Identifying the correlation between drug/stabilizer properties and critical quality attributes (CQAs) of nanosuspension formulation prepared by wet media milling technology.* European Journal of Pharmaceutical Sciences. 48, 142-152, 2013.

48. **P. LANGGUTH, A. HANAFY, D. FRENZEL, P. GRENIER, A. NHAMAIS, T. OHLIG, G. VERGNAULT, H. SPAHN-LANGGUTH.** *Nanosuspension Formulations for Low-Soluble Drugs: Pharmacokinetic Evaluation Using Spironolactone as Model Compound.* Drug Development and Industrial Pharmacy. 31,319-329, 2005.
49. **M.J. GRAU, O. KAYSER, R.H. MULLER.** *Nanosuspensions of poorly soluble drugs — reproducibility of small scale production.* International Journal of Pharmaceutics. 196, 155-159, 2000.
50. **JONGHWI LEE, YU CHENG.** *Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions.* Journal of Controlled Release. 111, 185- 192, 2006.
51. **SUDHIR VERMAA, SUMIT KUMARA, RAJEEV GOKHALEB, DIANE J. BURGESSA** *Physical stability of nanosuspensions: Investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening.* International Journal of Pharmaceutics. 406, 145- 152, 2011.
52. **YUANLONG XU, et al.** *Study on the release of fenofibrate nanosuspension in vitro and its correlation with in situ intestinal and in vivo absorption kinetics in rats.* Drug Development Industrial Pharmacy. Publié en ligne le 21/ 05/ 2013.ISSN: 0363-9045
53. **ANA M. CERDEIRAA, MARCO MAZZOTIB, BRUNO GANDER.** *Miconazole nanosuspensions: Influence of formulation variables on particle size reduction and physical stability.* Pharmaceutical Nanotechnology. 396, 210- 218, 2010.
54. **HANY S.M. ALIA, PETER YORKA, NICHOLAS BLAGDEN.** *Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors.* International Journal of Pharmaceutics. 375, 107–113, 2009.
55. **CLAUDIA JACOBS, RAINER H. MULLER.** *Production and Characterization of a Budesonide Nanosuspension for Pulmonary Administration.* Pharmaceutical Research. 19, 189- 194, 2002.
56. **JAKOB BEIROWSKI, SABINE INGHELBRECHT, ALBERTINA ARIEN, HENNING GIESELER.** *Freeze Drying of Nanosuspensions: the Role of the Critical Formulation Temperature on Stability of Drug Nanosuspensions and Its Practical Implication on Process Design.* Journal of Pharmaceutical Sciences. 100, 4471- 4481, 2011.
57. **PATEL GV, PATEL VB, PATHAK A, RAJPUT SJ.** *Nanosuspension of efavirenz for improved oral bioavailability: formulation optimization, in vitro, in situ and in vivo evaluation.* Drug Development and Industrial Pharmacy. 40, 80-91, 2013.

58. **MICHAEL G. FAKESA, et al.** *Enhancement of oral bioavailability of an HIV-attachment inhibitor by nanosizing and amorphous formulation approaches.* International Journal of Pharmaceutics. 370, 167-174, 2009.
59. **SARBANI GHOSH, PO-CHANG CHIANG, JAN L. WAHLSTROM, HIDEJI FUJIWARA, JON G. SELBO, STEVEN L. ROBERDS.** *Oral Delivery of 1,3-Dicyclohexylurea Nanosuspension Enhances Exposure and Lowers Blood Pressure in Hypertensive Rats.* Nordic Pharmacological Society Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 102, 453- 458, 2008.
60. **JING-JING GUO, PENG-FEI YUE, JUN-LAN LV, JIN HANA, SHAN-SHAN FUA, SHI-XIAO JIN.** *Development and in vivo/in vitro evaluation of novel herpetrione nanosuspension.* International Journal of Pharmaceutics. 441, 227- 233, 2013.
61. **BENOIT DESCHAMPS, NAOMI MUSAJI, JOHN A GILLESPIE.** *Food effect on the bioavailability of two distinct formulations of megestrol acetate oral suspension.* International Journal of Nanomedicine. 4, 185-192, 2009.
62. **HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION : Rapamune** (revu le 07/2011). [consulté le 24/05/2013] <http://labeling.pfizer.com/showlabeling.aspx?id=139>.
63. **Fed Bioequivalence Study of Fenofibric Acid Versus TriCor® (Fenofibrate).** *Clinical Trial.* [consulté le 06/30/2013.] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00960687>.
64. **Megace ES. Megace NanoCrystal® Technology** [consulté le 07/01/2013] [http://www.megacees.com/hcp\\_megace-es-advanced-technology.html](http://www.megacees.com/hcp_megace-es-advanced-technology.html).
65. **Drug bank. Indomethacin.** [consulté le 22/07/2013]. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00328>.
66. **U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health. Mebendazole.** Date de révision: 06/2012. [consulté le 22/07/2013]. <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=107c3ad5-6ebe-4c98-a4a8-ac36663bd6a7>.
67. **Pubmed Compound, DMSO.** [consulté le 15/05/2013]. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=679>, 07/06/2013.
68. **Corning Dow.** Fiche de données : DOW CORNING(R) ANTIFOAM 1510 - US. Date de révision: 28.02.2012. [consulté le 29/06/2013]. <http://www2.dowcorning.com/DataFiles/090007b281a2ce69.pdf>.
69. **RESTCH. CryoMill.** [consulté le 06/10/2013.] <http://www.retsch.com/products/milling/mixer-mills/cryomill/>.
70. **Cryomill Retsh. BioFlukes.** [consulté le 24/04/2013] <http://www.bioflukes.com/blogs/127>.

71. **COVARIS**. Covaris S220X. [consulté le 06/10/2013.] [http://covarisinc.com/wp-content/uploads/S\\_series\\_data\\_sheet.pdf](http://covarisinc.com/wp-content/uploads/S_series_data_sheet.pdf).
72. **COVARIS**. *FAQs*. [consulté le 27/06/2013.] <http://covarisinc.com/resources/faqs/>.
73. **MALVERN**. Zetasizer Nano. [consulté le 06/10/2010.] [http://www.malvern.com/labeng/products/zetasizer/zetasizer\\_nano/zetasizer\\_nano\\_zs.htm](http://www.malvern.com/labeng/products/zetasizer/zetasizer_nano/zetasizer_nano_zs.htm).
74. **WANG QIN-B, ROBERT FINSY, XU HAI-BO, LI XI**. *On the critical radius in generalized Ostwald ripening*. Journal of Zhejiang University SCIENCE. 8, 705-707, 2005.
75. **PRADUM PUNDLIKRAO IGEA, ROHAN K. BARIAA, SURENDRA G. GATTANIB**. *Fabrication of fenofibrate nanocrystals by probe sonication method for enhancement of dissolution rate and oral bioavailability*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 108, 366- 373, 2013.
76. **ZETA POTENTIAL**. [consulté le 05/29/2013.] [http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS\\_derivate\\_000000002344/06\\_7Chapter7.pdf?hosts=](http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000002344/06_7Chapter7.pdf?hosts=).
77. **RANJITA SHEGOKAR, RAINER H. MULLER**. *Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives*. International Journal of Pharmaceutics. 399, 129- 139, 2010.
78. **BERNARD VAN EERDENBERUGH, GUY VAN DEN MOOTER, PATRICK AUGUSTIJNS**. *Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products*. International Journal of Pharmaceutics. 364, 64- 75, 2008.
79. **COVARIS, UCB**. *Evaluation of Covaris Adaptive Focused Acoustics equipment for several Preformulation applications*. UCB (Document interne).
80. **COVARIS**. *Preparation of Felodipine Nanosuspension (2 ml) by crystallization through AFA technology*. [consulté le 22/ 03/ 2012]. <http://covarisinc.com/wp-content/uploads/Felodipine-Nanosuspension-Crystallization.pdf>.
81. **PROTOCOL: Nano-suspension formation (Cinnarizine based), standard vessel**. [consulté le 28/ 03/ 2012]. [http://covarisinc.com/wp-content/uploads/Nano-suspension\\_Protocols\\_12X24\\_vessel.pdf](http://covarisinc.com/wp-content/uploads/Nano-suspension_Protocols_12X24_vessel.pdf).
82. **PARDEIK JANA, SCHRODL NINA, VOURA CHRISTINE, GRUBER MICHAEL, KHINAST G. JOHANNES, ZIMMER ANDREAS**. *Nanosuspensions as advanced printing ink for accurate dosing of poorly soluble drugs in personalized medicines*. International Journal of Pharmaceutics. 420, 93–100, 2011.

83. **VARUN RAJ VEMULA, ET AL.** *Solubility enhancement techniques*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 5, 41-51, 2010.
84. **VAUBOURDOLLE, MICHEL.** *Médicament (3ème édition)*. WOLTERS KLUWER, Rueil-Malmaison. 2007. Page 109. ISBN 978-2-915585-41-4.
85. **RAINER H MULLER, SVEN GOHLA, CORNELIA M KECK.** *State of the art of nanocrystals - Special features, production, nanotoxicology aspects and intercellular delivery*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 1, 1-9, 2011.
86. **KETAN T. SAVJANI, ANURADHA K. GAJJAR, JIGNASA K. SAVJANI.** *Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques*. International Scholarly Research Network. 2012, 1-10, 2012.
87. **L. WILLEMS, R. VAN DER GEEST, K. DE BEULE.** *Itraconazole Oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 3; 159- 16, 20019.
88. **KIPP J, WONG JCT, DOTTY MJ, REBBECH CI.** *Microprecipitation Method of Preparing Submicron Suspension*. US 20030003155 A1. U.S. PATENT, 2003.
89. **MERISKO-LIVERSIDGE E, LIVERSIDGE GG, COOPER ER.** *Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 6, 427-440, 2003.
90. **WANG QIN, ROBERT FINSY, XU HAI-BO, LI XI.** *On the critical radius in generalized Ostwald ripening*. Journal of Zhejiang University SCIENCE. 8, 705-707, 2005.
91. **GAISFORD SIMON.** *Thermal analysis for characterizing crystalline and amorphous forms*. UCL SCHOOL OF PHARMACY.
92. **Retsch PM100.** *Retsch*. [consulté le 12/05/2013]  
<http://www.retsch.com/products/milling/planetary-ball-mills/pm-100/function-features/>.
93. **FRANCOIS PUEL, STEPHANE VEESLER, DENIS MANGIN.** *Cristallisation Aspects théoriques*. DOSSIER Techniques de l'Ingénieur. 7200023220, 10/06/2005.
94. **M.J. GRAU, O. KAYSER, R.H. MULLER.** *Nanosuspensions of poorly soluble drugs — reproducibility of small scale production*. International Journal of Pharmaceutics. 196, 155-159, 2000.
95. **LEENA PELTONEN, JOUNI HIRVONEN.** *Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods*. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 1, 1569-1579, 2010.

# Annexe

## Annexe 1

L'équation de Kelvin décrit la pression de vapeur sur une surface d'une goutte de liquide incurvée dans la phase gazeuse. La pression de vapeur augmente avec l'augmentation de la courbure conduite par une diminution de taille particulaire. Cette équation peut être également appliquée dans la transformation de l'état solide à l'état liquide, dans ce cas-là, la pression de vapeur est remplacée par la pression de dissolution, donc son augmentation mène à une élévation de la solubilité de saturation. (82)

## Annexe 2

### Force de Coriolis

La force de Coriolis est une force qui dévie la trajectoire d'un objet en mouvement à la surface d'un objet en rotation. Elle s'applique en particulier aux masses d'air et d'eau en mouvement.

*Formule de la force de Coriolis*

$$\vec{F}_C = -2m\Omega(t)(\vec{e}_{axe} \wedge \vec{v})$$

$$\left\{ \begin{array}{l} m = \text{masse du corps} \\ \vec{e}_{axe} = \text{vecteur unitaire parallèle à l'axe de rotation} \\ \Omega(t) = \text{vitesse angulaire instantanée de rotation} \\ \vec{v} = \text{vitesse du corps} \end{array} \right.$$

## Annexe 3

Loi de Bernoulli : la somme des pressions et des énergies mécaniques par unité de volume est constante tout le long du tube de courant (pour un fluide parfait).

$$\rho \frac{v^2}{2} + \rho g z + p = \text{Cte}$$

$p$  est la pression statique,  $\rho g z$  est la pression de pesanteur,  $\rho \frac{v^2}{2}$  est la pression cinétique.

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 05 septembre 2014

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

présenté par : LI Xinyan

Sujet : Intérêt de la réduction de taille des principes actifs peu hydrosolubles : étude bibliographique et expérimentaleJury :

Président : M. MAINCENT, Professeur

Directeur : M MAINCENT, Professeur

Juges : Mme SAPIN-MINET, Maitre de conférences

Mme BOUDIER, Maitre de conférences

M. ROQUES-CARMES, Maitre de conférences

M. SCHENKEL, Pharmacien

Vu,

Nancy, le 11 Avril 2014

Le Président du Jury

Directeur de Thèse

M. P. MAINCENT

M. P. MAINCENT

Vu et approuvé,

Nancy, le 06.06.2014

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université de Lorraine,

Vu,

Nancy, le 17 JUIN 2014

Le Président de l'Université de Lorraine,

Pour le Président et par délégation  
Le Vice-Président  
Martial DELIGNON

Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 6558.

N° d'identification :

**TITRE**

Intérêt de la réduction de taille des principes actifs peu hydrosolubles : étude bibliographique et expérimentale

Thèse soutenue le 05/09/2014

Par LI Xinyan

**RESUME :**

Depuis ces dernières années, de plus en plus de molécules-candidates entrées dans le pipeline des industriels pharmaceutiques ont un problème de solubilité dans l'eau. D'après différents auteurs, le pourcentage des candidats faiblement solubles dans l'eau est de l'ordre de 60% - 75%. Plusieurs approches galéniques sont maintenant disponibles pour améliorer la solubilité. Parmi ces techniques, la nanosuspension présente de nombreux avantages. Ce travail est à la fois bibliographique et expérimental. La partie expérimentale avait pour but initial de concevoir des protocoles de fabrication, d'analyse et de définir des conditions de stockage de nanosuspensions applicables aux activités de préformulation. Deux types de techniques de fabrication des nanosuspensions ont été employées et comparées durant ce travail : broyage à bille et solubilisation - reprécipitation- sonication. La méthode de broyage a montré une grande robustesse, donc les résultats similaires ont été obtenus avec 2 types de broyeurs et 3 molécules différentes. La méthode de solubilisation - précipitation – sonication par ultrasons focalisés (approche Bottom Up) a montré une grande efficacité et une excellente performance en termes de réduction de taille pendant un temps plus court par rapport aux méthodes de broyage. Mais elle présente un risque d'augmentation importante de la solubilité à saturation de certains composés, ce qui peut amener à la dissolution des nanoparticules et conduire à une solution métastable.

**MOTS CLES :** nanosuspensions, principes actifs peu hydrosolubles, amélioration de la solubilité, techniques de réduction de taille, stabilisants

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Pr Philippe MAINCENT	EA 3452 – CITHEFOR	Expérimentale	<input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique	<input type="checkbox"/>
		Thème	_ 3

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle