

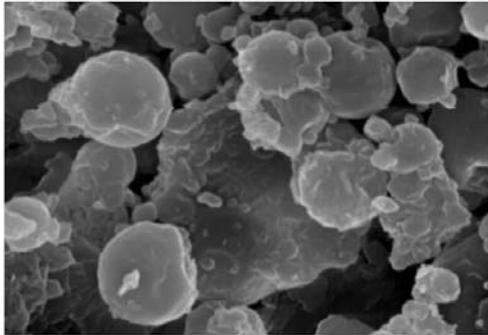


Faculté de Médecine

Laboratoire de Technologie Pharmaceutique

Professeur L. Delattre

**Mise au point et évaluation des
microparticules lipidiques solides
en vue du développement galénique
de préparations pour inhalation à
libération prolongée**



Séverine JASPART

Pharmacien

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Pharmaceutiques

Année académique 2006-2007

Table des matières

Objectifs

I. Objectifs du travail	1
-------------------------------	---

Introduction

II. L'administration de substances médicamenteuses par inhalation	6
II.1. Historique de l'administration par inhalation	6
II.2. Intérêt de l'administration par inhalation.....	8
II.2.1 Administration par inhalation pour l'obtention d'un effet local.....	9
II.2.2 Administration par inhalation pour l'obtention d'un effet systémique	9
II.3. Le système respiratoire	10
II.3.1 Rappels anatomiques.....	11
II.3.2 Rappels histologiques.....	12
II.4. Facteurs influençant l'efficacité thérapeutique des substances administrées par inhalation.....	15
II.4.1 Introduction.....	15
II.4.2 Influence de la déposition pulmonaire sur l'efficacité thérapeutique	16
II.4.2.1 Introduction : Les mécanismes de déposition.....	16
II.4.2.1.1 L'impaction	16
II.4.2.1.2 La sédimentation	17
II.4.2.1.3 La diffusion (ou diffusion brownienne).....	17
II.4.2.1.4 L'interception	17
II.4.2.1.5 La précipitation électrostatique.....	17
II.4.2.2 Influence du diamètre aérodynamique des particules sur la déposition pulmonaire.....	18
II.4.2.2.1 La notion de diamètre aérodynamique.....	18
II.4.2.2.2 La déposition en fonction de la taille des particules..	19
II.4.2.3 Influence du profil de respiration sur la déposition pulmonaire	21
II.4.2.4 Influence du patient sur la déposition pulmonaire	22
II.4.2.5 Les sites d'action des substances médicamenteuses administrées par inhalation	22
II.4.2.5.1 Action locale.....	22
II.4.2.5.2 Action systémique.....	24

II.4.3 Influence du temps de rétention au niveau du site d'action ou de la vitesse d'absorption dans le sang	25
II.4.3.1 Introduction	25
II.4.3.2 La clairance muco-ciliaire	26
II.4.3.3 La phagocytose par les macrophages	26
II.4.3.4 L'absorption au niveau systémique	27
II.4.3.5 La métabolisation des principes actifs.....	28
II.5. Les dispositifs pour administration pulmonaire.....	29
II.5.1 Introduction	29
II.5.2 Les nébuliseurs.....	29
II.5.3 Les inhalateurs doseurs pressurisés-IDP (« Metered dose inhalers- MDI »).....	30
II.5.4 Les inhalateurs à poudre sèche-IPS (« Dry powder inhalers- DPI).....	33
II.5.4.1 Introduction	33
II.5.4.2 Les différents types d'IPS	34
II.5.4.3 Avantages et inconvénients des IPS	35
II.5.4.4 Formulation d'une poudre pour inhalation	36
II.6. Evaluation des formes pharmaceutiques destinées à l'inhalation	41
II.6.1 Mesures <i>in vitro</i> de la déposition dans l'arbre respiratoire	41
II.6.2 Mesures <i>in vivo</i> de la déposition dans l'arbre respiratoire par γ -scintigraphie	44
II.6.3 Etudes pharmacocinétiques	45
II.6.4 Etudes cliniques d'efficacité	45
II.7. Références bibliographiques.....	46
III. Prolongation de la durée d'action d'une substance administrée par inhalation.....	53
III.1. Introduction	53
III.2. Prolongation de la durée d'action par voie pharmacochimique.....	54
III.2.1 Pharmacomodulation	54
III.2.2 Utilisation de pro-drogues	58
III.3. Prolongation de la durée d'action par voie galénique	58
III.3.1 Modification des propriétés physico-chimiques du principe actif.....	58
III.3.2 Utilisation de véhicules et de systèmes microparticulaires	59
III.3.2.1 Introduction	59
III.3.2.2 Les liposomes.....	59
III.3.2.3 Les microparticules biodégradables.....	61
III.3.2.4 Les cyclodextrines.....	64

III.3.2.5 Les microparticules lipidiques solides.....	65
III.4. Références bibliographiques.....	66
IV. Les microparticules lipidiques solides (MLS)	71
IV.1. Composition des MLS	71
IV.2. Avantages et inconvénients des MLS.....	71
IV.3. Méthodes de production des MLS	72
IV.4. Caractérisation des MLS.....	78
IV.4.1 Taille des MLS	78
IV.4.2 Forme des MLS.....	79
IV.4.3 Charge en principe actif et efficacité d'encapsulation (ou d'incorporation) du principe actif dans les MLS	80
IV.4.4 Analyse de l'état cristallin	82
IV.5. Les voies d'administration des MLS: Etudes de libération <i>in vivo</i> , biocompatibilité	84
IV.5.1 Administration de MLS par voie orale.....	84
IV.5.2 Administration de MLS par voie parentérale.....	85
IV.5.3 Usage topique des MLS.....	85
IV.5.4 Administration de MLS par voie pulmonaire	86
IV.6. Références bibliographiques	87
V. L'asthme	92
V.1. Définition- physiopathologie de l'asthme	92
V.2. Les traitements de l'asthme par inhalation.....	95
V.2.1 Agonistes des récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -mimétiques) à courte durée d'action	95
V.2.2 Agonistes des récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -mimétiques) à longue durée d'action.....	95
V.2.3 Les anticholinergiques	96
V.2.4 Les corticostéroïdes.....	97
V.2.5 Le cromogliclate sodique.....	98
V.3. Traitements de l'asthme à action prolongée administrés par inhalation	98
V.3.1 Intérêts et indications des traitements de l'asthme à action prolongée administrés par inhalation	98
V.3.1.1 Prophylaxie des épisodes d'asthme nocturne.....	99
V.3.1.2 Prophylaxie des épisodes aigus d'asthme chez l'animal	99
V.3.2 Cas des β_2 -mimétiques à longue durée d'action : Intérêts et inconvénients.....	101
V.4. Références bibliographiques	103

Partie expérimentale

VI. Formulation de microparticules lipidiques solides et optimisation des paramètres de production.....	107
VI.1. Introduction.....	107
VI.2. Formulation de MLS vierges	107
VI.2.1 <i>Matériel</i>	107
VI.2.1.1 Les lipides	107
VI.2.1.2 Le tensioactif	108
VI.2.1.3 L'eau	108
VI.2.2 <i>Méthodes</i>	108
VI.3. Optimisation des paramètres de production des MLS par utilisation des plans d'expériences	111
VI.3.1 <i>Introduction</i>	111
VI.3.2 <i>Méthodes</i>	112
VI.3.2.1 Introduction à la méthodologie des plans d'expériences.....	112
VI.3.2.2 Paramètres de production des MLS	113
VI.3.2.3 Réponse mesurée.....	114
VI.3.2.4 Réalisation des plans d'expériences.....	114
VI.3.3 <i>Résultats</i>	115
VI.3.3.1 Introduction	115
VI.3.3.2 Analyse statistique	117
VI.3.3.3 Estimation des effets principaux, des effets quadratiques et des interactions	118
VI.3.3.3.1 <i>Plan d'expériences n°1 (Ultra-Turrax® T25)</i>	118
VI.3.3.3.2 <i>Plan d'expériences n°2 (Silverson® LR4)</i>	120
VI.3.3.4 Représentation des résultats	121
VI.3.3.4.1 <i>Plan d'expériences n°1 (Ultra-Turrax® T25)</i>	121
VI.3.3.4.2 <i>Plan d'expériences n°2 (Silverson® LR4)</i>	122
VI.3.3.5 Optimisation des paramètres de fabrication.....	123
VI.3.3.5.1 <i>Plan d'expériences n°1 (Ultra-Turrax® T25)</i>	124
VI.3.3.5.2 <i>Plan d'expériences n°2 (Silverson® LR4)</i>	125
VI.3.3.6 Répétitions expérimentales des conditions optimales théoriques de fabrication des MLS.....	126
VI.4. Conclusion.....	127
VI.5. Références bibliographiques.....	128
VII. Essais de tolérance <i>in vivo</i> des MLS au niveau pulmonaire	129
VII.1. Présentation des essais réalisés.....	129
VII.1.1 <i>Introduction</i>	129
VII.1.2 <i>Préparation des échantillons de MLS</i>	129
VII.1.2.1 <i>Matériel</i>	129

VII.1.2.2 Méthodes	130
<i>VII.1.3 Description du protocole</i>	<i>130</i>
VII.1.3.1 Essais de tolérance aiguë (24, 48 et 72h)	130
VII.1.3.2 Essais de tolérance chronique (2 et 4 semaines)	131
VII.2. Résultats	131
VII.2.1.1 Essais de tolérance aiguë (24, 48 et 72h)	132
VII.2.1.2 Essais de tolérance chronique (2 et 4 semaines)	135
VII.3. Conclusion	137
VII.4. Références bibliographiques	138
VIII. Synthèse et caractérisation de l'acétonide de salbutamol	139
VIII.1. Introduction	139
VIII.2. Synthèse de l'acétonide de salbutamol	140
<i>VIII.2.1 Matériel</i>	<i>140</i>
<i>VIII.2.2 Méthodes</i>	<i>140</i>
VIII.3. Caractérisation de l'AS et développement de méthodes de dosage	142
<i>VIII.3.1 Matériel</i>	<i>142</i>
<i>VIII.3.2 Méthodes</i>	<i>142</i>
VIII.3.2.1 Etude des résidus de solvant par chromatographie gazeuse	142
VIII.3.2.2 Analyse thermique par DSC	143
VIII.3.2.3 Détermination du spectre UV/visible	143
VIII.3.2.4 Evaluation de la lipophilie de l'AS	143
VIII.3.2.5 Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'AS	144
<i>VIII.3.2.5.1 Appareillage</i>	<i>144</i>
<i>VIII.3.2.5.2 Conditions chromatographiques</i>	<i>145</i>
<i>VIII.3.2.5.3 Préparation des solutions témoins de référence</i> ..	<i>145</i>
<i>VIII.3.2.5.4 Validation de la méthode de dosage de l'AS par CLHP</i>	<i>146</i>
VIII.3.2.6 Mise au point et validation d'une méthode de dosage du salbutamol et de l'AS simultanément	146
VIII.3.2.7 Etude de stabilité de l'AS dans les conditions opératoires et identification du (des) produit(s) de dégradation par spectrométrie de masse	146
<i>VIII.3.3 Résultats</i>	<i>148</i>
VIII.3.3.1 Etude des résidus de solvant par chromatographie gazeuse	148
VIII.3.3.2 Analyse thermique par DSC	149
VIII.3.3.3 Détermination du spectre UV/visible	149
VIII.3.3.4 Evaluation de la lipophilie de l'AS	150

VIII.3.3.4.1 Détermination théorique du Log P.....	150
VIII.3.3.4.2 Détermination expérimentale du P et du Log P... ..	150
VIII.3.3.5 Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'AS	151
VIII.3.3.5.1 Mise au point.....	151
VIII.3.3.5.2 Validation.....	152
VIII.3.3.6 Mise au point et validation d'une méthode de dosage simultané de l'AS et du salbutamol.....	155
VIII.3.3.6.1 Mise au point.....	155
VIII.3.3.6.2 Validation du dosage du salbutamol par la méthode de dosage CLHP AS/Salbutamol.....	157
VIII.3.3.6.3 Validation du dosage de l'AS par la méthode de dosage CLHP AS/Salbutamol	159
VIII.3.3.7 Etude de stabilité de l'AS dans les conditions opératoires	161
VIII.4. Références bibliographiques.....	164
IX. Evaluation de l'activité pharmacologique de l'acétonide de salbutamol	165
IX.1. Essais <i>ex vivo</i> de métabolisation de l'AS	165
IX.1.1 Introduction	165
IX.1.2 Matériel	165
IX.1.3 Méthodes	166
IX.1.4 Résultats.....	167
IX.1.5 Conclusion.....	168
IX.2. Essais <i>ex vivo</i> de bronchodilatation sur organes isolés ..	168
IX.2.1 Méthodes	168
IX.2.2 Résultats.....	169
IX.2.3 Conclusion.....	169
IX.3. Etude <i>in vitro</i> des interactions ligand-récepteur (Essais de binding).....	170
IX.3.1 Introduction	170
IX.3.2 Matériel	171
IX.3.3 Méthodes	172
IX.3.4 Résultats.....	173
IX.4. Conclusion.....	174
IX.5. Références bibliographiques.....	176
X. Formulation de MLS contenant de l'AS et optimisation des paramètres de production.....	179
X.1. Introduction.....	179
X.2. Fabrication de MLS contenant l'AS.....	179
X.2.1 Matériel.....	179
X.2.2 Méthodes	179

X.3. Optimisation des paramètres de production des MLS par utilisation des plans d'expériences	180
<i>X.3.1 Introduction</i>	180
<i>X.3.2 Méthodes</i>	180
X.3.2.1 Paramètres de production des MLS	180
X.3.2.2 Réponse mesurée	182
X.3.2.3 Réalisation du plan d'expériences	182
<i>X.3.3 Résultats</i>	183
X.3.3.1 Introduction	183
X.3.3.2 Analyse statistique	184
X.3.3.3 Estimation des effets principaux, des effets quadratiques et des interactions.....	185
X.3.3.4 Représentation des résultats.....	187
X.3.3.5 Optimisation des paramètres de fabrication	188
X.3.3.6 Répétitions expérimentales des conditions optimales théoriques de fabrication des MLS	189
X.4. Conclusion	191
X.5. Références bibliographiques	192
XI. Caractérisation des MLS contenant l'AS.....	193
XI.1. Introduction.....	193
XI.2. Matériel.....	193
XI.3. Méthodes.....	194
<i>XI.3.1 Détermination de la densité vraie des MLS et estimation du diamètre aérodynamique</i>	194
<i>XI.3.2 Visualisation des MLS par microscopie électronique à balayage</i>	195
<i>XI.3.3 Analyse thermique des MLS par DSC</i>	195
<i>XI.3.4 Analyse de la forme cristalline de l'AS dans les MLS par diffraction des rayons-X</i>	196
<i>XI.3.5 Détermination de la charge réelle en AS dans les MLS</i>	197
XI.3.5.1 Introduction.....	197
XI.3.5.2 Description de la méthode.....	198
XI.3.5.3 Validation de la méthode d'extraction	198
XI.4. Résultats	199
<i>XI.4.1 Détermination de la densité vraie des MLS et estimation du diamètre aérodynamique</i>	199
<i>XI.4.2 Visualisation des MLS par microscopie électronique à balayage</i>	200
<i>XI.4.3 Analyse thermique des MLS par DSC</i>	201
<i>XI.4.4 Analyse de la forme cristalline de l'AS dans les MLS par diffraction des rayons-X</i>	206

<i>XI.4.5 Détermination de la charge réelle en AS dans les MLS</i>	208
XI.4.5.1 Validation de la méthode d'extraction de l'AS ...	208
XI.4.5.2 Détermination de la charge réelle en AS dans les MLS	210
XI.5. Conclusion.....	211
XI.6. Références bibliographiques.....	213
XII: Etudes <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i> de libération de l'AS à partir des microparticules lipidiques solides.....	215
XII.1. Introduction	215
XII.2. Etude <i>in vitro</i> de libération de l'AS à partir des MLS.....	217
<i>XII.2.1 Matériel et méthodes</i>	217
<i>XII.2.2 Résultats et discussion</i>	218
XII.2.2.1 Détermination préalable de la taille des MLS ...	218
XII.2.2.2 Profils de libération.....	219
XII.2.2.3 Interprétation statistique des résultats	221
XII.2.2.4 Etude du mécanisme de libération	223
XII.2.2.5 Linéarisation des profils de libération.....	226
<i>XII.2.3 Conclusion</i>	227
XII.3. Etude <i>ex vivo</i> de libération de l'AS à partir des MLS.....	227
<i>XII.3.1 Introduction</i>	227
<i>XII.3.2 Matériel</i>	228
<i>XII.3.3 Méthodes</i>	228
<i>XII.3.4 Résultats et discussion</i>	230
XII.3.4.1 Profils de libération.....	230
XII.3.4.2 Interprétation statistique des résultats	232
XII.4. Conclusion	232
XII.5. Références bibliographiques.....	234
XIII. Formulation de poudres pour inhalation à base de microparticules lipidiques solides contenant l'AS	235
XIII.1. Introduction	235
XIII.2. Matériel	237
XIII.3. Méthodes	238
<i>XIII.3.1 Formulation des poudres pour inhalation</i>	238
<i>XIII.3.2 Evaluation in vitro de la déposition des poudres pour inhalation</i>	240
XIII.3.2.1 .. Détermination de l'uniformité de la dose délivrée	242
XIII.3.2.2 . La détermination de la dose en particules fines et de la fraction respirable	242
XIII.4. Résultats et discussion.....	243
<i>XIII.4.1 Essai d'uniformité de la dose délivrée.....</i>	244

XIII.4.2 Détermination de la dose en particules fines et de la fraction respirable247
XIII.5. Conclusion.....251
XIII.6. Références bibliographiques253

Conclusions

XIV. Conclusions générales et perspectives.....255

Résumés

Résumé.....259
Summary.....263

Annexes

Annexes.....267

Publications

Publications.....289

OBJECTIFS

Chapitre I:

Objectifs du travail

Le sujet de ce travail s'inscrit dans le cadre du projet de recherche R.W. Respivet qui est financé par la Direction Générale des Technologies, de la Recherche et de l'Energie du Ministère de la Région Wallonne.

Le projet Respivet a été inspiré par le cas de l'asthme félin, pathologie relativement commune affectant près d'un chat sur 200. En effet, les praticiens ont constaté qu'il était particulièrement difficile d'administrer par inhalation un bronchodilatateur à un animal, lors d'une crise d'asthme aiguë. Cependant l'inhalation est la voie d'administration à privilégier pour éviter la survenue d'effets indésirables systémiques. Dès lors, afin d'améliorer la compliance en diminuant le nombre d'administrations mais également de prévenir certains épisodes asthmatiques aigus, le développement de formes à libération prolongée d'agents bronchodilatateurs destinées à l'administration par inhalation a été suggéré. L'intérêt d'une telle forme en médecine humaine est également évident principalement dans la prophylaxie des épisodes asthmatiques aigus nocturnes ou liés à l'effort.

Le volet « technologie pharmaceutique » du projet Respivet consistera en la mise au point d'une forme galénique destinée à l'administration pulmonaire qui libérerait de façon prolongée un agent anti-asthmatique. Ce domaine de recherche présente un intérêt grandissant, en médecine vétérinaire et en médecine humaine, dans la mesure où il n'existe actuellement sur le marché aucune forme pharmaceutique destinée à

Objectifs

l'administration pulmonaire qui libèrerait son principe actif de façon prolongée.

Les microparticules lipidiques solides (MLS) ont été choisies comme véhicule galénique pour la réalisation de ce travail, essentiellement pour leur coût de fabrication peu élevé et pour leur profil toxicologique favorable. En dépit de leurs nombreux avantages, les MLS sont toujours relativement peu étudiées à l'heure actuelle, particulièrement dans le domaine de l'administration pulmonaire.

L'introduction théorique de ce travail détaillera dans un premier temps les avantages et inconvénients de la voie d'administration pulmonaire, les facteurs influençant la déposition pulmonaire seront envisagés et les dispositifs d'administration par inhalation seront décrits. Les différents moyens de prolonger la durée d'action d'un principe actif administré par inhalation seront ensuite envisagés. Parmi ceux-ci, les avantages de l'utilisation des MLS seront plus particulièrement développés. Enfin, un rappel de la physiopathologie de l'asthme et de ses traitements terminera cette partie introductive.

La partie expérimentale débutera par la fabrication de MLS sans principe actif et par l'optimisation de leurs paramètres de fabrication par planification expérimentale, en vue d'obtenir un pourcentage maximal de MLS possédant une taille adéquate pour l'administration pulmonaire.

Des essais *in vivo* de tolérance des MLS chez le rat après administration intra-trachéale seront ensuite effectués.

Le salbutamol, un β_2 -mimétique à courte durée d'action et qui n'est plus soumis à brevet, avait été envisagé dans un premier temps comme principe actif dans cette étude. Cependant, étant donné ses propriétés physico-chimiques, il s'est avéré que cette molécule s'incorporait difficilement dans un véhicule lipidique. Un dérivé plus lipophile du

salbutamol, l'acétonide de salbutamol (AS) a donc été synthétisé. Les caractéristiques physico-chimiques de cette molécule seront ensuite déterminées et une méthode de dosage par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) sera mise au point et validée. L'évaluation de l'activité pharmacologique de l'AS sera réalisée par des essais *in vitro* de bronchodilatation sur bronches isolées ainsi que par des essais *in vitro* d'affinité vis-à-vis de récepteurs β -adrénergiques humains (essais de binding). Il convient dès à présent de signaler qu'en l'absence d'une étude complète de l'efficacité pharmacologique et d'une étude toxicologique de l'AS, cette molécule sera tout au long de ce travail considérée comme une molécule modèle pour le développement d'un véhicule destiné à l'administration pulmonaire qui serait capable de libérer un composé de façon prolongée.

Des MLS contenant l'AS seront ensuite produites et les paramètres de production seront optimisés par utilisation de la méthodologie des plans d'expériences. Ces MLS seront caractérisées en termes de taille, de charge en AS et de forme. L'AS sera quant à lui caractérisé au sein des MLS par analyse thermique différentielle et par diffraction des rayons X.

Des essais de libération de l'AS à partir des MLS seront ensuite réalisés *in vitro* et *ex vivo*.

La dernière étape de la partie expérimentale consistera à développer une poudre pour inhalation à partir des MLS chargées en AS. Les fractions respirables de différents types de mélanges seront étudiées *in vitro* à l'aide d'un impacteur en verre à double étage.

INTRODUCTION

Chapitre II: L'administration de substances médicamenteuses par inhalation

II.1. Historique de l'administration par inhalation

Les troubles du système respiratoire se traitent depuis plusieurs milliers d'années par administration pulmonaire. Divers écrits et dessins retrouvés à travers le monde en témoignent (Vanderbist, 2000). Ainsi, les feuilles de l'*Atropa belladonna* étaient déjà fumées 2000 ans av. J-C par les Indiens afin de traiter les crises de toux (de Boer, 2005; Labiris et al., 2003b; O'Callaghan et al., 2002). 1000 ans plus tard, les Grecs fumaient des extraits de pin afin de traiter la tuberculose (O'Callaghan et al., 2002). Au 2^{ème} siècle après J-C, un médecin grec, Galien, proposa de soigner les affections bronchiques (principalement la tuberculose) par inhalation d'eau de mer.

L'inhalation fut redécouverte en Europe vers le 18^{ème} siècle. Des plantes telles que l'*Atropa Belladonna* mais aussi le *Datura Stramonium*, fumées en mélange au tabac, restèrent jusqu'au début du 20^{ème} siècle les traitements les plus efficaces de la crise d'asthme. Le mode d'administration par inhalation fut longtemps destiné exclusivement à un traitement loco-régional des pathologies pulmonaires. Toutefois la découverte au 19^{ème} siècle des gaz médicaux anesthésiants permit d'envisager l'inhalation comme un nouveau mode d'administration systémique.

Les premiers dispositifs pour inhalation sont apparus au 19^{ème} siècle et sont depuis lors en constante évolution : le premier nébuliseur fut mis au point en 1829 suivi d'un nébuliseur portable en 1858 (Figure II-1). Avec le développement de ces premiers dispositifs apparurent les premières vraies thérapies par nébulisation : ainsi l'adrénaline (1925) et les corticostéroïdes (1950) furent les premiers principes actifs administrés par voie pulmonaire en vue d'une action locale. A noter que les premiers essais de nébulisation d'insuline porcine chez l'homme ont été réalisés en 1925 (Clark, 2004).



Figure II-1 : Le premier nébuliseur portable du Dr Sales-Giron (1858)

II.2. Intérêt de l'administration par inhalation

L'administration par inhalation peut avoir pour but un effet local ou un effet systémique.

II.2.1 Administration par inhalation pour l'obtention d'un effet local

A l'heure actuelle, ce sont essentiellement des agents anti-asthmatiques (agonistes β_2 -adrénergiques, anticholinergiques, inhibiteurs de la dégradation mastocytaire), des traitements de la BPCO (corticostéroïdes), des agents anti-microbiens et des mucolytiques qui sont administrés par la voie pulmonaire en vue d'exercer un effet local.

Les avantages de l'administration pulmonaire sur les autres voies d'administration pour le traitement d'affections pulmonaires sont les suivants (Courrier et al., 2002; de Boer, 2005; Labiris et al., 2003a):

- Déposition rapide au niveau du système respiratoire \Rightarrow réponse clinique rapide
- Administration directe du principe actif au niveau de son site d'action
- Diminution des effets indésirables systémiques
- Déposition de grandes quantités de principe actif au niveau du site d'action, tout en réduisant la dose administrée au patient (10 à 20% de la dose administrée par voie orale) \Rightarrow l'effet thérapeutique est supérieur à celui obtenu avec une dose identique administrée par voie orale
- Pas de dépendance de la résorption gastro-intestinale et du premier passage hépatique

II.2.2 Administration par inhalation pour l'obtention d'un effet systémique

Actuellement de nombreuses molécules, principalement des peptides et des protéines, sont testées en vue d'une administration par voie pulmonaire. Ainsi l'insuline, l'hormone de croissance humaine, l'ocytocine, la calcitonine et l'oestradiol ont montré une bonne biodisponibilité après administration pulmonaire (Courrier et al., 2002; Groneberg et al., 2003; Schulz, 1998). La voie pulmonaire est également de plus en plus souvent citée comme voie d'administration pour des produits issus de la thérapie génique (Hanes et al., 2004).

Le premier traitement à inhaler en vue d'un effet systémique, une insuline sous forme de poudre pour inhalation, vient récemment de recevoir l'autorisation de mise sur le marché en Europe et est, depuis peu, déjà commercialisé dans certains pays. Cette insuline porte le nom d'Exubera® et est le résultat d'un co-développement entre Pfizer (New-York, USA) et Nektar Therapeutics (San Carlos, USA), ces derniers ayant mis au point le dispositif pour inhalation (Voir page 38).

Les avantages de l'utilisation de la voie d'administration pulmonaire en vue d'un effet systémique sont les suivants (Labiris et al., 2003a) :

- Voie d'administration non invasive
- Bien que contenant des protéases, les poumons sont également riches en inhibiteurs de protéases, ce qui permettrait de protéger la plupart des peptides et des protéines administrés par voie pulmonaire (Courrier et al., 2002).
- Enorme surface d'absorption (100 m²) et membrane très perméable au niveau alvéolaire (0,2 à 0,7 µm d'épaisseur)
- Faible activité enzymatique au niveau pulmonaire
- Contournement de la métabolisation hépatique et du pH acide de l'estomac
- Cinétique d'absorption reproductible, indépendante du régime alimentaire et de la vitesse du transit gastro-intestinal

- Permet l'absorption de molécules très petites autant que de très grosses protéines bien que le mécanisme d'absorption des grosses molécules reste à l'heure actuelle mal compris (Patton, 1996).

II.3. Le système respiratoire

II.3.1 Rappels anatomiques

Le système respiratoire humain est constitué des voies respiratoires supérieures comprenant le nez, le pharynx et le rhinopharynx et des voies respiratoires inférieures constituées du larynx, de la trachée, des bronches et des poumons.

Sur le plan fonctionnel, le système respiratoire se divise en deux zones (Courrier et al., 2002; Tronde, 2002):

- La zone conductrice qui consiste en un système de cavités et de tubes interreliés (nez, pharynx, larynx, trachée, bronches et bronchioles) qui conduisent l'air dans les poumons et le conditionnent en le filtrant, en l'humidifiant et en le réchauffant.
- La zone respiratoire (bronchioles, canaux alvéolaires et alvéoles) où s'effectuent les échanges gazeux entre le sang et l'air.

Depuis la trachée jusqu'en périphérie de l'arbre respiratoire, les voies respiratoires se divisent répétitivement de façon dichotomique en deux branches filles plus courtes et de diamètres inférieurs à la branche mère. Ainsi pour chaque nouvelle génération de voies aériennes, le nombre de branches est doublé et l'aire totale de la section augmente de façon exponentielle. Chez l'homme, on distingue 23 ordres de divisions dichotomiques (Figure II-2) (Weibel et al., 1991). L'arborescence du système respiratoire est représentée à la figure II-2.

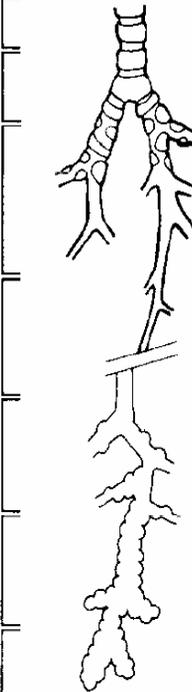
	Génération			Diamètre (cm)	Longueur (cm)	Nombre	Aire totale de la section (cm ²)	
Zone de conduction	Trachée		0	1,80	12,0	1	2,54	
	Bronches		1	1,22	4,8	2	2,33	
			2	0,83	1,9	4	2,13	
	Bronchioles		Bronchioles	3	0,56	0,8	8	2,00
				4	0,45	1,3	16	2,48
			Bronchioles terminales	5	0,35	1,07	132	3,11
Zone de transition et respiratoire	Bronchioles respiratoires	↓						
		16	0,06	0,17	6x 10 ⁴	180		
	Canaux alvéolaires	17						
		18						
		19	0,05	0,10	5x 10 ⁵	10 ³		
		20						
		21						
		22						
Sacs alvéolaires	23	0,04	0,05	8x 10 ⁶	10 ⁴			

Figure II-2 : Schéma de l'arborescence du système respiratoire humain (Patton, 1996)

II.3.2 Rappels histologiques

L'épithélium du système respiratoire est composé de différents types de cellules dont la distribution confère des fonctions spécifiques aux différentes zones du système respiratoire (Hickey et al., 2004).

L'épithélium des voies aériennes est pseudostratifié dans la trachée et dans les tronçons les plus larges des bronches, puis il devient cylindrique unistratifié et enfin cubique dans les portions les plus étroites des bronchioles.

L'épithélium pseudostratifié bordant la trachée et les bronches est constitué principalement de cellules cylindriques ciliées mais aussi de

cellules caliciformes (à mucus) et de cellules basales (cellules de remplacement non différenciées capables de se diviser et qui n'atteignent pas la face luminale) (Figure II-3). Quelques cellules en brosse sont également présentes mais en plus petit nombre (Lombry, 2004). Ces cellules en brosse sont des cellules en voie de différenciation qui possèdent quelques microvillosités à leur pôle apical (Heinen, 2006).

L'épithélium cilié vibratile de la trachée participe tout comme celui des bronches, à la constitution de "l'escalator muco-ciliaire". C'est en effet le battement coordonné et orienté des cils qui entraîne les plaques de mucus vers la trachée et le pharynx. Les nombreuses particules inhalées, d'un diamètre égal ou supérieur au micron, sont projetées sur ces plaques de mucus et ramenées vers l'oropharynx où elles sont dégluties ou expectorées. L'efficacité de ce système dépend du mouvement correct des cils mais aussi des qualités viscoélastiques du mucus. La présence de ce dernier est indispensable aux mouvements ciliaires ; en son absence, les cils s'arrêtent de battre et dégènèrent. Il existe un équilibre idéal entre la quantité de mucus et le nombre de cellules ciliées (Heinen, 2006).

Au niveau des bronchioles l'épithélium est unistratifié et présente une forme qui devient progressivement cubique lorsqu'on descend vers les bronchioles terminales (Figure II-3). Cet épithélium est composé de cellules ciliées entre lesquelles s'interposent des plaques formées de cellules non ciliées (cellules de Clara) qui secrètent une lipoprotéine tensioactive intervenant dans la composition du surfactant. Des cellules neuro-endocrines produisant des hormones et des oligopeptides sont également présentes au niveau des bronchioles (Heinen, 2006).

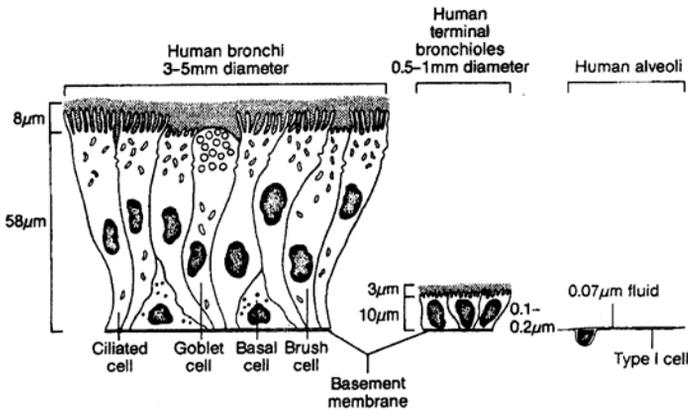


Figure II-3 : Coupes latérales de l'épithélium au niveau trachéo-bronchique, au niveau des bronchioles terminales et au niveau des alvéoles pulmonaires (Patton, 1996).

Les parois alvéolaires sont formées d'un épithélium constitué d'une couche unicellulaire reposant sur une lame basale (Figure II-3). Cette couche comporte deux types de cellules : les cellules alvéolaires de type I (ou pneumocytes I) et les cellules alvéolaires de type II (ou pneumocytes II) (Figure II-4).

Les pneumocytes I sont des cellules squameuses relativement larges et fines dites pavimenteuses qui couvrent approximativement 96% de la surface alvéolaire. C'est au travers de la membrane de ces cellules que se font par diffusion les échanges gazeux entre le sang et l'air (Dolovich et al., 1987). Les pneumocytes II, bien qu'aussi nombreux que les pneumocytes I, ne couvrent que 3% de la surface alvéolaire (Tronde, 2002). Ce sont des cellules cubiques possédant des microvillosités, qui sont plus épaisses mais beaucoup plus petites que les pneumocytes I. Les pneumocytes II sont capables de se différencier en pneumocytes I afin de régénérer ces derniers lorsqu'ils sont endommagés mais ont également pour fonction la synthèse et la sécrétion des phospholipides et des lipoprotéines du surfactant alvéolaire (Courrier et al., 2002). Le surfactant alvéolaire permet de réduire la tension superficielle du liquide alvéolaire au

contact de l'air alvéolaire et diminue ainsi la tendance des alvéoles à se collaber spécialement lors de l'expiration.

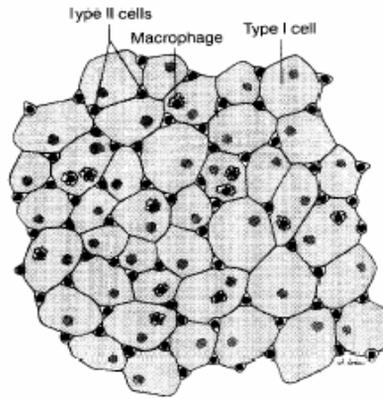


Figure II-4 : Représentation schématique de l'épithélium alvéolaire pulmonaire (Patton, 1996)

Des macrophages sont également présents au niveau de la paroi alvéolaire et ont un rôle de défense vis-à-vis des particules et pathogènes inhalés qui auraient atteint les alvéoles pulmonaires (Tronde, 2002).

II.4. Facteurs influençant l'efficacité thérapeutique des substances administrées par inhalation.

II.4.1 Introduction

L'efficacité thérapeutique d'une substance administrée par inhalation dépend :

- De la déposition pulmonaire des particules (ou gouttelettes) administrées par inhalation et plus particulièrement du site de déposition ainsi que de la quantité déposée. Ces paramètres sont eux-mêmes influencés par :

- Les propriétés des particules : taille, forme, densité, charge, caractère hygroscopique
- La morphologie du système respiratoire de l'individu
- Le profil de respiration
- o Du temps de rétention au niveau du site d'action (pour un effet local) ou de la vitesse d'absorption dans le sang (pour un effet systémique). Les mécanismes de clairance pulmonaire peuvent influencer ces paramètres.

II.4.2 Influence de la déposition pulmonaire sur l'efficacité thérapeutique

II.4.2.1 Introduction : Les mécanismes de déposition

Les mécanismes conduisant une particule inhalée à se déposer sur les parois des voies aériennes sont principalement l'impaction, la sédimentation et la diffusion (Schulz, 1998) et dans une moindre mesure l'interception et la précipitation électrostatique (Gonda, 2004; Lippmann et al., 1980; Martonen et al., 1996) (Figure II-5).

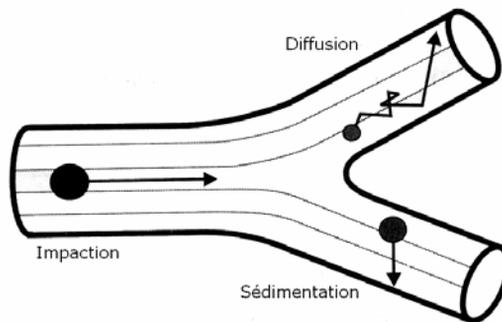


Figure II-5 : Principaux mécanismes de déposition dans les voies aériennes (Tronde, 2002)

II.4.2.1.1 L'impaction

L'impaction (ou impaction inertielle) se produit lorsque les particules possédant un moment (produit de la masse et de la vitesse) suffisamment

grand sont affectées par les forces centrifuges régnant dans les voies respiratoires lors de l'inhalation et, ne pouvant suivre les changements brusques de direction du flux d'air, se déposent sur les parois des voies aériennes (Martonen et al., 1996). L'impaction se produit le plus souvent au niveau de la sphère oropharyngée et des 10 premières générations de bronches, où l'air est très turbulent et où les particules possèdent une énergie cinétique élevée (Gonda, 2004; Labiris et al., 2003a).

II.4.2.1.2 La sédimentation

La sédimentation intervient lorsque les particules ne sont plus soumises à l'aspiration mais uniquement à la gravité. En effet, les particules possédant une masse suffisante peuvent se déposer sous l'effet de la gravitation lorsque le temps de séjour dans les voies respiratoires est suffisant. Ce phénomène se produit principalement à partir des six dernières générations de bronchioles ainsi que dans les alvéoles, où la vitesse du flux d'air est très réduite (Labiris et al., 2003a; Martonen et al., 1996).

II.4.2.1.3 La diffusion (ou diffusion brownienne)

La diffusion brownienne apparaît lorsque les particules sont très petites et lorsque l'effet de la gravitation sur celles-ci devient négligeable. Elles se déplacent alors de façon aléatoire selon un mouvement de type brownien, et ce jusqu'à impaction sur les parois respiratoires. C'est le mode de déposition principal des très petites particules ($< 0,5 \mu\text{m}$).

II.4.2.1.4 L'interception

L'interception est un mécanisme de déposition plus anecdotique selon lequel le centre de gravité de la particule se trouve dans le flux d'air porteur tandis qu'une des extrémités de la particule est en contact avec une surface. Ce mécanisme se rencontre plus fréquemment lorsque l'espace dans lequel se trouve la particule a une taille comparable à celle de la particule elle-même. Ceci se produit le plus souvent lorsqu'on est en présence de particules allongées, en forme d'aiguilles (Gonda, 2004).

II.4.2.1.5 La précipitation électrostatique

Ce phénomène moins fréquent de déposition survient lorsque les particules se retrouvent chargées (cela peut survenir lors de l'aérosolisation). Les charges des particules sont en grande partie neutralisées par les ions de l'air environnant pour atteindre un équilibre de distribution de charges. Toutefois deux types d'interactions électriques peuvent se produire entre les particules selon que celles-ci sont chargées identiquement ou de façon opposée. Dans le premier cas, la répulsion entre les particules chargées de la même façon peut provoquer un mouvement des particules vers la paroi respiratoire. Dans le second cas, les particules s'attirent et forment des agrégats qui, par une augmentation de leur masse, se déposent prématurément dans le tractus respiratoire (Gonda, 2004). Ce mécanisme de déposition est proportionnellement plus marqué pour les particules submicroniques (Vanderbist, 2000).

II.4.2.2 Influence du diamètre aérodynamique des particules sur la déposition pulmonaire

II.4.2.2.1 La notion de diamètre aérodynamique

Comme décrit ci-dessus, les dépositions par impaction et par sédimentation dépendent principalement de la masse des particules et donc de leur taille et de leur densité. Or, comme les particules sont habituellement décrites en termes de taille plutôt que de masse, la notion de diamètre aérodynamique a été introduite. Le diamètre aérodynamique permet de caractériser la taille d'une particule en tenant compte de sa densité et se définit comme le diamètre d'une particule sphérique de densité unitaire, ayant la même vitesse de sédimentation (et donc la même masse) que la particule décrite. Il peut être calculé selon la formule suivante (Fiegel et al., 2004):

$$d_{aéro} = \frac{d_{géom.} \cdot (\rho / \rho_a)^{1/2}}{\gamma}$$

Où $d_{aéro}$ = diamètre aérodynamique

$d_{\text{géom}}$ = diamètre géométrique

ρ = densité de la particule

ρ_a = densité de l'eau (= 1)

γ = facteur de forme (= 1 dans le cas de particules sphériques)

Ainsi une particule ayant un diamètre géométrique de 1 μm et une densité de 1 se déposera de la même façon dans le tractus respiratoire qu'une particule de 10 μm ayant une densité de 0,01 (Hanes et al., 2004).

Le diamètre aérodynamique est l'unité de mesure adéquate pour caractériser la taille des particules se déposant par impaction et sédimentation. La diffusion brownienne qui est le mécanisme de déposition prédominant pour les particules de moins de 0,5 μm dépend de la taille des particules et non de leur densité. La notion de diamètre aérodynamique ne sera donc pas utilisée pour définir ces petites particules (Lippmann et al., 1980).

II.4.2.2.2 La déposition en fonction de la taille des particules

La figure II-6 représente les trois principaux mécanismes de déposition des particules et leurs importances respectives selon la taille particulaire (exprimé en diamètre géométrique pour des particules sphériques de densité 1 ce qui équivaut au diamètre aérodynamique).

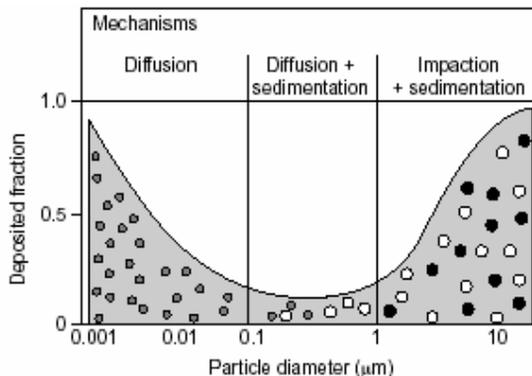


Figure II-6 : Schéma des trois principaux mécanismes de déposition en fonction du diamètre aérodynamique des particules.

Il est cependant difficile de prévoir avec certitude par quel mécanisme et où vont se déposer les particules en fonction de leur taille car d'autres facteurs comme les variations anatomiques et les différences de profils respiratoires inter-individus interviennent également (Labiris et al., 2003a) (Voir pages 19 et 20).

Toutefois, il est généralement admis que la plupart des particules ayant un diamètre aérodynamique **>10 µm** se déposent dans la zone oropharyngée, principalement par impaction au niveau du larynx et plus particulièrement lorsque le flux respiratoire est important. Ces particules sont ensuite avalées puis peuvent être résorbées au niveau du tractus gastro-intestinal et éventuellement participer à l'action thérapeutique.

Les particules possédant un diamètre aérodynamique compris **entre 5 et 10 µm** se déposent par impaction mais également par sédimentation dans les voies aériennes centrales (les plus larges) et dans la région oropharyngée.

Entre **0,5 et 5 µm**, la déposition des particules s'effectue au niveau des voies aériennes les plus étroites ainsi que dans les alvéoles pulmonaires (Malcolmson et al., 1998). Ainsi, plus de 50% des particules de diamètre aérodynamique compris entre 0,5 et 3 µm se déposent au niveau alvéolaire (Folkesson et al., 1990; Patton, 1996).

Les particules **< 0,5 µm** seront exhalées ou se déposeront par diffusion principalement au niveau alvéolaire.

Il est également important de noter que le tractus respiratoire présente une humidité relative de 99,5% qui peut augmenter la taille des particules hygroscopiques et ce, d'autant plus que les particules initiales sont petites. Ainsi, le diamètre des fines particules (**< 1 µm**) hygroscopiques peut être multiplié par 5 tandis que celui des particules supérieures à 2 µm peut être augmenté d'un facteur 2 ou 3 (Labiris et al., 2003a).

A l'inverse, les composants volatils peuvent s'évaporer et diminuer la taille des particules ou gouttelettes administrées par inhalation (Courrier et al., 2002; Gonda et al., 2003; Lippmann et al., 1980).

II.4.2.3 Influence du profil de respiration sur la déposition pulmonaire

Même lorsque l'ensemble des caractéristiques des particules est bien contrôlé, d'autres facteurs comme le profil de respiration et les variations inter-individus, plus difficiles à déterminer et à contrôler, influencent la déposition particulaire dans le système respiratoire. C'est la raison pour laquelle, les avancées dans le domaine de l'administration par inhalation sont assez lentes (Brand et al., 2000). En effet, malgré une recherche accrue, jusqu'il y a peu et avant l'arrivée de l'Exubera® (Voir page 8), il n'existait sur le marché aucune molécule à effet systémique administrée par inhalation.

Brand a démontré qu'en contrôlant le profil de respiration de façon à obtenir un flux respiratoire lent lors de l'inhalation, la déposition totale était largement favorisée : $\pm 80\%$ pour des particules monodispersées de $3 \mu\text{m}$ lorsque la respiration est lente contre $\pm 60\%$ pour une respiration spontanée. De même les variations inter-individus sont trois fois plus importantes lorsque la respiration n'est pas contrôlée comparativement à un flux respiratoire ralenti et ce, tant pour les patients sains que pour ceux présentant une pathologie pulmonaire (Brand et al., 2000). A l'inverse, des mouvements respiratoires rapides et saccadés favorisent l'impaction des particules inhalées dans les voies aériennes centrales (Pavia et al., 1977; Schlesinger et al., 1976). La standardisation des profils de respiration lors de l'inhalation semble donc être un facteur nécessaire à l'obtention de fractions respirables reproductibles et donc au développement de formes à administration pulmonaire (Brand et al., 2000; Labiris et al., 2003a).

De même, il a été démontré que le blocage de la respiration durant quelques secondes après l'inhalation d'un aérosol favorise la déposition par sédimentation et par diffusion et augmente donc significativement la déposition des particules fines (Newman et al., 1982).

II.4.2.4 Influence du patient sur la déposition pulmonaire

Les variations anatomiques inter-individus sont également à prendre en compte dans la déposition des particules. Ainsi le calibre des voies respiratoires varie selon l'âge (différences importantes de calibre entre le jeune enfant et l'adulte) (de Boer, 2005; Schulz, 1998). De même, les pathologies pulmonaires caractérisées par une inflammation et/ou une bronchoconstriction peuvent altérer la déposition dans le système respiratoire (Labiris et al., 2003a; Lee et al., 1978; Lipworth et al., 1997; Schulz, 1998).

En effet, l'accumulation de mucus et le rétrécissement du calibre des voies aériennes augmentent les turbulences de l'air là où le flux est ordinairement laminaire, modifiant la déposition des particules. Certaines zones sont ainsi obstruées et ne peuvent dès lors plus être atteintes par les particules, alors que ces zones sont la plupart du temps celles à atteindre pour obtenir un effet thérapeutique (Labiris et al., 2003a).

II.4.2.5 Les sites d'action des substances médicamenteuses administrées par inhalation

Les sites d'action diffèrent selon l'affection à traiter et selon la molécule administrée. Afin de favoriser la déposition à cet endroit en optimisant le diamètre aérodynamique, il est important de savoir quels sont les sites d'action correspondant aux principes actifs administrés et où sont localisés ces sites.

II.4.2.5.1 Action locale

Les principales cibles des substances administrées par inhalation en vue d'une action locale sont les suivantes (de Boer, 2005):

Les cellules inflammatoires : Les éosinophiles et les lymphocytes sont les cellules associées à l'inflammation des voies respiratoires chez le sujet asthmatique (Carroll et al., 1997). Or les études menées jusqu'à présent divergent quant à la localisation des cellules inflammatoires dans le tractus respiratoire. Ainsi selon Saetta, les lymphocytes et éosinophiles s'accumuleraient préférentiellement au niveau des bronchioles terminales (de diamètre < 2 mm) (Saetta et al., 1991) tandis que Synek a mis en évidence chez le patient asthmatique une augmentation des éosinophiles dans les voies aériennes plus larges (> 2 mm) (Synek et al., 1996). Cela a mené à des discussions quant à savoir si l'inflammation dans l'asthme était prédominante au niveau central (Poutler, 1997) ou périphérique (Hamid, 1997). D'autres études ont montré que l'augmentation des cellules inflammatoires se produisait de la même façon dans tout le tractus respiratoire (Carroll et al., 1997; Chrystyn, 1997). Dans le même ordre d'idées, Pedersen a montré que le site d'action des corticostéroïdes inhalés, à savoir les récepteurs intercellulaires aux glucocorticoïdes étaient présents dans la plupart des types de cellules respiratoires (Pedersen et al., 1997). Le consensus actuel recommande une distribution des stéroïdes inhalés dans tout le système respiratoire (Leach, 1998).

Les récepteurs β_2 -adrénergiques : La localisation des récepteurs β_2 -adrénergiques varie également selon les études. Ainsi, une haute densité en récepteurs β -adrénergiques a été mise en évidence à la fois au niveau des voies aériennes centrales (les plus larges) (Howarth, 1997) ainsi que dans les plus petites voies aériennes (Chrystyn, 1997). En descendant dans le tractus respiratoire jusqu'aux bronchioles de faible diamètre, seuls les récepteurs β_2 -adrénergiques sont présents, tandis qu'à partir des canaux alvéolaires on observe à la fois des récepteurs β_1 et β_2 dont les prévalences relatives restent à déterminer (Carstairs et al., 1985). Selon Labiris, 90% des récepteurs β -adrénergiques se situeraient au niveau alvéolaire, une région où il n'y a pas de muscles lisses (Labiris et al., 2003a). Le rôle des récepteurs β -adrénergiques situés à cet endroit n'est pas élucidé ; ce sont les récepteurs situés au niveau des muscles

lisses des bronchioles non cartilagineuses et de faible calibre qui doivent être stimulés pour obtenir une bronchodilatation (Chrystyn, 1997).

Les récepteurs muscariniques M3 : Ils seraient situés principalement au niveau de la zone de conduction du système respiratoire et seraient quasiment absents au niveau alvéolaire (Howarth, 1997; Mak et al., 1990).

Les bactéries pathogènes : La plupart des pneumonies affectent simultanément tout l'arbre respiratoire. Les antibiotiques doivent donc atteindre toutes les zones du système respiratoire. Il est toutefois important de noter que les accumulations de mucus consécutifs à une infection peuvent bloquer la déposition des substances médicamenteuses au niveau des bronchioles les plus étroites et donc limiter l'efficacité du traitement (Labiris et al., 2003a).

Au vu de ces considérations, la taille des particules et donc la zone du système respiratoire dans laquelle elles se déposent semble influencer l'efficacité thérapeutique des traitements administrés par inhalation. Diverses études parfois contradictoires ont tenté de montrer la corrélation entre taille des particules et efficacité du traitement (Johnson et al., 1989; Padfield et al., 1983; Zanen et al., 1996; Zanen et al., 1994; Zanen et al., 1995) .

II.4.2.5.2 Action systémique

Jusqu'il y a peu, les administrations de substances médicamenteuses par inhalation étaient réservées au traitement d'affections locales. En effet, les dispositifs pour inhalation ne permettaient de déposer au niveau alvéolaire que 10 à 15% de la dose émise. Il était donc nécessaire d'administrer de grandes quantités de principes actifs. Les progrès effectués dans les dispositifs pour inhalation ont permis d'améliorer la fraction déposée dans les alvéoles pulmonaires, là où le principe actif peut être absorbé au niveau systémique (Labiris et al., 2003a).

II.4.3 Influence du temps de rétention au niveau du site d'action ou de la vitesse d'absorption dans le sang

II.4.3.1 Introduction

Lorsqu'un effet local est recherché, l'efficacité thérapeutique de la substance administrée dépendra du temps de rétention au niveau du site d'action tandis que pour un effet systémique, l'efficacité d'action sera fonction de l'absorption du principe actif dans le sang.

Or, comme le système respiratoire constitue une surface d'échange importante avec l'extérieur, il a élaboré différents mécanismes visant à empêcher la pénétration au sein de l'organisme de diverses particules inhalées (poussières, bactéries, virus ...) mais qui peuvent également constituer une barrière à l'efficacité thérapeutique des substances inhalées.

Tout d'abord, comme décrit à la page 9, la géométrie complexe des voies aériennes constituées de nombreux embranchements dichotomiques fait que la plupart des particules sont soit exhalées soit impactées bien avant d'atteindre les voies aériennes périphériques.

Ensuite, différents mécanismes de clairance pulmonaire interviennent pour empêcher la pénétration de particules indésirables. Les deux principaux mécanismes de clairance pulmonaire sont (a) le système muco-ciliaire intervenant au niveau des voies respiratoires les plus larges et (b) les macrophages alvéolaires présents à la fois au niveau des bronchioles et des alvéoles (Groneberg et al., 2003).

Ainsi, une fois déposées au niveau pulmonaire, les particules peuvent soit être éliminées par les mécanismes de clairance, soit absorbées au niveau systémique, soit dégradées (métabolisées).

II.4.3.2 La clairance muco-ciliaire

L'épithélium cilié constitue 30 à 65 % de l'épithélium pulmonaire (Groneberg et al., 2003) et s'étend de la trachée aux bronchioles terminales. Les particules insolubles qui se déposent dans cette partie de l'arbre respiratoire sont piégées dans le mucus recouvrant l'épithélium pulmonaire. Le mucus (et les particules) peuvent remonter vers le pharynx puis l'oropharynx grâce au mouvement coordonné des cils de l'épithélium pour finalement être avalé, voire expectoré si celui-ci est produit en grande quantité : C'est ce qu'on appelle l'ascenseur muco-ciliaire (Dolovich et al., 1987). Le pourcentage de cellules ciliées diminuant lorsqu'on descend dans les voies respiratoires (53% de cellules ciliées dans la trachée contre 15% au niveau des bronches de cinquième génération), l'activité muco-ciliaire diminue en parallèle (Serafini et al., 1977). L'élimination des particules par transport muco-ciliaire peut prendre de quelques minutes pour les particules déposées au niveau de la trachée jusqu'à plusieurs heures lorsqu'elles se trouvent dans les voies aériennes inférieures (Groneberg et al., 2003). Il est important de noter que la clairance muco-ciliaire peut être influencée par des facteurs physiologiques, par l'environnement (SO₂, CO₂, tabac,...) et par certaines pathologies (asthme, fibrose kystique, BPCO, ...) (Courrier et al., 2002).

II.4.3.3 La phagocytose par les macrophages

Les substances qui se déposent au niveau alvéolaire peuvent soit être absorbées au niveau systémique, soit être phagocytées par les macrophages qui sont au nombre de 5 à 7 par alvéole (Stone et al., 1992).

Les particules peuvent adhérer aux macrophages alvéolaires par interaction électrostatique, ou via des récepteurs dans le cas de certaines macromolécules telles les immunoglobulines. Après adhésion, les macrophages internalisent les particules par formation de vacuoles, par cavitation de surface ou formation de pseudopodes (Stossel, 1977).

Les particules internalisées peuvent ensuite être métabolisées ou digérées par diverses enzymes (Groneberg et al., 2003). Le macrophage activé peut être éliminé par l'ascenseur muco-ciliaire ou traverser l'épithélium respiratoire de façon à rejoindre les tissus interstitiels puis parfois au bout de plusieurs mois, la circulation lymphatique ou sanguine (Folkesson et al., 1996; Martonen, 1993).

La capture et la vitesse de phagocytose des particules par les macrophages dépendent de leur taille et de leur composition : ainsi, il apparaît que les particules de 6 μm sont moins rapidement phagocytées que celles de 3 μm . De plus, il a été démontré que les particules de moins de 0,26 μm étaient moins fréquemment et moins rapidement phagocytées que celles de 3 μm (Courier et al., 2002; Groneberg et al., 2003).

II.4.3.4 L'absorption au niveau systémique

Un autre mécanisme d'élimination des particules est leur résorption, qui se déroule principalement au niveau alvéolaire mais également dans le reste du système respiratoire. Les molécules relativement lipophiles peuvent, après dissolution dans les fluides pulmonaires (Hochhaus, 2004), diffuser facilement à travers l'épithélium respiratoire (transport passif) tandis que les molécules hydrophiles traversent l'épithélium respiratoire soit par diffusion au niveau des jonctions serrées intercellulaires (transport paracellulaire) soit par transport actif (Patton, 1996). Les molécules absorbées peuvent rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique. La vitesse d'absorption est généralement inversement proportionnelle à la taille des molécules (Effros et al., 1983). Toutefois, certaines protéines seraient absorbées à travers l'épithélium pulmonaire à des vitesses indépendantes de leurs masses moléculaires, ce qui suggère l'intervention de transporteurs spécifiques (Folkesson et al., 1996) .

II.4.3.5 La métabolisation des principes actifs

A l'heure actuelle, on ignore encore dans quelle mesure les activités enzymatiques et de métabolisation pulmonaire affectent la concentration et l'efficacité thérapeutique des principes actifs administrés par inhalation. Les enzymes hépatiques sont également présentes au niveau pulmonaire mais en concentrations beaucoup moins élevées (Labiris et al., 2003a; Ma et al., 2006).

Les enzymes du cytochrome P450 γ sont notamment en quantités 5 à 20 fois moindres que dans le foie. Ces enzymes métabolisent certains acides gras, stéroïdes et autres composés lipophiles (Ma et al., 2006).

Les estérases non-spécifiques sont présentes en assez grandes quantités et particulièrement au niveau des alvéoles pulmonaires (Dickinson et al., 1995; Labiris et al., 2003a; McCracken et al., 1993). Ces estérases peuvent hydrolyser les principes actifs et notamment les pro-drogues présentes sous formes d'esters, d'amides ou de thioesters (Dickinson et al., 1995; Foe et al., 2000; Ma et al., 2006; Seville et al., 2000).

Des protéases sont présentes au niveau pulmonaire surtout lors d'un épisode inflammatoire (Labiris et al., 2003a). Ces enzymes jouent un rôle dans la dégradation des peptides et des protéines administrés par inhalation (Ma et al., 2006). Cette activité protéolytique est toutefois limitée par la présence d'inhibiteurs de protéases endogènes (Courrier et al., 2002) et peut également être contrôlée par l'administration concomitante d'inhibiteurs de protéases (ex. : bacitracine, sodium glycocholate) (Morita et al., 1994). Parmi les mécanismes de clairance, la dégradation par les protéases est relativement anecdotique : ainsi, plus de 95% des protéines (notamment l'insuline) restent intactes jusqu'à leur absorption (Folkesson et al., 1996; Ma et al., 2006). Il a toutefois été observé que certains peptides de petite taille tels le glucagon et la somatostatine ont une biodisponibilité inférieure à 1% après administration par inhalation, et ce, en raison d'une dégradation enzymatique au niveau pulmonaire (Patton et al., 1994).

Certains systèmes microparticulaires qui seront décrits dans le chapitre III permettent également de protéger les peptides et les protéines de la dégradation enzymatique (Sundaram et al., 2004).

II.5. Les dispositifs pour administration pulmonaire

II.5.1 Introduction

Les dispositifs pour inhalation utilisés à l'heure actuelle peuvent être séparés en trois grandes catégories : les nébuliseurs, les inhalateurs doseurs pressurisés et les inhalateurs à poudre sèche.

II.5.2 Les nébuliseurs

Ce type de dispositifs est le plus ancien des trois cités et a pour but l'aérosolisation de principes actifs en solution ou en suspension dans l'eau (Gonda et al., 2003). Les nébuliseurs peuvent être classés en nébuliseurs pneumatiques ou ultra-soniques selon leur mode de fonctionnement (Degobert, 2004; Labiris et al., 2003b; Timsina et al., 1994). En fonction de la taille du réservoir, les nébuliseurs ultra-soniques sont dits soit « à petite » soit « à grande » contenance (Degobert, 2004).

Ce dispositif reste celui de choix chez les jeunes enfants et chez les personnes physiquement affaiblies car il ne nécessite ni coordination des mouvements respiratoires ni force expiratoire importante (Gonda et al., 2003). Ils permettent habituellement une humidification des voies respiratoires (Degobert, 2004).

Toutefois les nébuliseurs présentent une série d'inconvénients majeurs. C'est un appareillage encombrant et difficilement transportable (Gonda et al., 2003) qui requiert une source d'énergie. Ces appareils sont assez onéreux et nécessitent une dose de médicament plus importante qu'avec les autres dispositifs pour inhalation (Degobert, 2004). Le temps nécessaire à l'administration est relativement long (entre 10 et 15

minutes) (Gonda et al., 2003). Il est à noter également que les nébuliseurs ultra-soniques à petite contenance, bien que présentant l'avantage d'être moins encombrants, impliquent par leur principe de fonctionnement la mise en contact de la substance à administrer et de la source à haute fréquence qui provoque la nébulisation. Un échauffement de la substance médicamenteuse peut dès lors se produire et provoquer une dégradation du principe actif (notamment dans le cas des corticostéroïdes) (Degobert, 2004).

Seulement 10% de la dose initiale est déposée au niveau pulmonaire (de Boer, 2005; O'Callaghan et al., 1997). Ceci s'explique par le fait qu'une partie du liquide n'est pas aérosolisée (volume mort), que la distribution granulométrique des gouttelettes générées est étendue mais également que l'aérosolisation se produit en continu c'est-à-dire à la fois lors de l'expiration et de l'inspiration : une partie de l'aérosol est donc chassée dans l'environnement lors de l'expiration.

Certains nébuliseurs ont toutefois été récemment développés afin de pouvoir stopper l'aérosolisation lors de phase expiratoire. Ils sont désignés par l'appellation « breath actuated nebuliser » (BAN), c'est-à-dire « dispositif activé par la respiration » (de Boer, 2005; Denyer et al., 2004) (ex. : Halolite[®] de Medic-Aid ; AeroEclipse[®] de Trudell Medical International).

II.5.3 Les inhalateurs doseurs pressurisés-IDP (« Metered dose inhalers- MDI »)

Le premier IDP, appelé Medihaler[®] a été développé en 1956 par Riker Laboratories (ancien nom de 3M Pharmaceuticals, Saint-Paul, USA) (Freedman, 1956; Rubin et al., 2005). Les IDP sont des dispositifs multi-doses qui délivrent une quantité déterminée de principe actif à partir d'une suspension ou d'une solution de ce principe actif dans un gaz propulseur sous haute pression. Ce type de dispositif, représenté à la Figure II-7, est constitué de trois parties distinctes :

- Un réservoir qui contient le principe actif en solution (directement ou à l'aide d'un co-solvant tel l'éthanol) ou en suspension dans un gaz propulseur liquéfié, le propellant (Atkins et al., 2004).
- Une valve doseuse qui permet de délivrer à travers un orifice de sortie une quantité connue du contenu à partir du réservoir.
- Un embout buccal

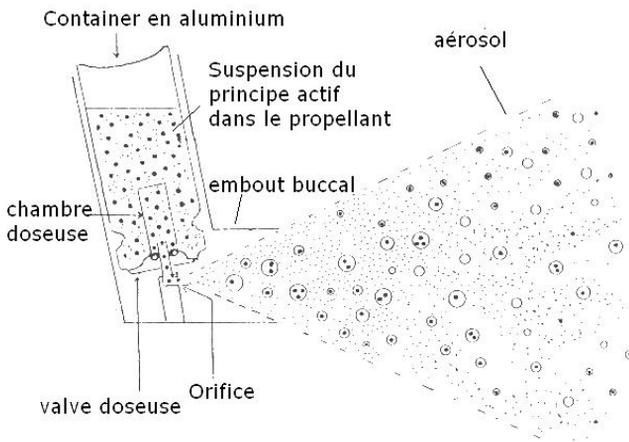


Figure II-7 : Schéma d'un IDP

C'est le mode d'inhalation le plus fréquemment utilisé (Degobert, 2004; Timsina et al., 1994). En effet les IDP présentent les avantages suivants :

- Dispositifs portables et peu onéreux
- Contamination limitée
- Dispositifs multi-doses
- Délivrance de doses reproductibles
- Relative facilité d'emploi

Toutefois les IDP possèdent plusieurs inconvénients à savoir :

- Ils requièrent une synchronisation entre le mouvement inspiratoire et la délivrance de la dose (Timsina et al., 1994) désignée par le terme « coordination main-bouche ».

- La fraction qui se dépose dans les voies aériennes périphériques est inférieure à 20% (Atkins et al., 2004; Labiris et al., 2003b; Leach et al., 1998). Ceci est principalement dû à la grande vitesse (> 30 m/s) à laquelle l'aérosol est projeté hors du dispositif, provoquant l'impaction de plus de 50% des particules au niveau de l'oropharynx (Newman et al., 1981).
- Des problèmes de stabilité ont également été rapportés spécialement lorsque le principe actif est en suspension dans le propellant (Atkins et al., 2004; de Boer, 2005).

Différentes solutions ont été proposées afin de pallier ces inconvénients.

Ainsi, les chambres d'inhalation (ou d'expansion) qui sont placées entre l'embout de l'inhalateur et la bouche du patient sont utilisées afin de remédier au problème de synchronisation, notamment lors de l'administration chez les jeunes enfants, mais également afin de ralentir la vitesse des particules et donc de diminuer leur impaction dans l'oropharynx (Figure II-8). Ces chambres d'inhalation ont prouvé leur efficacité à diminuer l'impaction oro-pharyngée des particules et les effets indésirables pouvant en découler (notamment dans le cas de l'administration de corticostéroïdes) mais sans toutefois augmenter vraiment la fraction respirable. En effet, l'impaction et la sédimentation se produisant dans la chambre d'inhalation conduisent à des pertes en particules (Bisgaard et al., 2002; de Boer, 2005). De même, l'attraction électrostatique qui survient lorsque la chambre d'inhalation est en plastique (ex : Babyhaler[®]), conduit également à des pertes en particules. L'attraction électrostatique peut cependant être réduite par l'utilisation de chambres d'inhalation métalliques (Bisgaard et al., 2002) ou constituées de matériaux antistatiques (ex. : Vortex[®]) (Voeurng et al., 2006). Notons également que l'Idehaler[®], une nouvelle chambre d'inhalation qui se positionne verticalement permet, par cette orientation, d'éviter une déperdition médicamenteuse sur les parois à l'expiration (Dubus et al., 2006).

Afin d'éviter les problèmes de coordination des mouvements respiratoires avec l'activation du système, des dispositifs activés par la respiration ont été mis au point, avec par exemple l'Autohaler® (3M Pharmaceuticals, Minnesota, USA) et l'Easi-Breathe® (Ivax Pharmaceuticals UK, Londres, Angleterre) (de Boer, 2005; Labiris et al., 2003b).

En ce qui concerne les problèmes de stabilité des suspensions, l'ajout d'agents tensio-actifs peut y remédier (Atkins et al., 2004).



Figure II-8 : IDP couplé à une chambre d'inhalation

Notons enfin que les découvertes de Molina et Rowland datant de 1974 et apportant la preuve de l'effet destructeur sur la couche d'ozone des propellants utilisés jusque là, à savoir les CFC (gaz chlorofluorocarbonés), ont conduit à la diminution de leur utilisation puis à leur suppression à la suite de la signature du Protocole de Montréal en 1987 (Molina et al., 1974; Newman, 1990). Ils ont donc été remplacés par des hydrofluorocarbones (HFA). Les propriétés physico-chimiques des HFA étant différentes de celles des CFC, bon nombre de formulations ont dû être retravaillées (Atkins et al., 2004).

II.5.4 Les inhalateurs à poudre sèche-IPS (« Dry powder inhalers- DPI)

II.5.4.1 Introduction

Comme exposé dans le chapitre I, un des objectifs de la partie expérimentale consistera à mettre au point une poudre pour inhalation à partir de microparticules lipidiques solides préalablement produites. C'est la raison pour laquelle les dispositifs pour inhalation à poudre sèche seront plus amplement détaillés.

Une formulation sous forme de poudre sèche a été préférée aux autres formes destinées à l'inhalation, principalement en raison de leur meilleure stabilité (Voir page 33).

II.5.4.2 Les différents types d'IPS

Les inhalateurs à poudre sèche permettent l'aérosolisation de principes actifs à l'état solide. Ils peuvent être séparés en plusieurs catégories : Les dispositifs unidoses, les dispositifs multidoses également appelés réservoirs et les dispositifs à doses unitaires multiples (Srichana et al., 1998).

- **Les dispositifs unidoses** : Ils nécessitent avant chaque utilisation l'introduction d'une gélule qui contient une dose de poudre conditionnée au préalable (Ex. : Spinaler[®], Cyclohaler[®], Rotahaler[®]).
- **Les dispositifs multidoses** : Le principe actif est stocké dans un réservoir, sous lequel se trouve un disque doseur. Par activation du système doseur, une dose déterminée de principe actif est calibrée grâce à un araseur (Ex. : Turbohaler[®], Autohaler[®] et Easyhaler[®])
- **Les dispositifs à doses unitaires multiples** tels les systèmes Diskus[®] et Rotadisk[®]. Ils contiennent plusieurs monodoses de principe actif préconditionnées en blisters.

Le mécanisme de fonctionnement de base des IPS est représenté à la figure II-9.

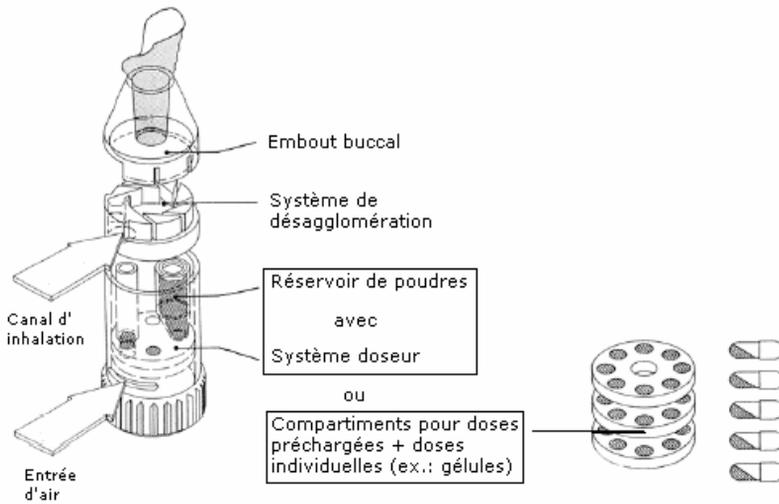


Figure II-9 : Mécanisme de base du fonctionnement d'un IPS

II.5.4.3 Avantages et inconvénients des IPS

Les IPS présentent les avantages suivants (de Boer, 2005):

- Meilleure stabilité du principe actif à l'état solide
- Facilité d'utilisation: Les IPS sont déclenchés par l'inspiration et ne nécessitent donc pas la coordination des mouvements main-bouche
- Risques de contamination microbologique limités comparativement aux formes liquides
- Administration de doses plus importantes en une seule inspiration, contrairement à la nébulisation
- Dispositifs de petite taille, facilement transportables et bon marché
- Meilleure reproductibilité des doses de particules fines

L'inconvénient principal de ce type de dispositif réside dans le fait que le flux inspiratoire du patient doit être compris entre 30 et 60 litres/minute afin d'obtenir une pénétration optimale des particules inhalées, ce qui n'est

pas le cas chez les jeunes enfants et les adultes présentant une obstruction respiratoire (Degobert, 2004).

Des problèmes d'humidité peuvent également survenir principalement dans le cas des dispositifs multi-doses, provoquant une diminution de la stabilité du principe actif, une redispersion moins aisée de la poudre (Srichana et al., 1998) et éventuellement, lorsque les constituants de la poudre sont hygroscopiques, une augmentation de la taille des particules et une modification de la déposition.

II.5.4.4 Formulation d'une poudre pour inhalation

Les poudres pour inhalation doivent être formulées de façon à contenir un principe actif micronisé (entre 0,5 et 5 μm de diamètre aérodynamique). Cependant, dans cette zone de taille, les forces électrostatiques interparticulaires sont importantes et la poudre est généralement cohésive (Byron, 2006). En conséquence, ces poudres ont de mauvaises propriétés d'écoulement, ce qui pose problème lors du remplissage des dispositifs. De plus, la redispersion d'une poudre cohésive sous forme de particules individualisées est peu aisée.

Pour pallier cet inconvénient, deux types de formulation ont été envisagés :

a. Formulation du principe actif sous forme d'agglomérats sphériques :

Cette formulation consiste à « sphéroniser » ou « pelletiser » le principe actif seul ou avec un excipient de dilution micronisé si la dose de principe actif à administrer est trop faible. Ces « pellets sphériques », d'une taille comprise entre 200 et 2000 μm sont le résultat d'une agglomération contrôlée suivie d'une sphéronisation de ces agglomérats (Trofast et al., 2002). Ces sphères sont poreuses et les forces de cohésion entre les particules sont faibles (Figure II-10); l'agglomérat se désagrègera donc facilement lors de l'inhalation afin de libérer les particules micronisées (Boerefijn et al., 1998). Par contre, un choc mécanique sur le dispositif peut provoquer une désagrégation avant

administration avec pour conséquence une diminution de la reproductibilité de la dose émise (de Boer, 2005). Le Pulmicort Turbohaler® est notamment formulé de cette façon et contient des agglomérats sphériques de particules de budésonide.



Figure II-10 : Agglomérat sphérique de particules de principe actif micronisé (Nakate et al., 2005)

b. Formulation d'une poudre par utilisation d'excipients porteurs

Le second type de formulation consiste à mélanger une faible proportion de principe actif avec un excipient porteur de plus grande taille particulaire (de 30 à 100 μm), tel le lactose (Staniforth, 1987). De cette façon le principe actif adhère à la surface de l'excipient.

Le mélange obtenu offre une certaine résistance à la ségrégation particulaire (ce qui limite les problèmes d'uniformité d'émission) mais aussi à la désagrégation du principe actif à partir de l'excipient porteur lors de l'administration. Or, afin d'éviter une déposition accrue au niveau de la sphère oropharyngée, il est important que la fixation du principe actif sur l'excipient porteur soit réversible (Labiris et al., 2003b; Malcolmson et al., 1998).

Staniforth a mis en évidence l'influence de la surface de l'excipient porteur sur les forces d'adhésion entre les particules micronisées de principe actif et l'excipient (Staniforth, 1987). Ainsi une particule porteuse présentera à sa surface à la fois des sites à haute et à basse affinités pour

le principe actif. Une particule rugueuse présentera plus de sites à haute énergie qu'une particule lisse et libérera donc moins facilement le principe actif micronisé fixé à sa surface (Kawashima et al., 1998; Staniforth, 1995).

Afin d'optimiser la libération du principe actif à partir de l'excipient porteur et donc de favoriser la déposition dans les voies aériennes inférieures, ce type de formulation a été amélioré. Ainsi, un excipient micronisé sera ajouté afin d'obtenir un mélange ternaire. Cet agent ternaire peut être du stéarate de magnésium (Ganderton, 1992), de la L-leucine (Lucas et al., 1999; Staniforth, 1996) ou peut être de même nature que l'excipient porteur (Lucas et al., 1998; Staniforth, 1995; Zeng et al., 1998). Cette dernière option est à préférer à l'ajout d'excipient micronisé de nature différente de l'excipient porteur car elle ne requiert pas d'essais toxicologiques complémentaires (Tee et al., 2000). Les mélanges ternaires améliorent la déposition pulmonaire comparativement aux mélanges binaires (Ganderton, 1992; Louey et al., 2002; Lucas et al., 1998; Zeng et al., 1998). Toutefois le mécanisme d'action de ces composés dits « ternaires » n'est pas clairement élucidé. Deux théories s'opposent, à savoir (Louey et al., 2002):

- La théorie la plus communément admise, développée initialement par Hersey, est celle de la saturation par l'excipient micronisé des sites à haute énergie de fixation de l'excipient porteur (Hersey, 1975). Dans ce cas, l'excipient micronisé (ou agent ternaire) joue le rôle d'excipient compétiteur. L'ordre d'ajout des composants y est important. En effet l'excipient compétiteur devra d'abord être mélangé avec l'excipient porteur afin de saturer prioritairement les sites à haute énergie et de laisser les sites à plus basse énergie libres pour le principe actif qui sera ensuite ajouté. En présence de l'excipient compétiteur, l'adhésion sera donc moindre entre l'excipient porteur et le principe actif ce qui facilitera le détachement de ce dernier lors de l'administration (Ganderton, 1992; Malcolmson et al., 1998; Zeng et al., 1999). Cette théorie est schématisée à la figure II-11 et illustrée à la figure II-2.

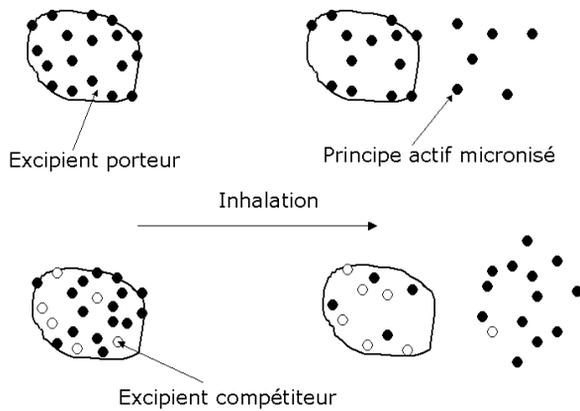


Figure II-11 : Représentation de la libération d'un principe actif micronisé à partir d'un excipient porteur avec ou sans excipient compétiteur (Bertholet, 2006)

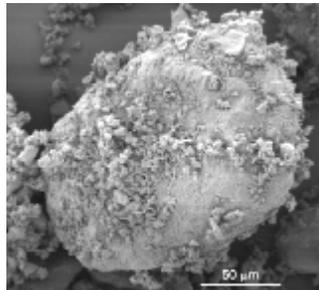


Figure II-12 : Image de microscopie électronique d'un excipient porteur (lactose) en présence d'un excipient micronisé (L-leucine) (Malcolmson et al., 1998)

- Une autre théorie suggère que l'ordre d'ajout des constituants du mélange n'influence pas la déposition pulmonaire du principe actif (Lucas et al., 1998). Ainsi, il a été observé par microscopie électronique que le principe actif et l'excipient micronisé peuvent s'arranger de façon à former des agrégats dénommés « multiplets ». L'augmentation de la fraction respirable serait due

soit à une diminution des forces adhésives entre le principe actif et l'excipient micronisé au sein d'un multiplet (comparativement à l'adhésion avec l'excipient porteur), soit à une déposition du principe actif au niveau des voies respiratoires inférieures sous la forme de multiplets.

Actuellement la FDA n'autorise que le lactose, le glucose et le mannitol comme excipient pour la voie pulmonaire. Ce sont donc ces trois composés qui sont essentiellement utilisés comme excipients porteurs et micronisés, avec une préférence pour le lactose dont le profil toxicologique est mieux connu. Toutefois, le lactose, en tant que sucre réducteur est plutôt inapproprié en présence de certains principes actifs tels les peptides, les protéines, mais également le budésonide et le formotérol (Patton et al., 1992; Steckel et al., 2004; Tee et al., 2000).

Il est également important de noter que la déposition dans l'arbre respiratoire obtenue avec les IPS varie entre 12 et 40% selon le type de dispositif utilisé tandis que 20 à 25% du principe actif est retenu dans le système (Labiris et al., 2003b). Ces taux de déposition relativement peu élevés peuvent être dus à une mauvaise désagrégation de la poudre en fines particules. Il a également été démontré qu'à l'inverse des IDP, l'augmentation du débit inspiratoire favorisait la désagrégation et améliorait la déposition pulmonaire. Ainsi, Borgstrom a pu montrer que lorsque le débit inspiratoire à travers un Turbohaler® passait de 35 à 60 l/min., la déposition pulmonaire du principe actif étudié (en l'occurrence la terbutaline) passait de 14,8 à 27,7% (Borgstrom et al., 1994). Afin de limiter l'influence de la capacité respiratoire sur la désagrégation et donc sur la déposition en facilitant la redispersion et l'inhalation profonde de la poudre, des systèmes de compression d'air ont été intégrés dans les nouveaux dispositifs (ex. : Spiros®, Dura Pharmaceuticals, San Diego, USA ; Nektar Advanced Pulmonary Delivery®, Nektar Therapeutics, San Carlos, USA; Aspirair®, Vectura, Cambridge, UK...). Ces nouveaux dispositifs d'inhalation sont qualifiés de dispositifs actifs (Tobyn et al.,

2004). Ainsi la première insuline inhalée mise récemment sur le marché sous le nom d'Exubera® (Voir page 8) utilise le dispositif actif Nektar Advanced Pulmonary Delivery®.

II.6. Evaluation des formes pharmaceutiques destinées à l'inhalation

Comme cela a été décrit dans les paragraphes précédents, l'efficacité d'un traitement administré par inhalation dépend de la quantité de principe actif se déposant au niveau du site d'action ou disponible pour une résorption (Weda et al., 2002). La déposition d'une substance aérosolisée peut être mesurée par des techniques *in vitro* et *in vivo*, ou peut être indirectement déduite d'études pharmacocinétiques. Enfin l'efficacité d'un aérosol médicamenteux peut être évaluée dans le cadre d'études cliniques.

II.6.1 Mesures *in vitro* de la déposition dans l'arbre respiratoire

Il existe différents types d'appareillages permettant d'évaluer la déposition *in vitro* de principes actifs délivrés au moyen d'un IDP ou d'un IPS. Pour l'évaluation aérodynamique des particules fines, la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition recommande l'utilisation des appareillages suivants représentés à la figure II-13:

L'impacteur liquide multi-étages (MSLI) : Il est constitué de 4 étages de séparation et d'un étage de filtration. Les diamètres de coupure de chaque étage dépendent du débit auquel se fait la mesure. Un liquide de récupération est placé au niveau des 4 étages afin de mimer l'humidité des voies respiratoires. Toutefois son utilisation en routine est fastidieuse : C'est un appareil lourd, difficile à manipuler et qui requiert beaucoup de soin pour récolter quantitativement le liquide de récupération et les particules qui s'y sont déposées.

L'impacteur à cascade Andersen : Il comporte 9 étages dont un de filtration, chacun simulant une zone du système respiratoire. Ces nombreux plateaux permettent de donner une distribution granulométrique détaillée des particules constitutives de l'aérosol, même si les diamètres de coupure de cet impacteur ne sont pas à intervalles réguliers. Etant donné qu'il travaille à sec, la corrélation *in vivo* / *in vitro* est moins évidente à établir.

L'impacteur de type E : Il s'agit d'un impacteur nouvelle génération, constitué de 7 étages et d'un collecteur terminal permettant de séparer des particules de diamètre compris entre 0,24 μm et 11,7 μm à intervalles réguliers. L'appareil est formé de coupelles d'impaction amovibles situées sur un même plan. La récolte du principe actif est y plus aisée qu'avec les impacteurs Andersen ou MSLI.

Impacteur à cascade en verre (Twin Impinger) : Cet impacteur est plus ancien que les trois précédemment cités. Il est toutefois encore couramment utilisé surtout en routine dans le développement des formes pulmonaires (Najafabi et al., 2004; Steckel et al., 1997a; Steckel et al., 1997b). Il est constitué de 2 étages et permet de séparer les particules en 2 fractions, l'une supérieure et l'autre inférieure à 6,4 μm . Son coût est relativement peu élevé, sa manipulation est aisée et il est facile de récolter quantitativement le liquide de récupération et les particules qui se sont déposées au niveau des 2 étages d'impaction.

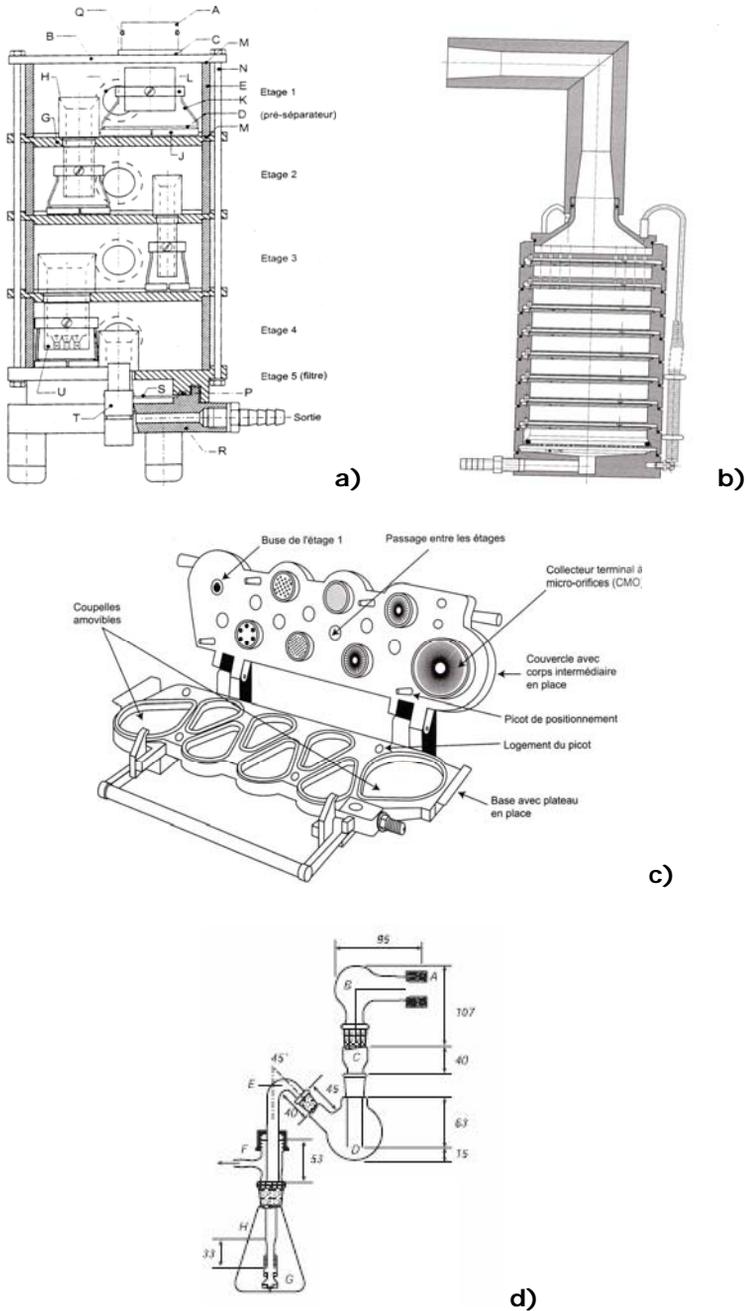


Figure II-13 : MSLI (a), Impacteur Andersen (b), Impacteur de type E (c) et Impacteur à cascade en verre (d)

II.6.2 Mesures *in vivo* de la déposition dans l'arbre respiratoire par γ -scintigraphie

La γ -scintigraphie consiste à faire inhaler à un sujet un aérosol marqué par un radioélément (généralement du technétium 99). Les zones de déposition et les quantités de particules radiomarquées déposées peuvent ensuite être visualisées (Fok et al., 1999; Newman et al., 2002). Ces études peuvent être réalisées à la fois chez des sujets sains ou malades, ce qui peut notamment permettre d'évaluer l'influence d'une pathologie broncho-pulmonaire sur la déposition particulaire. Certaines données pharmacocinétiques (clairance muco-ciliaire et macrophagienne, résorption,...) peuvent être mesurées en suivant l'évolution du radioélément après déposition (Dolovich et al., 1987; Newman et al., 1998).

Cette technique comporte toutefois certains inconvénients : ainsi, elle mesure l'évolution du radioélément et non de la substance active ; si le radioélément et le principe actif ne sont associés que physiquement (par mélange) et non pas chimiquement, ils peuvent se dissocier lors de l'administration ou après déposition, biaisant ainsi les résultats (Dolovich, 2001). De plus comme l'étape de marquage est susceptible de modifier les propriétés des particules, notamment la distribution granulométrique, il est important de valider le processus de radiomarquage (Sebti et al., 2006).

Tout comme l'étude de déposition *in vitro* utilisant les impacteurs, l'évaluation de la déposition par utilisation de radiomarqueurs est une technique intéressante, notamment pour comparer différents dispositifs et/ou formulations pour inhalation. Il convient toutefois de garder à l'esprit que la corrélation entre les résultats de déposition obtenus par ces deux techniques et les résultats des essais d'efficacité clinique n'est pas clairement établie (Weda et al., 2002).

II.6.3 Etudes pharmacocinétiques

L'étude pharmacocinétique consiste à déterminer la quantité de principe actif ayant été résorbée en fonction du temps. Cette démarche est logique lorsqu'un effet systémique est attendu, mais est moins évidente lorsqu'il s'agit d'une administration visant un effet local. Dans ce dernier cas, les études pharmacocinétiques ne devraient être utilisées qu'avec précaution. En effet, lorsqu'un effet local est recherché, les dosages du principe actif après résorption ne peuvent être corrélés avec certitude à l'efficacité d'action de la molécule active. En effet, en administrant du propionate de fluticasone par voie orale et par inhalation, Högger a montré que pour des taux plasmatiques comparables, seule l'administration pulmonaire avait un effet sur l'inflammation des voies aériennes (Högger et al., 1995; Högger et al., 1996). A l'opposé, d'autres auteurs ont réussi à corréliser les taux plasmatiques ou urinaires d'agents antiasthmatiques (notamment de certains β_2 -mimétiques) avec une mesure d'efficacité (Lotvall, 1997; Silkstone et al., 2002). Ceci démontre que les études pharmacocinétiques peuvent apporter des informations concernant l'efficacité ou la bioéquivalence des préparations pour inhalation.

Pendant, pour les molécules à visée thérapeutique locale, c'est-à-dire lorsque l'étude pharmacocinétique est utilisée comme outil de mesure indirecte de la déposition pulmonaire, il convient de rester prudent dans l'analyse des résultats si aucune étude d'efficacité clinique n'est menée en parallèle.

II.6.4 Etudes cliniques d'efficacité

Les études cliniques d'efficacité sont généralement lourdes, coûteuses et nécessitent le recours à des sujets volontaires sains et/ou malades qu'il n'est pas toujours aisé de recruter. De plus, les résultats obtenus sont tributaires de variations inter- et intra-individus qui peuvent être importantes (Weda et al., 2002). Ce type d'étude est toutefois nécessaire dans les phases ultimes du développement d'une forme pharmaceutique.

II.7. Références bibliographiques

Atkins P.J., Crowder T.M., 2004. The design and development of inhalation drug delivery systems. In: *Pharmaceutical inhalation aerosol technology*, chap.9, Hickey A.J. (Ed), 279-309.

Bertholet P., 2006. Intérêt des cyclodextrines dans le développement galénique de formes pulmonaires à base de RO 28-2653, un inhibiteur des métalloprotéases matricielles. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, Belgique.

Bisgaard H., Anhoj J., Wildhaber J.H., 2002. Spacer devices. In: *Drug delivery to the lung*, Bisgaard H., O'Callaghan C. (Eds), New-York, pp 389-420.

Boerefijn R., Ning Z., Ghadiri M., 1998. Disintegration of weak lactose agglomerates for inhalation applications. *Int.J.Pharm.* 172 (1-2), 199-209.

Borgstrom L., Bondesson E., Moren F., Trofast E., Newman S.P., 1994. Lung deposition of budesonide inhaled via Turbuhaler: a comparison with terbutaline sulphate in normal subjects. *Eur.Respir.J.* 7 (1), 69-73.

Brand P., Friemel I., Meyer T., Schulz H., Heyder J., Haubinger K., 2000. Total deposition of therapeutic particles during spontaneous and controlled inhalations. *J.Pharm.Sci.* 89 (6), 724-731.

Byron P.R., 2006. Some future perspectives for unit dose inhalation aerosols. *Drug Dev.Ind.Pharm.* 12, 993-1015.

Carroll N., Cooke C., James A., 1997. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. *Eur.Respir.J.* 10 (2), 292-300.

Carstairs J.R., Nimmo A.J., Barnes P.J., 1985. Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtypes in human lung. *Am.Rev.Respir.Dis.* 132 (3), 541-547.

Chrystyn H., 1997. Is total particle dose more important than particle distribution? *Respir.Med.* 91, Suppl A, 17-19.

Clark A.R., 2004. Pulmonary delivery technology: Recent advances and potential for the new millenium. In: *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*, chap.19, Hickey A.J. (Ed), 571-591.

Chapitre II: Administration de substances médicamenteuses par inhalation

Courrier H.M., Butz N., Vandamme T.F., 2002. Pulmonary drug delivery systems: Recent developments and prospects. *Crit.Rev.Ther.Drug Carr.Syst.* 19 (4,5), 425-498.

de Boer A.H., 2005. Optimisation of dry powder inhalation: The application of air classifier and laser diffraction technology for the generation and characterisation of aerosols from adhesive mixtures. Proefschrift ter verkrijging van het doctoraat in de wiskunde and natuurwetenschappen, Rijksuniversiteit, Groningen, Nederland.

Degobert G., 2004. Dispositifs d'administration pulmonaire. In: *Nouvelles formes médicamenteuses*, TEC&DOC et EMinter (Eds), Paris, pp 195-212.

Denyer J., Nikander K., Smith N.J., 2004. Adaptive Aerosol Delivery (AAD) technology. *Expert.Opin.Drug Deliv.* 1 (1), 165-176.

Dickinson P.A., Taylor G., 1995. Pulmonary and blood enzyme kinetics as predictors of pulmonary metabolism of esters. *Int.J.Pharm.* 116, 231-236.

Dolovich M.B., 2001. Measuring total and regional lung deposition using inhaled radiotracers. *J.Aerosol Med.* 14, Suppl 1, S35-S44.

Dolovich M.B., Jordana M., Newhouse M.T., 1987. Methodologic considerations in mucociliary clearance and lung epithelial absorption measurements. *Eur.J.Nucl.Med.* 13, S45-S52.

Dubus J.C., Bosdure E., Andrieu V., 2006. Les systemes d'inhalation en[no-break space]2006. *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 46 (6), 556-559.

Effros R.M., Mason G.R., 1983. Measurements of pulmonary epithelial permeability in vivo. *Am.Rev.Respir.Dis.* 127 (5 Pt 2), S59-S65.

Fiegel J., Fu J., Hanes J., 2004. Poly(ether-anhydride) dry powder aerosols for sustained drug delivery in the lungs. *J.Control.Release* 96 (3), 411-423.

Foe K., Cutler D.J., Brown K.F., Seale J.P., 2000. Metabolism kinetics of beclomethasone propionate esters in human lung homogenates. *Pharm.Res.* 17 (8), 1007-1012.

Fok T.F., al Essa M., Kirpalani H., Monkman S., Bowen B., Coates G., Dolovich M., 1999. Estimation of pulmonary deposition of aerosol using gamma scintigraphy. *J.Aerosol Med.* 12 (1), 9-15.

Folkesson H.G., Matthay M.A., Westrom B.R., Kim K.J., Karlsson B.W., Hastings R.H., 1996. Alveolar epithelial clearance of protein. *J.Appl.Physiol* 80 (5), 1431-1445.

Folkesson H.G., Westrom B.R., Karlsson B.W., 1990. Permeability of the respiratory tract to different-sized macromolecules after intratracheal instillation in young and adult rats. *Acta Physiol Scand.* 139 (2), 347-354.

Freedman T., 1956. Medihaler therapy for bronchial asthma; a new type of aerosol therapy. *Postgrad.Med.* 20 (6), 667-673.

Ganderton D., 1992. The generation of respirable clouds from coarse powder aggregates. *J.Biopharm.Sci* 3, 101-105.

Gonda I., 2004. Targeting by deposition. In: *Pharmaceutical inhalation aerosol technology*, chap.3, Hickey A.J. (Ed), 65-88.

Gonda I., Schuster J., 2003. Pulmonary delivery of drugs by inhalation. In: *Modified-release drug delivery technology*, chap.67, Rathbone M.J., Hadgraft J. (Eds), 807-815.

Groneberg D.A., Witt C., Wagner U., Chung K.F., Fischer A., 2003. Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respir.Med.* 97 (4), 382-387.

Hamid Q.A., 1997. Peripheral inflammation is more important than central inflammation. *Respiratory Medicine* 91 (Supplement 1), 11-12.

Hanes J., Dawson M., Yah-el H., Junghae S., Fiegel J., 2004. Gene delivery to the lung. In: *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*, chap.16, Hickey A.J. (Ed), 489-539.

Heinen, E., 2006. Cours d'histologie humaine: Module respiratoire. Université de Liège, Belgique (Ed),

Hersey G., 1975. Ordered mixing: a new concept in powder practice. *Powder Technology* 11, 41-44.

Hickey A.J., Thompson D.C., 2004. Physiology of the airways. In: *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*, chap.1, Hickey A.J. (Ed), 1-29.

Hochhaus G., 2004. New developments in corticosteroids. *The proceedings of the american thoracic society* 1, 269-274.

Högger P., Esmailpour N., Bonsmann U., Rohdewald P., 1996. Retention of inhaled fluticasone propionate in human airway tissue and redistribution into blood plasma in vitro and in vivo. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 153 A339-A340.

Högger P., Esmailpour N., Rabe K., 1995. Distribution of inhaled fluticasone propionate between lung tissue and blood plasma in vivo. *Eur.Respir.J.* 8, 3035-3041.

Howarth P.H., 1997. What is the nature of asthma and where are the therapeutic targets?. *Respir.Med.* 91 (Suppl. a), 2-8.

Johnson M.A., Newman S.P., Bloom R., Talaei N., Clarke S.W., 1989. Delivery of albuterol and ipratropium bromide from two nebulizer systems in chronic stable asthma. Efficacy and pulmonary deposition. *Chest* 96 (1), 6-10.

Kawashima Y., Serigano T., Hino T., Yamamoto H., Takeuchi H., 1998. A new powder design method to improve inhalation efficiency of pranlukast hydrate dry powder aerosols by surface modification with hydroxypropylmethylcellulose phthalate nanospheres. *Pharm.Res.* 15 (11), 1748-1752.

Labiris N.R., Dolovich M.B., 2003a. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 56 (6), 588-599.

Labiris N.R., Dolovich M.B., 2003b. Pulmonary drug delivery. Part II: the role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 56 (6), 600-612.

Leach C.L., 1998. Improved delivery of inhaled steroids to the large and small airways. *Respir.Med.* 92, Suppl A, 3-8.

Leach C.L., Davidson P.J., Boudreau R.J., 1998. Improved airway targeting with the CFC-free HFA-beclomethasone metered-dose inhaler compared with CFC-beclomethasone. *Eur.Respir.J.* 12 (6), 1346-1353.

Lee V.H.L., Robinson J.R., 1978. Drug properties influencing the design of sustained or controlled release drug delivery systems. In: *Sustained and controlled release drug delivery systems*, chap.2, Robinson J.R. (Ed), 72-121.

Lippmann M., Yeates D.B., Albert R.E., 1980. Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br.J.Ind.Med.* 37 (4), 337-362.

Lipworth B.J., Clark D.J., 1997. Effects of airway calibre on lung delivery of nebulised salbutamol. *Thorax* 52 (12), 1036-1039.

Lombry C., 2004. Involvement of alveolar macrophages in the efficacy of macromolecules delivery to the lungs. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université catholique de Louvain, Belgique.

Lotvall J., 1997. Local versus systemic effects of inhaled drugs. *Respiratory Medicine* 91 (Supplement 1), 29-31.

Introduction

Louey M.D., Stewart P.J., 2002. Particle interactions involved in aerosol dispersion of ternary interactive mixtures. *Pharm.Res.* 19 (10), 1524-1531.

Lucas P., Anderson K., Potter U.J., Staniforth J.N., 1999. Enhancement of small particle size dry powder aerosol formulations using an ultra low density additive. *Pharm.Res.* 16 (10), 1643-1647.

Lucas P., Anderson K., Staniforth J.N., 1998. Protein deposition from dry powder inhalers: fine particle multiplets as performance modifiers. *Pharm.Res.* 15 (4), 562-569.

Ma J.K.H., Bhat M., Rojanasakul Y., 2006. Drug metabolism and enzyme kinetics in the lung. In: *Inhalation aerosols: Physical and biological basis for therapy*, chap.6, Hickey A.J. (Ed), 155-195.

Mak J.C., Barnes P.J., 1990. Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung. *Am.Rev.Respir.Dis.* 141 (6), 1559-1568.

Malcolmson R.J., Embleton J.K., 1998. Dry powder formulations for pulmonary delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1 (9), 394-398.

Martonen T., Yang Y., 1996. Deposition mechanics of aerosolized drugs. In: *Inhalation aerosols: Physical and biological basis for therapy*, chap.1, Hickey A.J. (Ed), 3-27.

Martonen T.B., 1993. Mathematical model for the selective deposition of inhaled pharmaceuticals. *J.Pharm.Sci.* 82 (12), 1191-1199.

McCracken N.W., Blain P.G., Williams F.M., 1993. Nature and role of xenobiotic metabolizing esterases in rat liver, lung, skin and blood. *Biochemical Pharmacology* 45 (1), 31-36.

Molina M.J., Rowland F.S., 1974. Stratospheric risk for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalyzed destruction of ozone. *Nature* 249, 810-812.

Morita T., Yamamoto A., Takakura Y., Hashida M., Sezaki H., 1994. Improvement of the pulmonary absorption of (Asu1,7)-eel calcitonin by various protease inhibitors in rats. *Pharm.Res.* 11 (6), 909-913.

Najafabi A.R., Gilani K., Hozan A., 2004. Design and evaluation of a new dry powder inhaler. *Daru, Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* 19 (34),

Nakate T., Yoshida H., Ohike A., Tokunaga Y., Ibuki R., Kawashima Y., 2005. Formulation development of inhalation powders for FK888 using the

E-haler to improve the inhalation performance at a high dose, and its absorption in healthy volunteers. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 59 (1), 25-33.

Newman S., Malik S., Hirst R., Pitcairn G., Heide A., Pabst J., Dinkelaker A., Fleischer W., 2002. Lung deposition of salbutamol in healthy human subjects from the MAGhaler dry powder inhaler. *Respir.Med.* 96 (12), 1026-1032.

Newman S.P., 1990. Metered dose pressurized aerosols and the ozone layer. *Eur.Respir.J.* 3 (5), 495-497.

Newman S.P., Pavia D., Garland N., Clarke S.W., 1982. Effects of various inhalation modes on the deposition of radioactive pressurized aerosols. *Eur.J.Respir.Dis.Suppl* 119, 57-65.

Newman S.P., Pavia D., Moren F., Sheahan N.F., Clarke S.W., 1981. Deposition of pressurised aerosols in the human respiratory tract. *Thorax* 36 (1), 52-55.

Newman S.P., Wilding I.R., 1998. Gamma scintigraphy: an in vivo technique for assessing the equivalence of inhaled products. *Int.J.Pharm.* 170 (1), 1-9.

O'Callaghan C., Barry P.W., 1997. The science of nebulised drug delivery. *Thorax* 52, Suppl 2, S31-S44.

O'Callaghan C., Nerbrink O., Vidgren M.T., 2002. The history of inhaled drug therapy. In: *Drug delivery to the lung*, chap.Bisgaard H., O'Callaghan C. (Eds), New-York, pp 1-18.

Padfield J.M., Winterborn I.K., Pover G.M., Tattersfield A., 1983. Correlation between inertial impactor performance and clinical performance of a bronchodilator aerosol. *Pharm.Pharmacol.* 35, 1-10.

Patton J.S., Platz R.M., 1992. Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Adv Drug Deliver.Rev.* 8, 179-228.

Patton J.S., Trinchero P., Platz R.M., 1994. Bioavailability of pulmonary delivered peptides and proteins: [alpha]-interferon, calcitonins and parathyroid hormones. *J.Control.Release* 28 (1-3), 79-85.

Patton J.S., 1996. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv Drug Deliver.Rev.* 19 (1), 3-36.

Pavia D., Thomson M.L., Clarke S.W., Shannon H.S., 1977. Effect of lung function and mode of inhalation on penetration of aerosol into the human lung. *Thorax* 32 (2), 194-197.

Pedersen S., O'Byrne P., 1997. A comparison of the efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma. *Allergy* 52 (39 Suppl), 1-34.

Poutler L.W., 1997. Central inflammation is more important than peripheral inflammation. *Respiratory Medicine* 91 (Supplement 1), 9-10.

Rubin B.K., Fink J.B., 2005. Optimizing aerosol delivery by pressurized metered-dose inhalers. *Respir. Care* 50 (9), 1191-1200.

Saetta M., Di Stefano A., Rosina C., Thiene G., Fabbri L.M., 1991. Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *Am.Rev.Respir.Dis.* 143 (1), 138-143.

Schlesinger R.B., Lippmann M., 1976. Particle deposition in the trachea: in vivo and in hollow casts. *Thorax* 31 (6), 678-684.

Schulz H., 1998. Mechanisms and factors affecting intrapulmonary particle deposition: implications for efficient inhalation therapies. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1 (8), 326-344.

Sebti T., Pilcer G., Van Gansbeke B., Goldman S., Michils A., Vanderbist F., Amighi K., 2006. Pharmacoscintigraphic evaluation of lipid dry powder budesonide formulations for inhalation. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 64 (1), 26-32.

Serafini S.M., Michaelson E.D., 1977. Length and distribution of cilia in human and canine airways. *Bull.Eur.Phytopathol.Respir.* 13 (4), 551-559.

Seville P.C., Simons C., Taylor G., Dickinson P.A., 2000. Prodrug to probe solution HFA pMDI formulation and pulmonary esterase activity. *International Journal of pharmaceuticals.* 195, 13-16.

Silkstone V.L., Corlett S.A., Chrystyn H., 2002. Determination of the relative bioavailability of salbutamol to the lungs and systemic circulation following nebulization. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 54 (2), 115-119.

Srichana T., Martin G.P., Marriott C., 1998. Dry powder inhalers: the influence of device resistance and powder formulation on drug and lactose deposition in vitro. *Eur.J.Pharm.Sci.* 7 (1), 73-80.

Staniforth J.N., 1987. British Pharmaceutical Conference Science Award lecture 1986. Order out of chaos. *J.Pharm.Pharmacol.* 39 (5), 329-334.

Staniforth J.N., 1995. Performance-modifying influences in dry powder inhalation systems. *Aerosol Science and Technology* 22, 346-353.

Staniforth J.N., 1996. Improvement in dry powder inhaler performance: surface passivation effects. Proceedings of Drug Delivery to the Lungs VII (Londres), The Aerosol Society (Bristol, UK)

Steckel H., Bolzen N., 2004. Alternative sugars as potential carriers for dry powder inhalations. *Int.J.Pharm.* 270 (1-2), 297-306.

Steckel H., Muller B.W., 1997a. In vitro evaluation of dry powder inhalers I: drug deposition of commonly used devices. *Int.J.Pharm.* 154 (1), 19-29.

Steckel H., Muller B.W., 1997b. In vitro evaluation of dry powder inhalers II: influence of carrier particle size and concentration on in vitro deposition. *Int.J.Pharm.* 154 (1), 31-37.

Stone K.C., Mercer R.R., Gehr P., Stockstill B., Crapo J.D., 1992. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 6 (2), 235-243.

Stossel T.P., 1977. Phagocytosis. Clinical disorders of recognition and ingestion. *Am.J.Pathol.* 88 (3), 741-751.

Sundaram S., Bontha S., Koushik K., Uday B., 2004. Nasal and pulmonary delivery of deslorelin, a peptide drug. *American Pharmaceutical review* September/October 2004

Synek M., Beasley R., Frew A.J., Goulding D., Holloway L., Lampe F.C., Roche W.R., Holgate S.T., 1996. Cellular infiltration of the airways in asthma of varying severity. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 154 (1), 224-230.

Tee S.K., Marriott C., Zeng X.M., Martin G.P., 2000. The use of different sugars as fine and coarse carriers for aerosolised salbutamol sulphate. *Int.J.Pharm.* 208 (1-2), 111-123.

Timsina M.P., Martin G.P., Marriott C., Ganderton D., Yianneskis M., 1994. Drug delivery to the respiratory tract using dry powder inhalers. *Int.J.Pharm.* 101 (1-2), 1-13.

Tobyn M., Staniforth J.N., Morton D., Harmer Q., Newton M.E., 2004. Active and intelligent inhaler device development. *Int.J.Pharm.* 277 (1-2), 31-37.

Trofast E., Olsson M., Ahlneck C., 2002. Agglomeration of finely divided powders. (US-patent 6,371,171),

Tronde A., 2002. Pulmonary drug absorption: In vitro and in vivo investigations of drug absorption across the lung barrier and its relation to drug physicochemical properties. Dissertation for the Degree of Doctor of

Philosophy (Faculty of Pharmacy) in Biopharmaceutics, Uppsala University, Sweden.

Vanderbist F., 2000. Développement, optimisation et évaluation d'une formulation de nacistelyn, un nouvel agent mucoactif, sous forme de poudre pour inhalation. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, Belgique.

Voeurng V., Andrieu V., Bun H., Reynier J.P., Dubus J.C., 2006. A new small volume holding chamber for asthmatic children: Comparison with Babyhaler spacer. *Pediatr Allergy Immunol.* 17 (8), 629-634.

Weda M., Zanen P., de Boer A.H., Gjaltema D., Ajaoud A., Barends D.M., Frijlink H.W., 2002. Equivalence testing of salbutamol dry powder inhalers: in vitro impaction results versus in vivo efficacy. *Int.J.Pharm.* 249 (1-2), 247-255.

Weibel E.R., Crystal R.G., 1991. Design of airways and blood vessels considered as branching trees. In: *The Lung: Scientific Foundations*, Crystal R.G. et West J.B. (Eds), New-York, pp 711-720.

Zanen P., Go L.T., Lammers J.W., 1996. Optimal particle size for beta 2 agonist and anticholinergic aerosols in patients with severe airflow obstruction. *Thorax* 51 (10), 977-980.

Zanen P., Go L.T., Lammers J.W., 1994. The optimal particle size for [beta]-adrenergic aerosols in mild asthmatics. *Int.J.Pharm.* 107 (3), 211-217.

Zanen P., Go L.T., Lammers J.W., 1995. The optimal particle size for parasympatholytic aerosols in mild asthmatics. *Int.J.Pharm.* 114 (1), 111-115.

Zeng X.M., Martin G.P., Tee S.K., Ghoush A.A., Marriott C., 1999. Effects of particle size and adding sequence of fine lactose on the deposition of salbutamol sulphate from a dry powder formulation. *Int.J.Pharm.* 182 (2), 133-144.

Zeng X.M., Martin G.P., Tee S.K., Marriott C., 1998. The role of fine particle lactose on the dispersion and deaggregation of salbutamol sulphate in an air stream in vitro. *Int.J.Pharm.* 176 (1), 99-110.

Chapitre III:

Prolongation de la durée d'action d'une substance administrée par inhalation

III.1. Introduction

Comme décrit dans le chapitre II, le système respiratoire utilise de nombreux mécanismes de défense afin d'éviter la déposition de corps étrangers. En effet, les ramifications de l'arbre trachéo-bronchique, les mécanismes de clairance tels l'escalator muco-ciliaire et la clairance alvéolaire macrophagienne, la métabolisation enzymatique contribuent tous à l'élimination des particules ou des micro-organismes étrangers.

Ces mécanismes de défense ont notamment pour effet de limiter la durée d'action des substances administrées par inhalation, ce qui nécessite des administrations répétées. C'est la raison pour laquelle de nombreux travaux de recherches sont actuellement menés dans le but de prolonger la durée d'action des principes actifs administrés par inhalation.

Pour obtenir une prolongation de la durée d'action, les molécules actives devront séjourner plus longtemps au niveau de leur site d'action ou être libérées de façon prolongée afin d'être disponibles plus longtemps soit pour une action locale soit pour une résorption si un effet systémique est visé.

Deux approches peuvent être envisagées pour prolonger la durée d'action d'un principe actif administré par inhalation, à savoir :

- Approche pharmaco-chimique
 - Synthèse de molécules à longue durée d'action par pharmacomodulation
 - Utilisation de pro-drogues
- Approche galénique
 - Modifications des propriétés physico-chimiques du principe actif
 - Incorporation du principe actif dans un véhicule ou un système particulière (ex. : liposomes, microparticules biodégradables, cyclodextrines, microparticules lipidiques solides)

Une autre approche consiste à altérer le microenvironnement autour des particules déposées, en modifiant le micro-pH ou en augmentant la viscosité. Cette méthode qui comporte des risques est à éviter spécialement chez les personnes souffrant de pathologies pulmonaires (Gupta et al., 2003).

III.2. Prolongation de la durée d'action par voie pharmaco-chimique

III.2.1 Pharmacomodulation

Parmi les molécules administrées par inhalation, la classe des agonistes β_2 -adrénergiques (ou β_2 -mimétiques) (Voir page 95) a fait l'objet de pharmacomodulations dans le but d'obtenir des molécules à longue durée d'action. Actuellement deux molécules pouvant être qualifiées de β_2 -mimétiques à longue durée d'action et destinées à l'administration par inhalation sont commercialisées : le formotérol et le salmétérol.

Deux théories s'opposent actuellement afin d'expliquer les mécanismes de prolongation de la durée d'action des β_2 -mimétiques, à savoir la théorie de la microdiffusion et celle des exosites (Coleman et al., 1996).

D'après **la théorie de la micro-diffusion (ou diffusion micro-cinétique)**, la durée d'action serait dépendante de la lipophilie du principe actif (Anderson, 1993; Anderson et al., 1994; Lotvall, 2001). Au vu de sa courte chaîne hydrocarbonée, le salbutamol est hydrophile (Figure III-1) et s'associe dès lors directement aux récepteurs à partir de la phase aqueuse extracellulaire contiguë aux membranes cellulaires puis il diffuse à travers les membranes et est éliminé plus rapidement, ce qui explique sa courte durée d'action. La longue chaîne hydrocarbonée du salmétérol (Figure III-1) lui confère une lipophilie accrue qui lui permet de s'accumuler tel un réservoir dans les membranes des muscles lisses bronchiques, au voisinage des récepteurs β_2 -adrénergiques. Les composés sont ainsi disponibles pour les récepteurs et ce, pour une période prolongée. Ils peuvent diffuser latéralement à l'intérieur des membranes pour atteindre les récepteurs.

Le formotérol, un composé de lipophilie intermédiaire, peut à la fois interagir immédiatement avec le récepteur β_2 -adrénergique en se concentrant dans l'espace aqueux extracellulaire, mais également se distribuer dans les membranes cellulaires afin de prolonger sa disponibilité pour les récepteurs β_2 -adrénergiques (Leemans, 2003).

La théorie de la micro-diffusion est illustrée à la figure III-2.

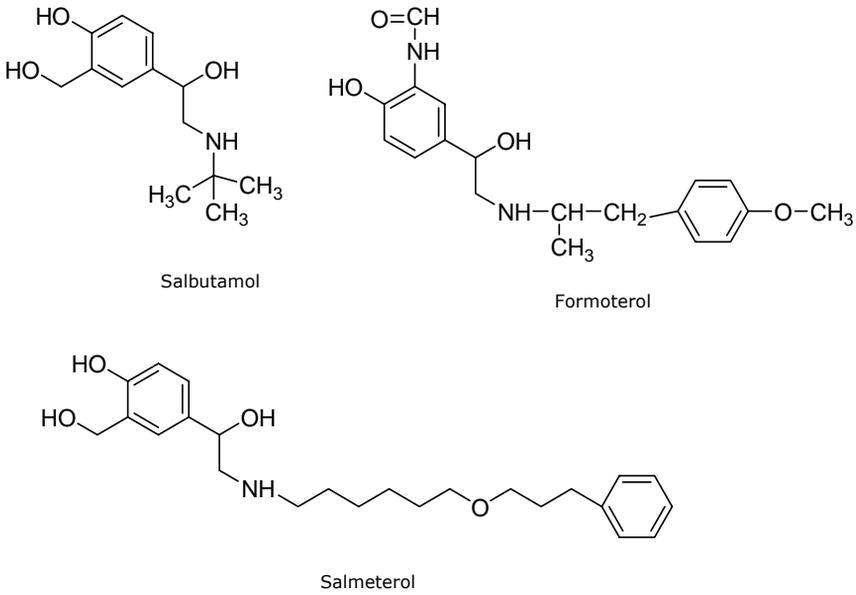


Figure III-1 : Structures chimiques du salbutamol, du formotérol et du salmétérol

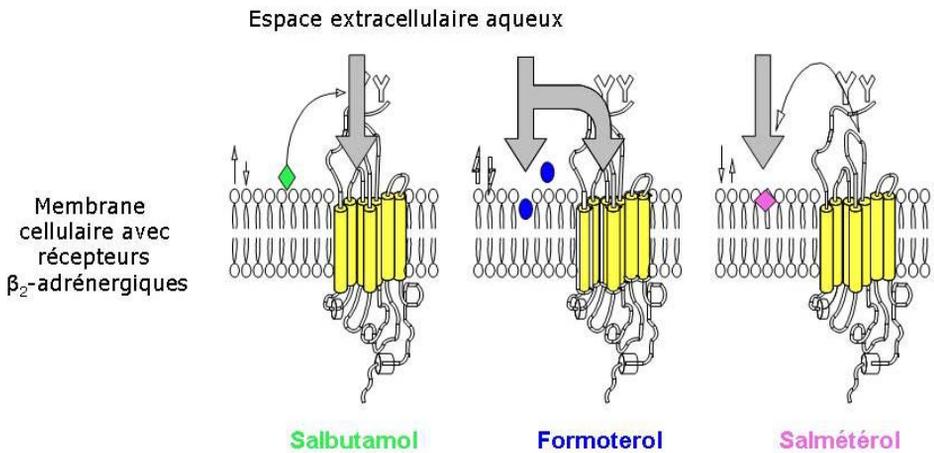


Figure III-2 : Représentation de la théorie de la micro-diffusion appliquée au salbutamol, au formotérol et au salmétérol (Anderson et al., 1994)

La théorie des exosites ou des exorécepteurs requiert quant à elle la présence d'un site additionnel de liaison pour le principe actif, situé dans le voisinage immédiat du site d'action du récepteur β_2 -adrénergique (Coleman et al., 1996). Dans le cas du salmétérol, la théorie des exosites voudrait que la chaîne hydrocarbonée lipophile de cette molécule s'ancrer en un site adjacent ou intégré au récepteur β_2 -adrénergique et, de la sorte, confère à la tête de la molécule la possibilité d'interactions répétées avec le récepteur par un effet de type charnière (Leemans, 2003) (Figure III-3).

Cette théorie est assez controversée (Lotvall, 2001; Teschemacher et al., 1999) du moins en ce qui concerne le formotérol. En effet, cette molécule ne semble pas présenter une structure suffisamment longue pour s'ancrer au niveau d'un site adjacent au site d'action tout en agissant au niveau de celui-ci (Anderson et al., 1994; Linden et al., 1996).

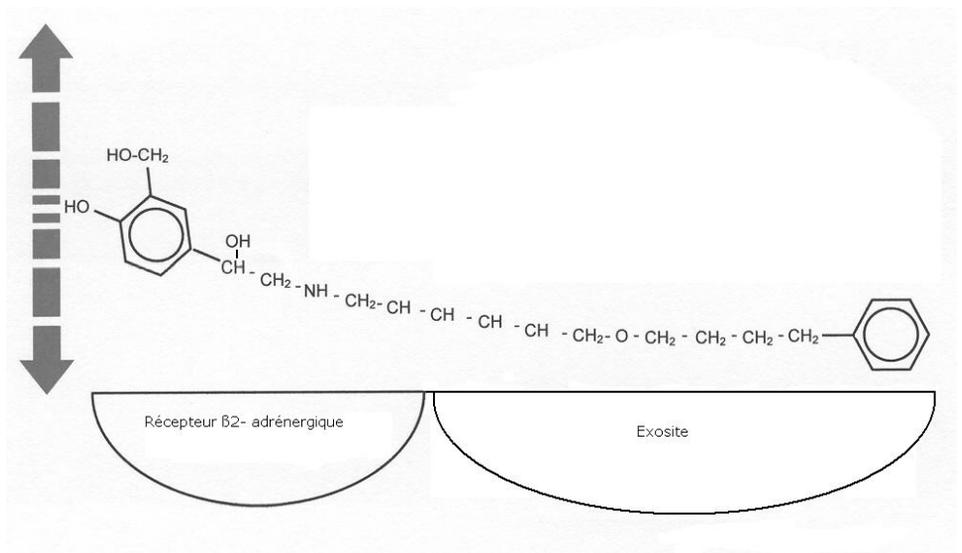


Figure III-3 : Représentation de la théorie des exosites appliquée au salmétérol (Anderson et al., 1994)

III.2.2 Utilisation de pro-drogues

La présentation sous forme de pro-drogues suppose l'introduction dans la molécule initiale d'un groupement de nature variable fixé par un lien covalent bioréversible (c'est-à-dire susceptible d'être supprimé par métabolisation pour régénérer le principe actif parent au niveau de l'organe cible).

Les groupements introduits sur le composé parent pourront être hydrolysés de façon non enzymatique ou enzymatique (notamment par des estérases non spécifiques) pour restituer le principe actif de départ.

Comme il s'avère qu'au niveau pulmonaire l'activité enzymatique est relativement importante (estérases,...), les pro-drogues pourraient donc agir comme des systèmes réservoirs qui libéreraient de façon prolongée le composé actif parent après clivage enzymatique (Zeng et al., 1995). L'ibutero, par exemple est un ester de la terbutaline qui, après administration par inhalation est hydrolysé de façon enzymatique relarguant ainsi progressivement la terbutaline (Zeng et al., 1995).

III.3. Prolongation de la durée d'action par voie galénique

III.3.1 Modification des propriétés physico-chimiques du principe actif

La modification des propriétés physico-chimiques du principe actif administré peut avoir des répercussions tant sur la cinétique de dissolution que sur la perméabilité vis-à-vis des membranes biologiques. La dissolution d'un principe actif peut notamment être ralentie en co-précipitant celui-ci avec une substance très peu soluble (ex. hydroxyde métallique) dans le surfactant pulmonaire (Zeng et al., 1995).

III.3.2 Utilisation de véhicules et de systèmes microparticulaires

III.3.2.1 Introduction

L'utilisation de véhicules pourrait permettre au principe actif à la fois d'être libéré progressivement mais aussi d'être protégé vis-à-vis d'une éventuelle dégradation enzymatique. Certains artifices seront également utilisés afin de réduire la phagocytose par les macrophages (Voir page 63).

III.3.2.2 Les liposomes

Les liposomes constituent un des systèmes les plus étudiés en vue de prolonger la durée d'action de principes actifs administrés par inhalation. Les liposomes sont des vésicules formées d'une ou plusieurs bi-membranes lipidiques concentriques qui alternent avec des compartiments aqueux.

Ce type de structure permet l'encapsulation tant de composés hydrophiles que lipophiles. La composition et les techniques de production influencent la taille des liposomes.

Les liposomes sont composés le plus souvent de phospholipides mais aussi de sphingolipides qui peuvent être d'origine naturelle (œuf, soja) ou synthétique. Le cholestérol est fréquemment utilisé pour stabiliser les membranes liposomiales (Meisner et al., 1995; Taylor et al., 1993). Au vu de leur composition, les liposomes sont particulièrement appropriés à l'administration pulmonaire ; les phospholipides utilisés sont soit constitutifs du surfactant pulmonaire soit apparentés aux phospholipides endogènes, ce qui rend négligeable le risque de toxicité de ce véhicule. Plusieurs études ont en effet montré que l'administration pulmonaire de lipides utilisés pour la production de liposomes ne provoque pas d'apparition d'effets secondaires (Morley et al., 1981; Obladen et al., 1979). Pettanazo a montré que les liposomes se rompent au niveau des alvéoles pulmonaires, restituant les lipides constitutifs et que ces derniers

intègrent le pool de surfactant pulmonaire endogène (Pettenazzo et al., 1989).

Plusieurs études ont prouvé que l'utilisation de formes liposomiales permettait de prolonger le temps de résidence pulmonaire comparativement à l'administration du principe actif seul mais également de diminuer certains effets secondaires (Allen et al., 1991; Juliano et al., 1980).

Les liposomes présentent toutefois un certain nombre d'inconvénients, qui limitent actuellement leur utilisation :

- Il est difficile d'obtenir une reproductibilité au niveau de la taille des liposomes.
- Les dispersions liposomiales présentent des problèmes de stabilité :
 - Instabilité physique : Des phénomènes de fusion et de formation d'agrégats peuvent apparaître, modifiant la taille des liposomes (Storm et al., 1998). Une rupture des vésicules peut également survenir lors du stockage ou de la nébulisation, libérant le principe actif prématurément (Darwis et al., 2001; Niven et al., 1990). Lors du stockage des dispersions liposomiales, la diffusion du principe actif à partir des vésicules vers le solvant représente également une forme d'instabilité physique.
 - Instabilité chimique due à l'hydrolyse des fonctions esters ou à l'oxydation des acides gras insaturés. L'hydrolyse peut être limitée en stockant les dispersions à basse température ou en ajustant le pH à 6,5. L'oxydation peut être évitée par ajout d'un agent antioxydant telle la vitamine E ou en utilisant exclusivement des lipides à chaînes d'acides gras saturés (Storm et al., 1998).

L'utilisation de liposomes sous forme sèche peut également permettre de résoudre certains problèmes d'instabilité. Les suspensions liposomiales peuvent être lyophilisées en présence d'agents cryoprotecteurs tels les disaccharides (Storm et al., 1998).

- L'efficacité d'encapsulation des principes actifs hydrophiles dans les compartiments aqueux des liposomes est assez faible.
- Les phospholipides synthétiques utilisés pour la préparation des liposomes sont relativement coûteux.
- Le processus de production des liposomes à l'échelle industrielle est long et difficile.

III.3.2.3 Les microparticules biodégradables

Les microparticules biodégradables sont composées de polymères d'origine naturelle (ex. : albumine, alginates, chitosan) ou synthétique (ex. : polyesters dont les plus communément utilisés sont les polymères d'acide lactique - PLA, d'acide glycolique - PGA ou les copolymères d'acide lactique et glycolique- PLGA) (Gupta et al., 2003). Le choix du polymère et/ou de la technique de production influence les propriétés physiques des particules (taille, densité, porosité,...) et le devenir *in vivo* des microparticules (Gupta et al., 2003).

Ce type de véhicule présente les avantages suivants (Courrier et al., 2002):

- Les microparticules polymériques sont plus stables que les liposomes à la fois *in vivo*, ce qui permet d'obtenir une libération prolongée du principe actif, mais également durant le stockage.
- De nombreux principes actifs, tant hydrophiles que lipophiles peuvent être encapsulés dans des microparticules polymériques, et ce, avec un bon rendement d'encapsulation.

Toutefois les microparticules polymériques ont également quelques inconvénients :

- La plupart des techniques de production impliquent l'utilisation de solvants organiques. Des résidus de ces solvants peuvent donc se retrouver dans les microparticules.
- Il est difficile de produire des microparticules polymériques à l'échelle industrielle (Schwarz et al., 1994).
- La dégradation de certains polymères comme les PLGA crée un micro-pH acide qui peut endommager certains principes actifs comme les peptides et les protéines (O'Hara et al., 2000).
- Il a été démontré que les particules polymériques constituées de PLGA subissent au niveau pulmonaire une opsonisation rapide et donc une clairance alvéolaire rapide (Tabata et al., 1988). Ce problème peut être contourné par l'utilisation de polymères tels le chitosan et la cellulose.
- Le profil toxicologique de bon nombre de polymères est incertain.

En effet, la biodégradation peut être lente (jusqu'à 4 semaines) et des effets toxiques systémiques peuvent être causés par altération du système réticulo-endothélial (Schwarz et al., 1994). Il est important de noter que la durée de la biodégradation du polymère est généralement bien plus longue que la durée de libération du principe actif à partir des microparticules polymériques (Fu et al., 2002). La biocompatibilité des PLA, PGA et PLGA a été démontrée dans le cas d'implants constitués de ces polymères (El-Baseir et al., 1998) ; par contre lorsque ces mêmes polymères sont utilisés sous forme de microparticules et par voie pulmonaire, celles-ci peuvent être internalisées et dégradées par les macrophages, ce qui conduit à des effets cytotoxiques (Armstrong et al., 1996; Courrier et al., 2002). Armstrong a effectivement montré chez le lapin que l'administration par inhalation de microparticules de polymères d'acide lactique (PLA) provoquait des dommages histologiques, des

hémorragies pulmonaires ainsi qu'une infiltration d'éosinophiles et de neutrophiles (Armstrong et al., 1996).

La capacité des microparticules polymériques pour inhalation à libérer de façon prolongée le principe actif qui y est incorporé a été mise en évidence par des études *in vitro* (El-Baseir et al., 1998; Fu et al., 2002; Martin et al., 2002) et *in vivo* (Lai et al., 1993; Poyner et al., 1995).

Certaines recherches se sont axées sur la modification des propriétés (composition, taille, densité, surface) des particules afin de réduire la phagocytose par les macrophages alvéolaires.

Evora et Jones ont tout d'abord montré qu'il était possible de réduire la phagocytose des particules polymériques (PLGA) ayant une taille de 2 à 3 μm en les enrobant de 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), le constituant majeur du surfactant pulmonaire (Evora et al., 1998; Jones et al., 2002).

Edwards a quant à lui développé des particules de PLGA de « grande » taille (diamètre géométrique $> 5 \mu\text{m}$) et poreuses de faible densité ($\leq 0,1$), possédant donc un diamètre aérodynamique adéquat pour une déposition pulmonaire périphérique (Edwards et al., 1997; Edwards et al., 1998; Ungaro et al., 2006). Ces particules poreuses de grande taille (« Large porous particles – LPP ») ne sont pas phagocytées par les macrophages alvéolaires ce qui leur permet de libérer leur principe actif avant d'être évacuées (Ben Jebria et al., 1999). De plus, les particules plus grosses ont une plus faible tendance à s'agglomérer (Edwards et al., 1998).

Dans le même ordre d'idées, Fu a produit des microparticules de poly(éther-anhydrides) qui sont constituées à la fois d'acide sébacique et de polyéthylène glycol (PEG) (Fu et al., 2002). Le PEG est utilisé pour diminuer la densité particulaire, afin d'obtenir un diamètre géométrique plus important tout en conservant un diamètre aérodynamique adéquat, ce qui permet de diminuer la clairance alvéolaire (Voir page 17) (Fiegel et al., 2004; Fu et al., 2002).

III.3.2.4 Les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques constitués de 6, 7 ou 8 unités glucopyranoses, dont la cavité interne est hydrophobe et la surface externe est hydrophile. Cette particularité structurale permet aux cyclodextrines de complexer dans leur cavité des molécules peu polaires, ce qui augmente la solubilité aqueuse de celles-ci.

Uekama a montré que les cyclodextrines étaient susceptibles de prolonger la libération de principes actifs administrés sous forme de complexes par voie orale ou subcutanée (Uekama et al., 1987b; Uekama et al., 1987a; Uekama et al., 1989; Uekama et al., 1990).

In vivo, il a été démontré que l'hydroxypropyl β - cyclodextrine (HP-B-CD), la β -cyclodextrine méthylée aléatoirement (RAMEB) ou la γ -cyclodextrine (γ -CD) ne présentent pas de toxicité au niveau du système respiratoire et peuvent de ce fait être considérées comme des excipients adéquats pour les formes pharmaceutiques destinées à l'inhalation (Evrard et al., 2004). Certaines études menées sur des cultures cellulaires ou sur des modèles animaux ont toutefois mis en évidence un effet ciliostatique des cyclodextrines. Cependant, cet effet s'est révélé être modéré et réversible (Fukaya et al., 2003; Uchenna Agu et al., 2000).

Les essais réalisés dans le but de former des complexes à libération prolongée avec des principes actifs destinés à l'inhalation (ex. : le salbutamol) ont été fructueux *in vitro* (Gupta et al., 2003) mais n'ont pas connu le même succès *in vivo* (Cabral Marques et al., 1991a; Cabral Marques et al., 1991b; Wall et al., 1994). Une des hypothèses pouvant expliquer les résultats peu encourageants obtenus *in vivo* est que certains composants du surfactant pulmonaire entreraient en compétition avec le principe actif complexé par la cyclodextrine, provoquant sa libération rapide.

La constante de stabilité du complexe formé par la cyclodextrine et le principe actif doit être suffisamment élevée afin que la dissociation soit lente et donc que, dès lors, la libération du principe actif soit prolongée au

sein des milieux biologiques (Cabral Marques et al., 1991a; Cabral Marques et al., 1991b; Fukaya et al., 2003).

Actuellement, on tend à considérer les complexes cyclodextrines-principe actif comme inefficaces pour l'obtention d'une libération prolongée après administration pulmonaire (Wall et al., 1994).

III.3.2.5 Les microparticules lipidiques solides

Les microparticules lipidiques solides (MLS) sont actuellement de plus en plus étudiées en tant que véhicule potentiellement capable de libérer de façon prolongée le principe actif qui y est incorporé.

Dans le cadre de ce travail de recherche, nous avons choisi d'utiliser ce type de véhicule en vue de développer une forme à libération prolongée destinée à l'administration par inhalation. C'est la raison pour laquelle les MLS feront l'objet d'un chapitre spécifique dans l'introduction théorique de ce travail (Chapitre IV).

L'intérêt croissant envers les MLS s'explique par les nombreux avantages qu'elles présentent par rapport aux autres véhicules plus communément utilisés. Ceux-ci seront également détaillés dans le chapitre IV.

III.4. Références bibliographiques

Allen T.M., Hansen C., Martin F., Redemann C., Yau-Young A., 1991. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim.Biophys.Acta* 1066 (1), 29-36.

Anderson G.P., 1993. Formoterol: pharmacology, molecular basis of agonism, and mechanism of long duration of a highly potent and selective beta 2-adrenoceptor agonist bronchodilator. *Life Sci* 52 (26), 2145-2160.

Anderson G.P., Linden A., Rabe K.F., 1994. Why are long-acting beta-adrenoceptor agonists long-acting? *Eur.Respir.J.* 7 (3), 569-578.

Armstrong D.J., Elliott P.N., Ford J.L., Gadsdon D., McCarthy G.P., Rostron C., Worsley M.D., 1996. Poly-(D,L-lactic acid) microspheres incorporating histological dyes for intra-pulmonary histopathological investigations. *J.Pharm.Pharmacol.* 48 (3), 258-262.

Ben Jebria A., Chen D., Eskew M.L., Vanbever R., Langer R., Edwards D.A., 1999. Large porous particles for sustained protection from carbachol-induced bronchoconstriction in guinea pigs. *Pharm.Res.* 16 (4), 555-561.

Cabral Marques H.M., Hadgraft J., Kellaway I.W., Taylor G., 1991a. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. III. The pulmonary absorption of [beta]-, DM-[beta]- and HP-[beta]-cyclodextrins in rabbits. *Int.J.Pharm.* 77 (2-3), 297-302.

Cabral Marques H.M., Hadgraft J., Kellaway I., Taylor G., 1991b. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. IV. The pulmonary absorption of salbutamol from a complex with 2-hydroxypropyl-[beta]-cyclodextrin in rabbits. *Int.J.Pharm.* 77 (2-3), 303-307.

Coleman R.A., Johnson M., Nials A.T., Vardey C.J., 1996. Exosites: their current status, and their relevance to the duration of action of long-acting β_2 -adrenoreceptor agonists. *Trends in Pharmacological Sciences* 17, 324-330.

Courrier H.M., Butz N., Vandamme T.F., 2002. Pulmonary drug delivery systems: Recent developments and prospects. *Crit.Rev.Ther Drug Carr.Syst.* 19 (4,5), 425-498.

Darwis Y., Kellaway I.W., 2001. Nebulisation of rehydrated freeze-dried beclomethasone dipropionate liposomes. *Int.J.Pharm.* 215 (1,2), 113-121.

Edwards D.A., Ben Jebria A., Langer R., 1998. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J.Appl.Physiol* 85 (2), 379-385.

Edwards D.A., Hanes J., Caponetti G., Hrkach J., Ben Jebria A., Eskew M.L., Mintzes J., Deaver D., Lotan N., Langer R., 1997. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science* 276, 1868-1871.

El-Baseir M.M., Kellaway I.W., 1998. Poly(L-lactic acid) microspheres for pulmonary drug delivery: release kinetics and aerosolization studies. *Int.J.Pharm.* 175, 135-145.

Evora C., Soriano I., Rogers R.A., Shakesheff K.N., Hanes J., Langer R., 1998. Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. *J.Control Release* 51 (2-3), 143-152.

Evrard B., Bertholet P., Gueders M., Flament M.-P., Piel G., Delattre L., Gayot A., Leterme P., Foidart J.-M., Cataldo D., 2004. Cyclodextrins as a potential carrier in drug nebulization. *J.Control.Release* 96 (3), 403-410.

Fiegel J., Fu J., Hanes J., 2004. Poly(ether-anhydride) dry powder aerosols for sustained drug delivery in the lungs. *J.Control.Release* 96 (3), 411-423.

Fu J., Fiegel J., Krauland E., Hanes J., 2002. New polymeric carriers for controlled drug delivery following inhalation or injection. *Biomaterials* 23 (22), 4425-4433.

Fukaya H., Iimura A., Hoshiko K., Fuyumuro T., Noji S., Nabeshima T., 2003. A cyclosporin A/maltosyl-alpha-cyclodextrin complex for inhalation therapy of asthma. *Eur.Respir.J.* 22 (2), 213-219.

Gupta P.K., Adjei A.L., 2003. Modulated-release aerosol. In: *Inhalation delivery of therapeutic peptides and proteins*, chap.23, Gupta P.K. et Adjei A.L. (Eds), New York, pp 667-702.

Jones B.G., Dickinson P.A., Gumbleton M., Kellaway I.W., 2002. The inhibition of phagocytosis of respirable microspheres by alveolar and peritoneal macrophages. *Int.J.Pharm.* 236 (1-2), 65-79.

Juliano R.L., McCullough H.N., 1980. Controlled delivery of an antitumor drug: localized action of liposome encapsulated cytosine arabinoside administered via the respiratory system. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 214 (2), 381-387.

Introduction

Lai Y.L., Mehta R.C., Thacker A.A., Yoo S.D., McNamara P.J., DeLuca P.P., 1993. Sustained bronchodilation with isoproterenol poly(glycolide-co-lactide) microspheres. *Pharm.Res.* 10 (1), 119-125.

Leemans J., 2003. Contribution à l'étude de la fonction respiratoire du chat sain par pléthysmographie barométrique corporelle. Mémoire de stage de troisième doctorat en médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique.

Linden A., Rabe K.F., Lofdahl C.G., 1996. Pharmacological basis for duration of effect: formoterol and salmeterol versus short-acting beta 2-adrenoreceptor agonists. *Lung* 174 (1), 1-22.

Lotvall J., 2001. Pharmacological similarities and differences between beta2-agonists. *Respiratory medicine* 95 (Suppl. B), S7-11.

Martin T.M., Bandi N., Shulz R., Roberts C.B., Kompella U.B., 2002. Preparation of budesonide and budesonide-PLA microparticles using supercritical fluid precipitation technology. *AAPS PharmSciTech* 3 (3), Article 18.

Meisner D., Mezei M., 1995. Liposome ocular delivery systems. *Adv.Drug Deliver.Rev.* 16 (1), 75-93.

Morley C.J., Bangham A.D., Miller N., Davis J.A., 1981. Dry artificial lung surfactant and its effect on very premature babies. *Lancet* 1, 64-68.

Niven R.W., Schreier H., 1990. Nebulization of liposomes. I. Effects of lipid composition. *Pharm.Res.* 7 (11), 1127-1133.

O'Hara P., Hickey A.J., 2000. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: manufacture and characterization. *Pharm.Res.* 17 (8), 955-961.

Obladen M., Brendlein F., Krempien B., 1979. Surfactant substitution. *Eur.J.Pediatr* 131, 219-228.

Pettenazzo A., Jobe A., Ikegami M., Abra R., Hogue E., Mihalko P., 1989. Clearance of phosphatidylcholine and cholesterol from liposomes, liposomes loaded with metaproterenol, and rabbit surfactant from adult rabbit lungs. *Am.Rev.Respir.Dis.* 139 (3), 752-758.

Poyner E.A., Alpar H.O., Almeida A.J., Gamble M.D., Brown M.R.W., 1995. A comparative study on the pulmonary delivery of tobramycin encapsulated into liposomes and PLA microspheres following intravenous and endotracheal delivery. *J.Control.Release* 35 (1), 41-48.

Schwarz C., Mehnert W., Lucks J.S., Muller R.H., 1994. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: I. Production, characterization and sterilization. *J.Control.Release* 30 (1), 83-96.

Storm G., Crommelin D.J.A., 1998. Liposomes: quo vadis? *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1 (1), 19-31.

Tabata Y., Ikada Y., 1988. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* 9 (4), 356-362.

Taylor K.M.G., Farr S.J., 1993. Liposomes for drug delivery to the respiratory tract. *Drug Dev.Ind.Pharm.* 19 (1,2), 123-142.

Teschmacher A., Lemoine H., 1999. Kinetic analysis of drug-receptor interactions of long-acting beta2 sympathomimetics in isolated receptor membranes: evidence against prolonged effects of salmeterol and formoterol on receptor-coupled adenylyl cyclase. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 288 (3), 1084-1092.

Uchenna Agu R., Jorissen M., Willems T., Van den Mooter G., Kinget R., Verbeke N., Augustijns P., 2000. Safety assessment of selected cyclodextrins -- effect on ciliary activity using a human cell suspension culture model exhibiting in vitro ciliogenesis. *Int.J.Pharm.* 193 (2), 219-226.

Uekama K., Arima H., Irie T., Matsubara K., Kuriki T., 1989. Sustained release of buserelin acetate, a luteinizing hormone-releasing hormone agonist, from an injectable oily preparation utilizing ethylated beta-cyclodextrin. *J.Pharm.Pharmacol.* 41 (12), 874-876.

Uekama K., Hirashima N., Horiuchi Y., Hirayama F., Ijitsu T., Ueno M., 1987a. Ethylated beta-cyclodextrins as hydrophobic drug carriers: sustained release of diltiazem in the rat. *J.Pharm.Sci* 76 (8), 660-661.

Uekama K., Matsubara K., Abe K., Horiuchi Y., Hirayama F., Suzuki N., 1990. Design and in vitro evaluation of slow-release dosage form of pirtanide: utility of beta-cyclodextrin:cellulose derivative combination as a modified-release drug carrier. *J.Pharm.Sci* 79 (3), 244-248.

Uekama K., Otagiri M., 1987b. Cyclodextrins in drug carrier systems. *Crit Rev.Ther.Drug Carrier Syst.* 3 (1), 1-40.

Ungaro F., De Rosa G., Miro A., Quaglia F., La Rotonda M.I., 2006. Cyclodextrins in the production of large porous particles: Development of dry powders for the sustained release of insulin to the lungs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 28 (5), 423-432.

Introduction

Wall D.A., Marcello J., Pierdomenico D., Farid A., 1994. Administration as hydroxyl- β -cyclodextrin complexes does not slow rates of pulmonary drug absorption in rat. *S.T.P.Pharma Sciences* 4 (1), 63-68.

Zeng X.M., Martin G.P., Marriott C., 1995. The controlled delivery of drugs to the lung. *Int.J.Pharm.* 124, 149-164.

Chapitre IV:

Les microparticules lipidiques solides (MLS)

IV.1. Composition des MLS

Les microparticules lipidiques solides (MLS), également appelées microsphères lipidiques solides ou liposphères désignent des microparticules possédant un diamètre généralement compris entre 0,2 et 500 μm , composées d'une matrice hydrophobe dans laquelle les composés actifs (le plus souvent lipophiles) sont dissous ou dispersés (Esposito et al., 2005). Les lipides utilisés pour la production de MLS peuvent être des tri-, di- ou mono- glycérides, des acides gras, du cholestérol, des cires,...

Les MLS peuvent être administrées par voie orale, intramusculaire, sous-cutanée, topique,...(Esposito et al., 2005). La voie d'administration pulmonaire n'a été, jusqu'à présent, que très peu investiguée.

IV.2. Avantages et inconvénients des MLS

Les MLS sont considérées comme avantageuses à plusieurs égards :

- Les lipides utilisés dans la fabrication de MLS sont proches ou similaires aux lipides physiologiques (notamment ceux du surfactant pulmonaire) et sont donc considérés comme biocompatibles.
- Les MLS sont physico-chimiquement stables.
- Les coûts de production des MLS et des matières premières sont relativement peu élevés.

- Selon le mode de fabrication utilisé, il est possible d'éviter de recourir à l'utilisation de solvants organiques.
- La production à l'échelle industrielle est possible.
- Leur nature hydrophobe permet de réduire la tendance à l'agglomération et à l'adhésion des particules (Sebti, 2006).

L'inconvénient principal de ce type de formulation réside dans le fait que les principes actifs doivent de préférence être suffisamment lipophiles afin d'être incorporés efficacement dans les MLS.

Comme décrit dans le paragraphe suivant, certaines techniques particulières de production permettent toutefois d'incorporer dans des MLS des principes actifs plus hydrophiles sous forme dispersée et non dissoute.

IV.3. Méthodes de production des MLS

Différentes études ont montré qu'un simple mélange physique du principe actif avec les constituants lipidiques ne prolongeait pas la libération du principe actif. La technique de production doit dès lors permettre à la substance active de se dissoudre ou de se disperser dans la matrice lipidique (Malamataris et al., 1991; Savolainen et al., 2002).

Les méthodes de production des MLS sont nombreuses. Voici un aperçu des techniques les plus couramment utilisées :

- **La méthode par évaporation de solvants** (Figure IV-1):

Les lipides et le principe actif sont dissous dans la phase organique. La solution organique obtenue est émulsifiée dans une phase aqueuse contenant le tensioactif. On laisse évaporer le solvant sous agitation (Cortesi et al., 2002; Reithmeier et al., 1998; Reithmeier et al., 2001b) . Cette technique offre l'avantage d'éviter une étape de chauffage et est recommandée pour les principes actifs thermosensibles mais nécessite l'utilisation de solvants organiques avec le risque de retrouver des résidus de solvants dans le produit fini.

o **L'émulsification H/E à chaud suivie d'un mélange à haute vitesse de cisaillement (« Melt dispersion technique »)** (Figure IV-1):

Le principe actif est dissous dans les lipides fondus. Le tensioactif est dissous dans l'eau et la solution obtenue est chauffée à une température supérieure au point de fusion des lipides. La phase lipidique chaude est émulsifiée dans la solution aqueuse à l'aide d'un agitateur à haute vitesse de cisaillement (Bodmeier et al., 1992a; Cortesi et al., 2002; Giannola et al., 1993; Masters et al., 1998; Sanna et al., 2003; Yener et al., 2003). Cette technique très fréquemment utilisée est simple et offre de bons rendements d'encapsulation de molécules lipophiles dans les MLS.

o **L'homogénéisation sous haute pression à chaud ou à froid:**

L'homogénéisation sous haute pression à chaud consiste à forcer une ou plusieurs fois le passage sous pression d'une pré-émulsion à travers un homogénéisateur préchauffé. L'homogénéisation sous haute pression à froid est une variante qui permet de limiter l'exposition des principes actifs à la chaleur. Cette technique consiste à dissoudre le principe actif dans les lipides fondus, à laisser solidifier l'ensemble puis à le porphyriser dans un mortier. Les particules obtenues sont dispersées dans une phase aqueuse contenant un tensioactif. La taille des particules de la suspension obtenue sera réduite par un ou plusieurs passages sous pression à travers l'homogénéisateur (Demirel et al., 2001; Frederiksen et al., 2003).

o **L'émulsification par microcanal:**

Cette technique ne comporte pas d'étape de pré-émulsion. Ainsi, les lipides et la phase aqueuse sont chauffés simultanément dans deux modules séparés de l'appareil à microcanal. Une pression croissante est appliquée sur les lipides fondus afin de passer à travers un microcanal vers la phase aqueuse. Lorsque la pression de rupture est atteinte, il y a formation de gouttelettes lipidiques à la sortie du microcanal et sous un flux de phase aqueuse, générant une émulsion H/E, qui après refroidissement donnera lieu à une suspension de MLS (Kawakatsu et al.,

2001; Sugiura et al., 2000). Cette technique présente l'avantage de se faire en une seule étape et de fournir des particules monodispersées (Sugiura et al., 2000). Toutefois elle nécessite l'utilisation d'un appareillage spécifique complexe.

Les suspensions aqueuses de microparticules obtenues par les techniques décrites ci-dessus sont généralement filtrées afin d'isoler les MLS. Celles-ci sont ensuite rincées à l'eau puis séchées sous vide.

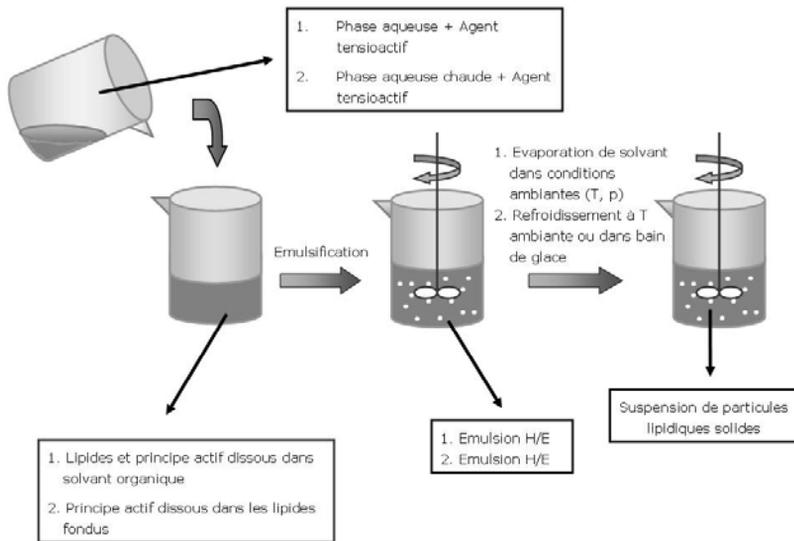


Figure IV-1 : Représentation schématique de la production de MLS par : (1) évaporation de solvants, (2) émulsification H/E à chaud suivie d'un mélange à haute vitesse de cisaillement. Schéma modifié d'après (Cortesi et al., 2002)

D'autres techniques de production des MLS peuvent également être citées :

o **La micronisation cryogénique :**

Cette technique consiste à congeler une matrice lipidique dans laquelle le principe actif a été dissous par chauffage préalable de l'excipient lipidique ou obtenue par dissolution des lipides et du principe actif dans un

solvant organique suivie d'une évaporation du solvant à l'air libre. La matrice lipidique est ensuite broyée dans un moulin ; la poudre obtenue est finalement tamisée. (Del Curto et al., 2003).

o **L'atomisation par « spray-congealing » :**

Le mélange liquide composé des lipides et du principe actif qui s'y est dissous par chauffage est atomisé sur les parois d'un récipient refroidi. Les MLS se forment par la solidification du liquide atomisé lors du contact avec les parois froides (Akiyama et al., 1993; Eldem et al., 1991; Passerini et al., 2002; Rodriguez et al., 1999; Savolainen et al., 2002). Les rendements d'atomisation sont généralement assez faibles.

o **L'atomisation par « spray-drying »**

C'est un procédé permettant la transformation d'une solution ou d'une suspension du principe actif en une poudre sèche en une étape unique (Eldem et al., 1991; Pilcer et al., 2006; Sebti, 2006). Dans le cas de l'atomisation de lipides, ceux-ci sont généralement dissous ou dispersés dans un solvant organique puis atomisés sous forme de gouttelettes dans une chambre de séchage contenant un gaz inerte chauffé. Au contact de la chaleur, le solvant des gouttelettes s'évapore donnant ainsi naissance à des particules solides. Ce type d'appareillage n'est cependant pas étudié pour atomiser des substances telles que les corps gras ayant une température de fusion peu élevée. La température de sortie doit être suffisamment basse pour éviter la fusion ou le ramollissement des particules lipidiques séchées, ce qui nécessite quelques adaptations de l'appareillage (Sebti, 2006). De plus, bien que l'exposition aux hautes températures soit de courte durée, cette technique est de préférence à éviter pour les composés thermosensibles.

o **L'utilisation des fluides supercritiques**

Les fluides supercritiques (FSC) constituent une des alternatives les plus prometteuses en vue du développement de nouvelles techniques d'encapsulation minimisant ou évitant l'utilisation de solvants organiques

(Ribeiro Dos Santos et al., 2002). On appelle fluide supercritique tout fluide porté à une pression et une température supérieure à celles de son point critique. L'état supercritique est présenté comme un état intermédiaire entre celui des liquides et des gaz. Ainsi les FSC ont une viscosité faible et une diffusivité élevée comme les gaz et une densité proche de celle des liquides. Ces propriétés peuvent être modulées par ajustement de la température et de la pression.

Les avantages du CO₂ supercritique (le FSC le plus utilisé) sont nombreux : il est inerte chimiquement, non toxique, ininflammable, non explosif et peu coûteux. Actuellement, le principal facteur limitant son utilisation est le coût d'investissement de l'appareil (Charbit et al., 2003).

On distingue trois familles de procédés utilisant les FSC :

- o Celle où le FSC joue le rôle de solvant (procédé RESS- « Rapid Expansion from Supercritical Solutions ») (Debenedetti et al., 1993)
- o Celle où le FSC joue le rôle d'anti-solvant (procédé ASES- « Aerosol Solvent Extraction System ») (Bleich et al., 1996)
- o Celle où le FSC sert principalement d'agent d'expansion (procédé PGSS- « Particle Generation from Gas Saturated Solutions »)

Ce dernier procédé (PGSS) est particulièrement intéressant pour microniser des composés à bas point de fusion tels les polymères mais également les excipients lipidiques (tels ceux utilisés dans la fabrication des MLS) (Fages et al., 2003). En effet, cette technique consiste à fondre l'excipient et à y dissoudre le CO₂ sous pression. Le mélange obtenu est ensuite détendu à travers une buse pour produire des particules de taille micronique. Lorsqu'un principe actif est dissous ou dispersé dans l'excipient fondu, cette technique permet de réaliser son encapsulation (Charbit et al., 2003).

L'atomisation par « spray congealing » et par « spray drying », ainsi que l'encapsulation par le procédé PGSS ont pour avantage principal qu'aucune phase aqueuse n'est utilisée. Il n'y a donc pas de partage du

principe actif entre les phases, ce qui permet d'obtenir de très bons rendements d'encapsulation. Pour la même raison, ces techniques de production ou des variantes de ces techniques peuvent être utilisées dans le but d'incorporer des principes actifs hydrophiles sous forme dispersée et non plus à l'état dissous dans une matrice lipidique (Cook et al., 2005).

L'utilisation de MLS dans le but d'obtenir une libération prolongée de substances hydrophiles peut donner des résultats intéressants lorsque le principe actif est dispersé à l'intérieur des MLS. Il convient cependant de garder à l'esprit que les principes actifs hydrophiles tendent souvent à se retrouver sous forme de cristaux en surface des particules si les méthodes de production habituelles sont employées. Mais si un principe actif hydrophile est dispersé à l'intérieur d'une matrice lipidique, il diffusera moins facilement à l'intérieur de celle-ci qu'un principe actif lipophile, ce qui permettra de ralentir le libération (Cavalli et al., 1999). Des résultats similaires ont été obtenus en complexant des molécules lipophiles dans des cyclodextrines puis en introduisant le complexe dans des MLS (Scalia et al., 2006).

Une autre technique a également été développée dans le but d'introduire des principes actifs hydrophiles dans des MLS, à savoir :

o **La technique de la double émulsion (ou émulsion multiple) E/H/E:**

Il a été démontré que la solubilité du principe actif dans la phase continue (externe) doit être la plus basse possible si on veut minimiser le partage de cette molécule entre les phases dispersée et continue et ainsi optimiser la charge dans les MLS (Bodmeier et al., 1992a). Dans la technique de la double émulsion, une phase aqueuse interne contenant le principe actif dissous est séparée de la phase continue aqueuse par une phase lipidique (Bodmeier et al., 1992b). Pour ce faire, la phase aqueuse contenant le principe actif dissous est chauffée puis émulsionnée dans les lipides fondus. L'émulsion primaire E/H obtenue est ensuite émulsionnée dans une phase continue aqueuse préalablement chauffée. L'émulsion double formée est refroidie rapidement de façon à obtenir une suspension

de microparticules. A noter que la charge en principe actif diminue lorsqu'on augmente le volume de la phase aqueuse interne. De plus les MLS obtenues par cette technique libèrent le principe actif de façon moins prolongée par comparaison avec la libération d'un même principe actif à partir de microparticules polymériques obtenues par une technique similaire (Bodmeier et al., 1992b).

IV.4. Caractérisation des MLS

IV.4.1 Taille des MLS

La taille des particules est un des paramètres de caractérisation les plus importants pour les MLS. La taille est en effet un paramètre critique susceptible d'influencer l'activité biologique (Bunjes, 2005).

Lorsque l'administration par inhalation est visée, comme décrit à la page 16, la taille des MLS revêt une importance particulière. Dans ce cas, c'est la détermination du diamètre aérodynamique qui prévaut. Les techniques permettant d'évaluer ce diamètre aérodynamique ont été détaillées à la page 39.

Dans les autres cas, mais également en tant qu'étude préliminaire de la taille des particules destinées à l'inhalation, le diamètre géométrique des MLS peut être déterminé par les techniques suivantes:

- o **Diffractométrie laser** : C'est la technique la plus fréquemment utilisée qui permet de mesurer la taille des particules sous forme sèche mais également des particules en suspension dans un liquide, ainsi que la taille des gouttelettes dans le cas des émulsions. La taille est déterminée en fonction de la quantité de lumière diffractée par la particule et de l'angle de déviation de la lumière diffractée. C'est la technique de choix lorsque les particules ont une taille approximativement comprise entre 500 nm et 500 µm. Les résultats peuvent être exprimés en D50 (diamètre médian) ou plus précisément en $D(v;0,5)$ (diamètre médian volumétrique)

ou $D(m;0,5)$ (diamètre médian de masse). A noter que, lorsque la densité de la particule mesurée est indépendante de la taille (est c'est presque toujours le cas), les termes diamètre médian volumétrique et diamètre médian de masse sont équivalents et donc interchangeables (Washington, 1992).

- **Electrorésistance par compteurs Coulter** : Technique basée sur la mesure de la variation de la résistance entre deux électrodes lorsqu'une particule en suspension dans un électrolyte passe à travers l'orifice séparant ces deux électrodes. Cette variation de la résistance est dépendante de la taille de la particule.
- **Tamisage** : Cette technique est à éviter pour les particules de moins de 40 μm , pour les particules fragiles et susceptibles d'être altérées par le stress mécanique, pour les particules en forme d'aiguilles, pour celles chargées électrostatiquement ou pour les particules collantes et qui tendent à l'agglomération.

IV.4.2 Forme des MLS

La forme des MLS peut être visualisée par les techniques de microscopie optique et/ou électronique en fonction de la taille des particules et selon les détails qu'on désire observer.

Outre la forme, il est possible de caractériser par microscopie la surface des particules et de déterminer si celle-ci est lisse ou poreuse, régulière ou irrégulière. La morphologie de surface des MLS s'est effectivement révélée être influencée à la fois par les techniques de production mais également par les matières premières utilisées (Savolainen et al., 2002).

Il peut également être intéressant de visualiser d'éventuels cristaux de principes actifs qui seraient situés en surface des particules ou en dehors des particules. Ces observations pourront, le cas échéant, permettre d'expliquer certains profils de libération du principe actif à partir des MLS.

A noter que la taille et la forme des particules peuvent être appréciées par les nouvelles techniques d'analyse d'image (Pharmavision® 830, Malvern, Royaume-Uni ; Alpaga®, Occhio, Belgique). Ce type d'appareillage fonctionne sur le principe de la microscopie électronique mais de façon automatisée. L'appareil mesure simultanément divers paramètres de taille et de forme (diamètre, circularité, convexité, allongement,...) et ce, sur un grand nombre de particules afin d'obtenir un échantillon statistiquement valable. L'utilisation de l'analyse d'images n'est actuellement pas très répandue car elle est limitée par le coût élevé des équipements.

IV.4.3 Charge en principe actif et efficacité d'encapsulation (ou d'incorporation) du principe actif dans les MLS

La détermination de la charge en principe actif est un paramètre important de l'évaluation des formes pharmaceutiques et notamment des MLS.

Il est bien évidemment préférable de produire des MLS ayant une charge élevée en principe actif et un bon rendement d'encapsulation, pour ne pas gaspiller le principe actif mais également pour éviter de devoir administrer de trop grandes quantités de MLS et ce, quelle que soit la voie d'administration (Jaspart et al., 2005).

L'incorporation d'un principe actif dans des microparticules peut être exprimée en termes de charge théorique, de charge réelle ou d'efficacité d'encapsulation :

- **La charge théorique en principe actif (%)** correspond à la quantité totale théorique de PA par rapport à la quantité totale de phase lipidique (Excipients lipidiques + PA)
- **La charge réelle en principe actif (%)** correspond à la quantité en principe actif déterminée par dosage par rapport à

la quantité totale de phase lipidique (Excipients lipidiques + PA)

- **L'efficacité d'encapsulation (ou d'incorporation) ou rendement d'encapsulation (ou d'incorporation) (EE) (%)** correspond au rapport entre la charge réelle et la charge théorique en principe actif.

La charge en principe actif et l'EE d'un principe actif dans des MLS peuvent être influencées par les facteurs suivants :

- La solubilité du principe actif dans la phase lipidique si la technique de production nécessite l'utilisation d'une phase externe aqueuse. Dans certains cas, lorsque les molécules sont hydrophiles, il est possible de modifier le pH de la phase aqueuse externe de façon à diminuer la solubilité du PA dans celle-ci et donc d'augmenter la charge en PA dans les MLS (Reithmeier et al., 1998; Reithmeier et al., 2001b).
- La méthode de production choisie : ainsi, les techniques ne nécessitant que l'utilisation d'une phase lipidique fourniront de bons résultats en termes d'EE. A noter aussi que la méthode d'émulsification H/E à chaud donne généralement de meilleurs résultats que la technique par évaporation de solvants (Reithmeier et al., 2001a; Reithmeier et al., 2001b). De même, l'homogénéisation à froid donne des rendements d'encapsulation plus élevés que la technique d'homogénéisation à chaud (Demirel et al., 2001).
- La taille des particules : l'augmentation de la taille des particules mène à des charges plus élevées en principe actif. Il a également été mis en évidence que dans un lot de MLS, certaines parmi les plus petites microparticules ne contenaient que de l'excipient et étaient dénuées de principe actif (MLS vides) (Passerini et al., 2002; Rodriguez et al., 1999).
- La charge théorique initiale : il est évident que l'EE diminue lorsque la charge théorique initiale est élevée. Ainsi, lorsqu'on tente d'introduire de (trop) grandes quantités de PA, le

rendement d'encapsulation s'en trouve affecté. Afin d'obtenir une charge réelle en PA optimale, il est nécessaire de partir d'une charge initiale théorique suffisamment importante, en évitant toutefois le gaspillage de PA qui serait généré par une faible EE. A l'inverse, des recherches ont mis en évidence une augmentation de l'EE lorsque la charge initiale en PA était augmentée, et ce pour les principes actifs peu solubles en phase aqueuse ; cela peut s'expliquer par une saturation de la phase aqueuse en PA qui résulterait en une diminution de la perte relative en PA dans la phase lipidique (Bodmeier et al., 1992a).

Au vu des nombreux paramètres susceptibles d'influencer la charge en PA et l'EE dans les MLS, il convient d'optimiser la composition des MLS ainsi que les techniques de production en fonction du PA choisi et de la voie d'administration visée afin d'obtenir une charge et/ou une EE optimale.

IV.4.4 Analyse de l'état cristallin

Cette étape de caractérisation est nécessaire pour détecter d'éventuelles modifications des propriétés physiques tant du principe actif incorporé dans les MLS que des excipients lipidiques.

Il a en effet été démontré que, bien que les MLS soient produites à partir de matières premières solides et cristallines, la présence d'agents tensio-actifs et la méthode de préparation peuvent être responsables de modifications de l'état cristallin des MLS comparativement aux matières premières. La présence de principe actif peut également provoquer des modifications dans la structure cristalline des excipients lipidiques constituant les MLS (Bunjes et al., 2001).

Des cristallisations retardées ont ainsi été observées lorsque des MLS de triglycérides à courtes chaînes étaient préparées par émulsification H/E à chaud. Les particules ne pouvaient acquérir l'état solide que par

application de conditions thermiques particulières (Westesen et al., 1995). Or, comme l'intérêt majeur des microparticules lipidiques (à savoir la possibilité de libérer un PA de façon prolongée) tient à l'état solide des microparticules, il est important de pouvoir suivre et étudier le processus de cristallisation (Bunjés, 2005).

Des phénomènes de polymorphisme peuvent également survenir durant la préparation des MLS (notamment durant la phase de refroidissement-solidification après fusion) mais également durant le stockage. Les triglycérides et les acides gras sont, parmi les excipients lipidiques, les composés les plus susceptibles de subir une transformation polymorphique. La composition des excipients lipidiques ainsi que la vitesse de refroidissement lors de la production auront donc une influence sur l'apparition de phénomènes de polymorphisme ainsi que sur le type de polymorphes obtenu.

Le phénomène de polymorphisme peut affecter certaines des propriétés des particules lipidiques, comme par exemple leur capacité à incorporer le principe actif, leur point de fusion (Westesen et al., 1997). La solubilité du principe actif peut également être modifiée. De plus, si on considère que l'état cristallin et les modifications possibles de l'état solide des lipides ainsi que du principe actif sont corrélés avec la vitesse de libération de ce dernier à partir de la matrice lipidique, il est nécessaire de tenir compte de ces paramètres (Mehnert et al., 2001; Savolainen et al., 2002).

L'état cristallin des lipides et du principe actif sera principalement étudié à l'aide des techniques de calorimétrie différentielle (« Differential Scanning Calorimetry »- DSC) et de diffraction des rayons X.

IV.5. Les voies d'administration des MLS :

Etudes de libération *in vivo*, biocompatibilité

Bien que considérées comme des systèmes prometteurs en vue de moduler la libération d'un principe actif, jusqu'à présent, les MLS n'ont été que très peu étudiées *in vivo*.

En ce qui concerne leur biocompatibilité, les MLS au même titre que les nanoparticules lipidiques (NLS) sont généralement supposées être bien tolérées au vu de leur composition proche des lipides physiologiques (Mehnert et al., 2001). Il serait néanmoins intéressant d'évaluer leur éventuelle toxicité *in vivo* surtout lorsque leur mode de fabrication implique l'utilisation de tensio-actifs et/ou de solvants organiques.

Ce paragraphe reprend les différentes voies d'administration ayant été envisagées pour les MLS ainsi que les éventuelles études de libération et de biocompatibilité s'y rapportant (Jaspart et al., 2005).

IV.5.1 Administration de MLS par voie orale

La voie d'administration orale est celle la plus fréquemment visée dans le cadre de l'étude des MLS (Akiyama et al., 1993; Demirel et al., 2001; Giannola et al., 1993; Giovannelli et al., 2005; Lewis et al., 1998; Passerini et al., 2003; Rodriguez et al., 1999; Savolainen et al., 2003; Vilivalam et al., 1994; Vippagunta et al., 2002).

Etant donné que les MLS sont composées de lipides physiologiques ou proches de ceux-ci et que les éventuels tensioactifs utilisés ont déjà été administrés auparavant par voie orale, l'intérêt d'une étude de biocompatibilité n'a été soulevé par aucun auteur.

De même, peu d'études de libération de principes actifs ont été réalisées *in vivo*. El-Gibaly a toutefois mis en évidence après administration orale chez le rat une libération prolongée de l'allopurinol incorporé dans des MLS (composées de cire d'abeille et d'hexacosanol) comparativement à l'allopurinol administré tel quel (El Gibaly et al., 2005)

IV.5.2 Administration de MLS par voie parentérale

Les MLS peuvent également être administrées par voie parentérale (à l'exception de la voie intraveineuse à cause de la taille supramicronique des MLS).

La biocompatibilité de MLS composées de tripalmitate de glycérol et d'un tensioactif, le PVA (polyacétate de vinyle) administrées sous forme d'implant sous-cutané a été étudiée chez la souris par Reithmeier comparativement à un implant de microparticules polymériques (composées de PLGA). Les résultats de cette étude ont montré une légère réaction inflammatoire dans la zone d'implantation tant dans le cas des MLS que des microparticules polymériques. Ces dernières ayant été approuvées pour l'administration parentérale, il a été conclu que les MLS étudiées présentaient une biocompatibilité acceptable, comparable à celle des microparticules de PLGA (Reithmeier et al., 2001b).

D'autre part, Del Curto a produit des MLS à base de monobéhénate de glycérol contenant une hormone antagoniste de la gonadoréline et les a administrées chez le rat par voie sous-cutanée. Une libération prolongée de cette hormone à partir des MLS a été mise en évidence (Del Curto et al., 2003).

IV.5.3 Usage topique des MLS

L'usage topique de MLS est jusqu'à présent peu répandu. La plupart des applications concernent les écrans solaires. Yener a notamment incorporé un agent anti-UV (octylméthoxy-cinnamate ou «OMC) dans des MLS composées de cire d'abeille ainsi que d'un agent tensioactif, le polysorbate 80. Les MLS obtenues ont été incorporées à leur tour dans différents véhicules à usage dermatologique, à savoir une crème H/E, un gel de carbomère et une crème E/H. L'incorporation de l'OMC dans des MLS a permis de ralentir sa libération et donc de prolonger sa durée d'action (Yener et al., 2003). L'incorporation dans des MLS a également permis d'améliorer la photo-stabilité de certains agents anti-UV ainsi que

de la mélatonine (Iannuccelli et al., 2006; Scalia et al., 2006; Tursilli et al., 2006).

IV.5.4 Administration de MLS par voie pulmonaire

Bien que l'étude des MLS soit considérée à l'heure actuelle comme un domaine de recherches très prometteur, les applications de leur administration par inhalation sont à ce jour très limitées. Seules quelques études très récentes ont envisagé d'administrer les MLS par voie pulmonaire (Cook et al., 2005; Pilcer et al., 2006; Sanna et al., 2003; Sebti, 2006; Sebti et al., 2006b; Sebti et al., 2006a), notamment dans le but d'obtenir une libération prolongée et donc une action prolongée du principe actif (Cook et al., 2005). Aucune donnée *in vivo* concernant le potentiel des MLS administrées par inhalation à libérer de façon prolongée le principe actif qui y est incorporé n'est disponible pour l'instant.

La biocompatibilité des excipients constituant les MLS n'a également fait l'objet d'aucune étude, leurs auteurs s'appuyant sur le fait que les lipides utilisés ont des compositions proches des lipides physiologiques.

Au vu des nombreux avantages que présentent les MLS (Voir pages 71 et 72), nous avons décidé d'utiliser ceux-ci en vue de développer une forme pour inhalation à libération prolongée incorporant une molécule destinée au traitement de l'asthme (Voir chapitre V).

IV.6. Références bibliographiques

Akiyama Y., Yoshioka M., Horibe H., Hirai S., Kitamori N., Toguchi H., 1993. Novel oral controlled-release microspheres using polyglycerol esters of fatty acids. *J.Control.Release* 26 (1), 1-10.

Bleich J., Muller B.W., 1996. Production of drug loaded microparticles by the use of supercritical gases with the aerosol solvent extraction system (ASES) process. *J.Microencapsul.* 13 (2), 131-139.

Bodmeier R., Wang J., Bhagwatwar H., 1992a. Process and formulation variables in the preparation of wax microparticles by a melt dispersion technique. I. Oil-in-water technique for water-insoluble drugs. *J.Microencapsul.* 9 (1), 89-98.

Bodmeier R., Wang J., Bhagwatwar H., 1992b. Process and formulation variables in the preparation of wax microparticles by a melt dispersion technique. II. W/O/W multiple emulsion technique for water-soluble drugs. *J.Microencapsul.* 9 (1), 99-107.

Bunjes H., 2005. Characterization of Solid Lipid Nano- and Microparticles. In: *Lipospheres in drug targets and delivery*, chap.3, Nastruzzi C. (Ed), 41-66.

Bunjes H., Drechsler M., Koch M.H., Westesen K., 2001. Incorporation of the model drug ubidecarenone into solid lipid nanoparticles. *Pharm.Res.* 18 (3), 287-293.

Cavalli R., Peira E., Caputo O., Gasco M.R., 1999. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with beta-cyclodextrins. *Int.J.Pharm.* 182 (1), 59-69.

Charbit G., Badens E., Boutin O., 2003. Applications des technologies supercritiques. Etat de l'art et verrous théoriques, *Proceedings 16ème Congrès Français de Mécanique*, Nice, France

Cook R.O., Pannu R.K., Kellaway I.W., 2005. Novel sustained release microspheres for pulmonary drug delivery. *J.Control.Release* 104 (1), 79-90.

Cortesi R., Esposito E., Luca G., Nastruzzi C., 2002. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials* 23 (11), 2283-2294.

Debenedetti P.G., Tom J.W., Sang-Do Y., Gio-Bin L., 1993. Application of supercritical fluids for the production of sustained delivery devices. *J.Control.Release* 24 (1-3), 27-44.

Del Curto M.D., Chicco D., D'Antonio M., Ciolli V., Dannan H., D'Urso S., Neuteboom B., Pompili S., Schiesaro S., Esposito P., 2003. Lipid microparticles as sustained release system for a GnRH antagonist (Antide). *J.Control.Release* 89, 297-310.

Demirel M., Yazan Y., Muller R.H., Kilic F., Bozan B., 2001. Formulation and in vitro-in vivo evaluation of piribedil solid lipid micro- and nanoparticles. *J.Microencapsul.* 18 (3), 359-371.

El Gibaly I., Abdel-Ghaffar S.K., 2005. Effect of hexacosanol on the characteristics of novel sustained-release allopurinol solid lipospheres (SLS): factorial design application and product evaluation. *Int.J.Pharm.* 294 (1-2), 33-51.

Eldem T., Speiser P., Hincal A., 1991. Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharm.Res.* 8 (1), 47-54.

Esposito E., Cortesi R., Nastruzzi C., 2005. Production of lipospheres for bioactive compound delivery. In: *Lipospheres in drug targets and delivery: Approaches, methods and applications*, Nastruzzi C. (Ed), 23-40.

Fages J., Lochard H., Rodier E., Letourneau J.-J., Sauceau M., 2003. La génération de solides divisés par fluides supercritiques. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 81, 161-175.

Frederiksen H.K., Kristensen H.G., Pedersen M., 2003. Solid lipid microparticle formulations of the pyrethroid gamma-cyhalothrin-incompatibility of the lipid and the pyrethroid and biological properties of the formulations. *J.Control.Release* 86, 243-252.

Giannola L.I., Di Stefano V., De Caro V., 1993. White beeswax microspheres: A comparative in vitro evaluation of cumulative release of the anticancer agents fluorouracil and ftorafur. *Pharmazie* 48 (2), 123-126.

Giovannelli L., Bellomi S., Pattarino F., Albertini B., 2005. Characterization of nifedipine microparticles prepared by Hot Air Coating technique. *Int.J.Pharm.* 293 (1-2), 225-234.

Iannuccelli V., Sala N., Tursilli R., Coppi G., Scalia S., 2006. Influence of liposphere preparation on butyl-methoxydibenzoylmethane photostability. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 63 (2), 140-145.

Jaspart S., Piel G., Delattre L., Evrard B., 2005. Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterisation, drug release and applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2 (1), 75-87.

Kawakatsu T., Tragardh G., Tragardh C., 2001. Production of W/O/W emulsions and S/O/W pectin microcapsules by microchannel emulsification. *Colloid Surface A* 189 (1-3), 257-264.

Lewis L., Boni R., Adeyeye C.M., 1998. Effect of emulsifier blend on the characteristics of sustained release diclofenac microspheres. *J. Microencapsul.* 15 (3), 283-298.

Malamataris S., Panagopoulou A., Hatzipantou P., 1991. Controlled release from glycerol palmito-stearate matrices prepared by dry-heat granulation and compression at elevated temperature. *Drug.Dev.Ind.Pharm.* 17, 1765-1777.

Masters D.B., Domb A.J., 1998. Liposphere local anesthetic timed-release for perineural site application. *Pharm.Res.* 15 (7), 1038-1045.

Mehnert W., Mader K., 2001. Solid lipid nanoparticles, Production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 47, 165-196.

Passerini N., Perissuti B., Albertini B., Voinovich D., Moneghini M., Rodriguez L., 2003. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. *J. Control. Release* 88, 263-275.

Passerini N., Perissuti B., Moneghini M., Voinovich D., Albertini B., Cavallari C., Rodriguez L., 2002. Characterization of carbamazepine-Gelucire 50/13 microparticles prepared by a spray-congealing process using ultrasounds. *J. Pharm. Sci.* 91 (3), 699-707.

Pilcer G., Sebti T., Amighi K., 2006. Formulation and characterization of lipid-coated tobramycin particles for dry powder inhalation. *Pharm.Res.* 23 (5), 931-940.

Reithmeier H., Gopferich A., Herrmann J., 1998. Preparation and characterization of lipid microparticles containing insulin, Proceedings of the 2nd World Meeting APGI/APV, Paris, France

Reithmeier H., Herrmann J., Gopferich A., 2001a. Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin. *Int.J.Pharm.* 218, 133-143.

Reithmeier H., Herrmann J., Gopferich A., 2001b. Lipid microparticles as parenteral controlled release device for peptides. *J. Control. Release* 73, 339-350.

Introduction

Ribeiro Dos Santos I., Richard J., Pech B., Thies C., Benoit J.P., 2002. Microencapsulation of protein particles within lipids using a novel supercritical fluid process. *Int.J.Pharm.* 242 (1-2), 69-78.

Rodriguez L., Passerini N., Cavallari C., Cini M., Sancin P., Fini A., 1999. Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomizer for spray-congealing processes. *International Journal of pharmaceuticals.* 183, 133-143.

Sanna V., Kirschvink N., Gustin P., Gavini E., Roland I., Delattre L., Evrard B., 2003. Preparation and in vivo toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration. *AAPS PharmSciTech* 5 (2), Article 27.

Savolainen M., Herder J., Khoo C., Lovqvist K., Dahlqvist C., Glad H., Juppo A.M., 2003. Evaluation of polar lipid-hydrophilic polymer microparticles. *Int.J.Pharm.* 262 (1-2), 47-62.

Savolainen M., Khoo C., Glad H., Dahlqvist C., Juppo A.J., 2002. Evaluation of controlled-release polar lipid microparticles. *Int.J.Pharm.* 244, 151-161.

Scalia S., Tursilli R., Sala N., Iannuccelli V., 2006. Encapsulation in lipospheres of the complex between butyl methoxydibenzoylmethane and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Int.J.Pharm.* 320 (1-2), 79-85.

Sebti T., 2006. Développement et évaluation de formulations lipidiques à poudre sèche pour inhalation. Université Libre de Bruxelles, Belgique.

Sebti T., Amighi K., 2006a. Preparation and in vitro evaluation of lipidic carriers and fillers for inhalation. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 63 (1), 51-58.

Sebti T., Pilcer G., Van Gansbeke B., Goldman S., Michils A., Vanderbist F., Amighi K., 2006b. Pharmacoscintigraphic evaluation of lipid dry powder budesonide formulations for inhalation. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 64 (1), 26-32.

Sugiura S., Nakajima M., Tong J., Nabetani H., Seki M., 2000. Preparation of monodispersed Solid Lipid Microspheres using a microchannel emulsification technique. *J.Colloid Interf.Sci.* 227, 95-103.

Tursilli R., Casolari A., Iannuccelli V., Scalia S., 2006. Enhancement of melatonin photostability by encapsulation in lipospheres. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40 (4), 910-914.

Vilivalam V.D., Adeyeye C.M., 1994. Development and evaluation of controlled-release diclofenac microspheres and tableted microspheres. *J.Microencapsul.* 11 (4), 455-470.

Vippagunta S.R., Maul K.A., Tallavajhala S., Grant D.J.W., 2002. Solid-state characterization of nifedipine solid dispersions. *Int.J.Pharm.* 236 (1-2), 111-123.

Washington C., 1992. Basic principles. In: *Particle size analysis in pharmaceuticals and other industries; theory and practice*, chap.1, Ellis Horwood (Ed), Liverpool, pp 9-40.

Westesen K., Bunjes H., Koch M.H.J., 1997. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release. *J.Control.Release* 48, 223-236.

Westesen K., Bunjes H., 1995. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? *Int.J.Pharm.* 115 (1), 129-131.

Yener G., Incegul T., Yener N., 2003. Importance of using solid lipid microspheres as carriers for UV filters on the example octyl methoxy cinnamate. *Int.J.Pharm.* 258, 203-207.

Chapitre V: L'asthme

V.1. Définition et physiopathologie de l'asthme

L'asthme constitue une des affections chroniques les plus fréquentes, touchant entre 100 et 150 millions de personnes dans le monde selon l'OMS et serait responsable d'au moins 180000 décès par an (<http://www.who.int>). 5 à 10% de la population des pays industrialisés serait touchée par cette affection (Rang et al., 1999).

L'asthme a longtemps été envisagé comme une maladie dont la principale lésion était une hypertrophie et une hypercontractilité des muscles lisses bronchiques (American Thoracic Society Committee on Diagnostic Standards, 1962). Actuellement, l'asthme est considéré comme une maladie inflammatoire et la réponse musculaire serait une conséquence du processus inflammatoire plutôt que le point de départ de la maladie même dans le cas de l'asthme léger (Frew et al., 1993).

L'asthme peut donc se définir comme une affection inflammatoire chronique des voies respiratoires se traduisant par une augmentation de l'hyperréactivité bronchique, menant à des épisodes récurrents d'oppression respiratoire, d'essoufflement, de respiration sifflante et de toux, et survenant plus particulièrement la nuit ou tôt le matin. Ces épisodes de dyspnée sont habituellement associés à une obstruction des voies respiratoires, la plupart du temps réversible soit spontanément soit sous l'effet d'un traitement (Global Initiative for Asthma, 1996).

L'inflammation chronique des voies aériennes est associée à une hyperréactivité bronchique et à une limitation du flux d'air due au phénomène de remodelage. Le remodelage désigne l'ensemble des modifications structurelles du tissu pulmonaire survenant chez le patient asthmatique, à savoir une hyperplasie et une hypertrophie des muscles lisses bronchiques, une fibrose sous-épithéliale (épaississement de la membrane basale), des œdèmes de la muqueuse et de la sous-muqueuse bronchique faisant suite à une infiltration de cellules inflammatoires (principalement des éosinophiles mais aussi quelques neutrophiles, mastocytes et lymphocytes T), une vasodilatation et enfin une production excessive de mucus due à une augmentation du nombre et de la taille des cellules à mucus (Bjermer, 2001) (Figure V-1).

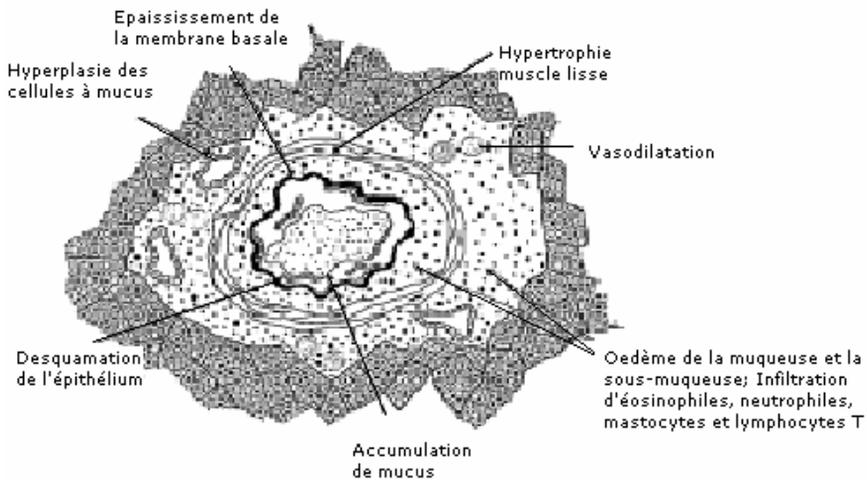


Figure V-1 : Représentation du phénomène de remodelage bronchique (Global Initiative for Asthma, 1996)

V.2. Les traitements de l'asthme par inhalation

Les traitements actuels de l'asthme par inhalation font appel aux β_2 -mimétiques (à courte ou à longue durée d'action), aux anticholinergiques, aux corticostéroïdes et au cromoglicite sodique. La distinction entre les substances ayant des propriétés bronchodilatatrices et celles ayant des propriétés anti-inflammatoires n'est pas absolue car certaines d'entre elles présentent à la fois une composante bronchodilatatrice et anti-inflammatoire.

V.2.1 Agonistes des récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -mimétiques) à courte durée d'action

Exemples: Salbutamol, fénotérol, terbutaline

Les β_2 -mimétiques, par leur action relaxante sur les muscles lisses bronchiques, restent le traitement symptomatique de choix du bronchospasme aigu pouvant survenir chez les patients asthmatiques. Les β_2 -mimétiques à courte durée d'action sont également administrés en prophylaxie de l'asthme lié à l'effort et avant une exposition attendue à un allergène. Ils ne doivent être utilisés que dans ces indications et non pas selon un schéma fixe (Centre belge d'information pharmacothérapeutique, 2005). On considère généralement que s'il devient nécessaire d'administrer un β_2 -mimétique à courte durée d'action plus d'une fois par jour, il convient d'instaurer ou de réévaluer le traitement de fond (par des corticostéroïdes) (Barnes et al., 1999).

Les β_2 -mimétiques sont administrés par inhalation afin de limiter les effets indésirables au niveau cardiaque.

V.2.2 Agonistes des récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -mimétiques) à longue durée d'action

Exemples : Formotérol, salmétérol

Les β_2 -mimétiques à longue durée d'action (au moins 12 heures) (LABA - « Long acting β_2 -agonist ») sont utilisés par inhalation dans le traitement d'entretien de l'asthme. Ils constituent chez l'adulte le premier choix comme traitement adjuvant en cas de contrôle insuffisant de l'asthme avec un traitement par des corticostéroïdes à inhaler (Barnes et al., 1999).

Le salmétérol ne convient pas au traitement des symptômes aigus car il présente un début d'action lent (10 à 20 minutes après l'administration). Le formotérol agit quant à lui aussi rapidement que les β_2 -mimétiques à courte durée d'action mais son utilisation en tant que traitement de la crise asthmatique aiguë doit toujours faire l'objet d'études complémentaires (Centre belge d'information pharmacothérapeutique, 2005).

V.2.3 Les anticholinergiques

Le seul anticholinergique recommandé pour le traitement de l'asthme est le bromure d'ipratropium (Centre belge d'information pharmacothérapeutique, 2005).

Ce composé est un dérivé synthétique à ammonium quaternaire de l'atropine qui agit comme antagoniste compétitif de l'acétylcholine au niveau des récepteurs muscariniques des muscles lisses bronchiques (Murphy et al., 1998). Il inhibe donc le bronchospasme médié par l'acétylcholine, mais diminue également les sécrétions de mucus et peut faciliter la clairance muco-ciliaire.

Son action bronchodilatatrice dans l'asthme aigu sévère est moins importante que celle des β_2 -mimétiques et apparaît moins rapidement qu'avec les β_2 -mimétiques à courte durée d'action. Mais, lorsqu'on associe le bromure d'ipratropium aux β_2 -mimétiques, l'effet bronchodilatateur de ces derniers augmente. Le bromure d'ipratropium est principalement utilisé comme alternative au traitement par les β_2 -mimétiques à courte durée d'action lorsque ceux-ci sont contre-indiqués ou mal supportés.

Ces anticholinergiques sont administrés par inhalation et, vu leur faible résorption, ont très peu d'action sur les récepteurs muscariniques autres que bronchiques. Ils présentent donc peu d'effets indésirables.

V.2.4 Les corticostéroïdes

Exemples de corticostéroïdes à inhaler : Dipropionate de béclométhasone, budésonide, propionate de fluticasone

Les corticostéroïdes ne possédant pas d'action bronchodilatatrice, ils ne sont pas utilisés dans le traitement de la crise asthmatique aiguë. Par contre, leur rôle est indéniable dans le traitement de fond de l'asthme pour lequel ils constituent le traitement de base car ils permettent de réduire l'inflammation du tissu pulmonaire, responsable de l'obstruction bronchique.

La plupart du temps, dans le traitement de l'asthme, les corticostéroïdes sont administrés par inhalation. Toutefois l'administration temporaire de corticostéroïdes par voie orale ou parentérale peut être nécessaire en cas d'asthme grave persistant (Centre belge d'information pharmacothérapeutique, 2005).

Leur effet anti-inflammatoire résulte d'actions conjuguées à différents niveaux, parmi lesquels (Gould et al., 1995; Rang et al., 1999):

- Inhibition de la phospholipase A2 et donc diminution de la production de prostaglandines et de leucotriènes
- Inhibition de la transcription de certains gènes codant pour des agents chimiotactiques (notamment les cytokines); d'où diminution du recrutement et de l'activation des éosinophiles, mais aussi de la production d'Ig E
- Augmentation du taux de transcription des récepteurs β_2 -adrénergiques, d'où amélioration de l'efficacité des β_2 -mimétiques inhalés

Les effets indésirables sont limités lorsque les corticostéroïdes sont administrés par inhalation. Cependant, des candidoses oro-pharyngées peuvent survenir. Leur incidence peut être réduite en utilisant l'aérosol

doseur avec une chambre d'expansion (Voir pages 30 et 31) et/ou en rinçant la cavité buccale après inhalation.

V.2.5 Le cromoglicite sodique

Le mécanisme d'action de cette molécule n'est pas encore complètement élucidé. Il semble résulter d'une action combinée à différents niveaux parmi lesquels :

- Inhibition de la dégranulation mastocytaire par stabilisation de la membrane des mastocytes
- Inhibition de la bronchoconstriction réflexe

Le cromoglicite de sodium n'exerce pas d'action bronchodilatatrice sur les muscles lisses bronchiques et ne constitue donc pas un traitement de la crise aiguë. Administré en prophylaxie notamment avant l'exposition à un allergène ou avant un effort susceptible de déclencher une crise d'asthme, il peut réduire ces crises en fréquence et en intensité.

Le cromoglicite sodique peut provoquer une irritation des voies respiratoires et un exanthème.

V.3. Traitements de l'asthme à action prolongée administrés par inhalation

V.3.1 Intérêts et indications des traitements de l'asthme à action prolongée administrés par inhalation

La prolongation de la durée d'action de certaines molécules ainsi que la mise au point de formes à libération prolongée destinées au traitement de l'asthme a pour but de réduire la fréquence des administrations et d'augmenter la compliance.

Dans le cas des substances administrées par inhalation en tant que traitement de fond de la pathologie asthmatique (corticostéroïdes), la

posologie journalière usuelle est répartie sur deux prises. La prolongation de la libération ou de la durée d'action de ces principes actifs pourrait permettre une amélioration de la compliance.

En ce qui concerne les substances destinées à traiter les épisodes aigus d'asthme et qui peuvent également être administrées avant un effort ou une exposition à un allergène, la possibilité d'obtenir une action prolongée (principalement par prolongation de la libération à partir d'un véhicule porteur ou prolongation de la durée d'action par modulation pharmaco-chimique) serait intéressante à plusieurs égards:

V.3.1.1 Prophylaxie des épisodes d'asthme nocturne

Il a été mis en évidence chez bon nombre de patients une exacerbation des symptômes liés à l'asthme durant la nuit (Bjermer, 2001). En effet, il s'est avéré que, la nuit, les éosinophiles et les macrophages tendaient à s'accumuler préférentiellement dans les alvéoles et les voies aériennes périphériques (Kraft et al., 1996).

L'administration au coucher d'un traitement prophylactique des crises d'asthme qui agit toute la nuit est donc particulièrement intéressante.

V.3.1.2 Prophylaxie des épisodes aigus d'asthme chez l'animal

C'est le cas de l'asthme félin qui a motivé et constitué le point de départ de la recherche faisant l'objet de cette thèse. C'est la raison pour laquelle cette pathologie est plus particulièrement développée dans ce paragraphe.

L'asthme félin constitue la pathologie respiratoire la plus fréquente chez le chat et affecte les chats de tout âge mais principalement les jeunes adultes. Un chat sur 200 en souffrirait. Cette pathologie affecte plus fréquemment certaines races comme les siamois et les orientaux (Corcoran et al., 1995; Dye, 1992).

L'asthme félin se définit comme une maladie respiratoire caractérisée par des épisodes aigus paroxystiques de dyspnée expiratoire et de toux. La symptomatologie de l'asthme félin résulte d'une hyperréactivité bronchique suite à une exposition à un aérogène, qui se traduit par une contraction réversible des muscles lisses bronchiques et une inflammation des voies respiratoires inférieures. Ces symptômes s'expriment par une augmentation des sécrétions de mucus, un œdème de la muqueuse bronchique et un rétrécissement des voies aériennes dû à l'hyperexcitabilité des muscles lisses bronchiques et à l'infiltration de diverses cellules inflammatoires, en particulier les éosinophiles (Corcoran et al., 1995; Padrid, 2000). L'asthme félin est évalué selon la fréquence et la sévérité des symptômes. Il a été suggéré que l'asthme félin se rapproche de la forme extrinsèque de l'asthme humain (parfois appelée asthme allergique) (Moses et al., 1985).

Chez le chat en particulier, le principal médiateur responsable de la bronchoconstriction dans l'asthme allergique est la sérotonine, libérée par dégranulation mastocytaire (Dowling, 2001).

A l'heure actuelle, les animaux sont souvent traités pour des pathologies respiratoires par voie orale ou parentérale car ces voies d'administration sont plus commodes pour le praticien. En effet, en clinique, il s'avère difficile d'administrer à un animal un traitement médicamenteux via un dispositif pour inhalation. Or cette voie d'administration est préférable afin de limiter les effets indésirables systémiques. Il conviendrait dans ce cas d'utiliser un dispositif pour inhalation approprié, généralement un IDP muni d'une chambre d'expansion (Voir page 31) voire un IPS de nouvelle génération activé par les mouvements d'inspiration (dispositif actif) (Voir pages 38 et 39).

L'intérêt d'obtenir des traitements à action prolongée est donc évident en médecine vétérinaire. En ce qui concerne l'asthme félin, il est aisé de comprendre qu'une action ou une libération prolongée de β_2 -mimétiques présentent un intérêt tout particulier dans la prévention des crises aiguës de bronchospasme. En effet, l'administration d'un traitement (tel un β_2 -

mimétique à courte durée d'action) pendant une crise aiguë est particulièrement laborieuse.

V.3.2 Cas des β_2 -mimétiques à longue durée d'action : Intérêts et inconvénients

En prolongeant la durée d'action des β_2 -mimétiques, leur champ d'action s'est élargi. Ainsi, comme décrit à la page 96, les « LABA » sont utilisés en traitement d'entretien, en tant qu'adjuvant des corticostéroïdes lorsque ceux-ci ne permettent pas de contrôler suffisamment l'asthme. Il a été démontré que leur utilisation permettait une diminution des épisodes aigus d'asthme nocturne, une amélioration de la fonction pulmonaire et une diminution du nombre d'exacerbations asthmatiques (Kesten et al., 1991; Pearlman et al., 1992; Shrewsbury et al., 2000; Wenzel et al., 1998). De plus, ils offrent une plus longue protection contre les crises de bronchospasmes induites par l'effort (Nelson et al., 1998). Les résultats obtenus avec les LABA utilisés en tant que traitement adjuvant des corticostéroïdes sont meilleurs que lorsque la dose de ces corticostéroïdes est doublée (Greening et al., 1994; Woolcock et al., 1996).

Toutes ces raisons ont poussé au développement de dispositifs pour inhalation combinant un corticostéroïde et un β_2 -mimétique à longue durée d'action, qui permettent une meilleure compliance du patient. De plus l'association de ces deux types de substances actives est moins coûteuse que l'administration séparée des deux principes actifs (Global Initiative for Asthma, 1996).

Toutefois la FDA (« Food and Drug Administration » américaine) a récemment publié un avertissement concernant un risque possible de bronchospasme sévère avec augmentation de mortalité lors de l'utilisation de LABA. Ceci fait suite à une étude dans laquelle une légère augmentation de la mortalité d'origine respiratoire a été observée chez les patients sous salmétérol (Nelson et al., 2006). Notons cependant que dans cette étude moins de 50% des patients étaient traités simultanément par des corticostéroïdes à inhaler alors que les LABA devraient toujours être

utilisés en association avec ceux-ci. Une autre étude de plus petite envergure n'a pas décelé ce risque lors de l'utilisation du formotérol (Wolfe et al., 2006). Ces études concluent toutefois que les LABA restent indispensables pour la prise en charge de l'asthme chronique lorsque les corticostéroïdes utilisés seuls ne suffisent pas à contrôler l'asthme.

Si par la suite, le risque d'augmentation de la mortalité lié aux LABA était confirmé, l'intérêt de développer une forme galénique qui libérerait de façon prolongée un β_2 -mimétique à courte durée d'action et dont le profil toxicologique est connu, n'en serait que plus grand. C'est précisément le but de notre travail de recherche.

V.4. Références bibliographiques

American Thoracic Society Committee on Diagnostic Standards, 1962. Definitions and classification of chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. *Am.Rev.Resp.Dis.* 85, 762

Barnes N.C., Crompton G.K., 1999. Asthma. In: *Pulmonary diseases*, chap.9, Grassi C. (Ed), 65-82.

Bjermer L., 2001. History and future perspectives of treating asthma as a systemic and small airways disease. *Respiratory Medicine* 95, 703-719.

Centre belge d'information pharmacothérapeutique, 2005. Traitement médicamenteux de l'asthme chronique. *Folia Pharmacotherapeutica* 32 (11), 91-99.

Corcoran B.M., Foster D.J., Fuentes V.L., 1995. Feline asthma syndrome: a retrospective study of the clinical presentation in 29 cats. *The journal of small animal practice* 36 (11), 481-488.

Dowling P.M., 2001. Options for treating feline asthma. *Veterinary medicine* 353-356.

Dye J.A., 1992. Feline bronchopulmonary disease. *The veterinary clinics of north America: Small animal practice.* 22 (5), 1187-1201.

Frew A.J., Holgate S.T., 1993. Clinical pharmacology of asthma. Implications for treatment. *Drugs* 46 (5), 847-862.

Global Initiative for Asthma, 1996. NHLBI/WHO Workshop Report. 95-3659

Gould M.K., Raffin T.A., 1995. Pharmacological management of acute and chronic bronchial asthma. In: *Advances in pharmacology*, chap. August J.T., Anders M.W. (Eds), 169-204.

Greening A.P., Ind P.W., Northfield M., Shaw G., 1994. Added salmeterol versus higher-dose corticosteroid in asthma patients with symptoms on existing inhaled corticosteroid. Allen & Hanburys Limited UK Study Group. *Lancet* 344 (8917), 219-224.

Kesten S., Chapman K.R., Broder I., Cartier A., Hyland R.H., Knight A., Malo J.L., Mazza J.A., Moote D.W., Small P., ., 1991. A three-month comparison of twice daily inhaled formoterol versus four times daily inhaled albuterol in the management of stable asthma. *Am.Rev.Respir.Dis.* 144 (3 Pt 1), 622-625.

Introduction

Kraft M., Djukanovic R., Wilson S., Holgate S.T., Martin R.J., 1996. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 154 (5), 1505-1510.

Moses B.L., Spaulding G.L., 1985. Chronic bronchial disease of the cat. *The veterinary clinics of north America: Small animal practice.* 15 (5), 929-948.

Murphy A.W., Platts-Mills T.A.E., 1998. Drug used in asthma and obstructive lung disease. In: *Human pharmacology: molecular pharmacology*, chap.60, Brody T.M., Larner J. (Eds), 797-808.

Nelson H.S., Weiss S.T., Bleecker E.R., Yancey S.W., Dorinsky P.M., 2006. The Salmeterol Multicenter Asthma Research Trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol. *Chest* 129 (1), 15-26.

Nelson J.A., Strauss L., Skowronski M., Ciufu R., Novak R., McFadden E.R., Jr., 1998. Effect of long-term salmeterol treatment on exercise-induced asthma. *N.Engl.J.Med.* 339 (3), 141-146.

Padrid P., 2000. Feline asthma. Diagnosis and treatment. *The veterinary clinics of north America: Small animal practice.* 30 (6), 1279-1293.

Pearlman D.S., Chervinsky P., LaForce C., Seltzer J.M., Southern D.L., Kemp J.P., Dockhorn R.J., Grossman J., Liddle R.F., Yancey S.W., ., 1992. A comparison of salmeterol with albuterol in the treatment of mild-to-moderate asthma. *N.Engl.J.Med.* 327 (20), 1420-1425.

Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., 1999. The respiratory system. In: *Pharmacology*, chap.19, 338-350.

Shrewsbury S., Pyke S., Britton M., 2000. Meta-analysis of increased dose of inhaled steroid or addition of salmeterol in symptomatic asthma (MIASMA). *BMJ* 320 (7246), 1368-1373.

Wenzel S.E., Lumry W., Manning M., Kalberg C., Cox F., Emmett A., Rickard K., 1998. Efficacy, safety, and effects on quality of life of salmeterol versus albuterol in patients with mild to moderate persistent asthma. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 80 (6), 463-470.

Wolfe J., LaForce C., Friedman B., Sokol W., Till D., Della C.G., van As A., 2006. Formoterol, 24 microg bid, and serious asthma exacerbations: similar rates compared with formoterol, 12 microg bid, with and without extra doses taken on demand, and placebo. *Chest* 129 (1), 27-38.

Woolcock A., Lundback B., Ringdal N., Jacques L.A., 1996. Comparison of addition of salmeterol to inhaled steroids with doubling of the dose of inhaled steroids. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 153 (5), 1481-1488.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre VI:

Formulation de microparticules lipidiques solides et optimisation des paramètres de production

VI.1. Introduction

Ce chapitre décrit la production de microparticules lipidiques solides (MLS) vierges, c'est-à-dire non chargées en principe actif, ainsi que l'optimisation des paramètres de fabrication par utilisation de la méthodologie des plans d'expériences, et ce, afin d'obtenir une taille de particules convenant à l'administration par inhalation (Jaspart et al., 2004a; Jaspart et al., 2004b).

VI.2. Formulation de MLS vierges

VI.2.1 Matériel

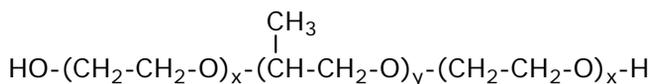
VI.2.1.1 Les lipides

Le Compritol® 888 ATO, choisi pour la réalisation des MLS a été généreusement fourni par Gattefossé (Saint Priest, France). C'est un béhénate de glycérol, c'est-à-dire un mélange de mono-, di- et tri- esters de glycérol et d'acide béhénique (acide gras saturé à 22 atomes de carbone). Ce composé est décrit dans la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition (monographie 1427) (Pharmacopée Européenne, 2005). Le Compritol® 888 ATO se présente sous la forme d'une poudre blanche fine

et sa plage de fusion se situe entre 69 et 74 °C. Le certificat d'analyse correspondant est repris à l'Annexe 1 (page 267).

VI.2.1.2 Le tensioactif

Le tensioactif choisi est le Lutrol® F68, fourni par BASF AG (Ludwigshafen, Allemagne) dont la dénomination chimique est le poloxamer 188. C'est un copolymère séquencé d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène dont la structure générale est la suivante :



où x et y valent respectivement
et approximativement 79 et 28.

Ce composé, décrit dans la Pharmacopée Européenne (Monographie 1464), se présente sous la forme de microsphères de couleur blanche à légèrement jaunâtre (Pharmacopée Européenne, 2005). Sa valeur de HLB est égale à 29. Le certificat d'analyse correspondant est repris à l'Annexe 2 (page 268).

VI.2.1.3 L'eau

L'eau utilisée est l'eau purifiée du laboratoire.

VI.2.2 Méthodes

Parmi les différentes méthodes de préparation décrites au paragraphe IV.3 (pages 72 à 78), la méthode d'homogénéisation à chaud suivie d'un mélange à haute vitesse de cisaillement a été choisie. C'est une technique relativement simple qui permet l'obtention de particules de l'ordre du micromètre.

Le Compritol® 888 ATO est d'une part fondu au bain-marie à 90°C, tandis que l'eau et le Lutrol® F68 sont portés ensemble à cette même température. La phase aqueuse est versée dans la phase lipidique sous agitation à l'aide d'un mélangeur à haute vitesse de cisaillement. Une émulsion huile dans eau est ainsi obtenue par inversion de phase. Après

refroidissement on obtient une suspension de particules lipidiques dans l'eau (Figure VI-1).

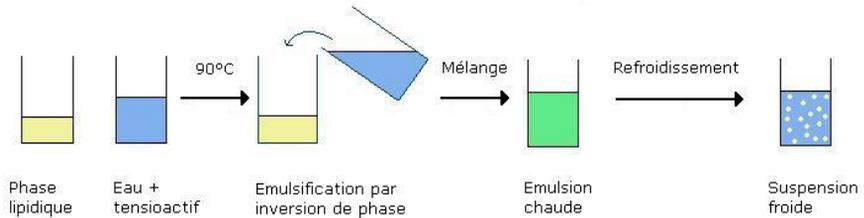


Figure VI-1 : Mode opératoire de fabrication des MLS

Deux types de mélangeurs à haute vitesse de cisaillement seront utilisés et comparés.

Le premier est l'Ultra-Turrax[®] T25 IKA- Janke & Kunkel (Staufen, Allemagne) (Figure VI-2). Cet agitateur est constitué d'un axe central (stator) relié à un moteur électrique et muni d'un rotor avec lames, tournant à l'intérieur d'une tête fixe. Cinq vitesses d'agitation différentes peuvent être sélectionnées, de 8000 à 24000 tours/minute.



Figure VI-2 : Ultra-Turrax[®] T25

Le second est le Silverson® LR4 E.J. Payne Ltd (Longton, Angleterre) (Figure VI-3). Ce type d'agitateur présente un mouvement axial rapide. Un rhéostat permet d'ajuster la vitesse d'agitation.



Figure VI-3: Silverson® LR4

Une haute vitesse de rotation des lames du rotor produit une puissante aspiration qui attire les liquides et les solides du fond du récipient jusqu'au centre de la tête de travail (Figure VI-4a). La force de cisaillement mécanique est produite grâce à la force centrifuge qui pousse les produits vers l'extrémité des lames du rotor (Figure VI-4b). Ceux-ci sont également soumis à un cisaillement hydraulique intense au cours du passage dans les perforations de la tête de travail puis sont expulsés à haute vitesse, provoquant une forte circulation dans l'ensemble du liquide. (Figure VI-4c)

Les produits expulsés sont enfin projetés radialement à grande vitesse vers les parois de la cuve (Figure VI-4d). Dans le même temps, le produit est renouvelé dans la tête de travail, assurant le cycle de mélange. La combinaison des deux, en maintenant une expulsion radiale et une aspiration verticale, produit un courant de circulation sous la surface sans turbulence.

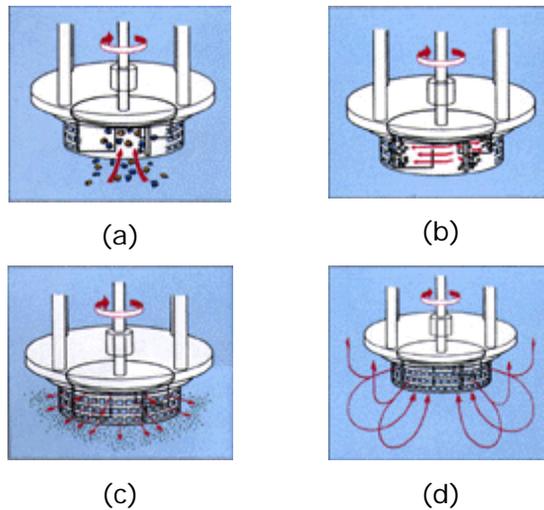


Figure VI-4 : Mécanisme de mélange du Silverson® LR 4

L'étape de refroidissement est réalisée à température ambiante sans agitation. En refroidissant, l'émulsion devient une suspension de particules lipidiques dans une phase aqueuse. Quand la suspension est revenue à température ambiante, la perte d'eau due à l'évaporation est compensée par ajout d'eau distillée.

La suspension est finalement lyophilisée à l'aide d'un lyophilisateur de type Heto® DW 8 de Heto-Holten (Allerød, Danemark) en vue de récupérer et de caractériser les particules lipidiques directement sous forme sèche.

VI.3. Optimisation des paramètres de production des MLS par utilisation des plans d'expériences

VI.3.1 Introduction

L'optimisation des paramètres de production des MLS dans le but d'obtenir un pourcentage maximal (en terme de volume) de particules possédant un diamètre géométrique compris entre 0,5 et 6 μm a été

réalisée en utilisant la méthodologie des plans d'expériences. La zone de taille de 0,5 à 6 μm sera considérée comme la zone de diamètre géométrique adéquate pour une administration pulmonaire. A la page 18, il a été mentionné qu'un diamètre aérodynamique compris entre 0,5 et 5 μm permettait une déposition au niveau des voies aériennes basses. La zone de diamètre géométrique correspondante (0,5 – 6 μm) a été calculée à partir des valeurs de la zone de diamètre aérodynamique (0,5 – 5 μm) en tenant compte de la densité des particules étudiées. La détermination de la densité vraie des MLS et de la zone de diamètre géométrique adéquate pour l'administration pulmonaire sera décrite à la page 199.

VI.3.2 Méthodes

VI.3.2.1 Introduction à la méthodologie des plans d'expériences

La planification expérimentale sera utilisée pour étudier l'influence des différents paramètres de production sur le pourcentage de MLS possédant un diamètre compris entre 0,5 et 6 μm , tout en limitant le nombre d'expériences à réaliser. La méthodologie des plans d'expériences propose le recours à une suite d'expériences construite à priori et garantissant dès le départ la meilleure qualité de l'information qui sera exploitée ultérieurement. Ainsi, contrairement à la méthode classique qui consiste à étudier un seul facteur à la fois en fixant les autres à un niveau déterminé, la méthodologie des plans d'expériences permet de faire varier tous les facteurs simultanément à chaque expérience mais de manière programmée et raisonnée (Goupy, 1996; Lanteri et al., 1996).

Les avantages de cette méthode sont notamment une diminution du nombre d'essais, un nombre plus important de facteurs étudiés, une détection des interactions entre facteurs, une détection des optimums ainsi qu'une optimisation et une modélisation des résultats (Servais, 2004).

Afin de construire la matrice d'expériences du plan et d'en analyser les résultats, nous avons choisi d'utiliser le logiciel statistique MODDE[®] version 6.0 (Umetrics, Suède).

VI.3.2.2 Paramètres de production des MLS

La concentration en Compritol® 888 ATO a été fixée à 5% par rapport au poids total de la suspension et correspond à la phase dispersée.

Un screening préalable a été réalisé afin de déterminer les limites de variation inférieures et supérieures des paramètres critiques de production qui seront étudiés, à savoir :

- La vitesse d'agitation
- La durée d'agitation
- La concentration en tensioactif

Deux plans d'expériences distincts seront réalisés, le premier utilisant comme mélangeur l'Ultra-Turrax® T25, le second utilisant le Silverson® LR4.

Le tableau VI-1 résume les paramètres de fabrication fixés, les paramètres qui seront étudiés ainsi que leurs limites de variation.

Tableau VI-1 : Paramètres de fabrication des MLS

Type de mélangeur	Phase dispersée (%) (p/p _{suspension})	Tensio-actif (%) (p/p _{suspension})		Vitesse d'agitation (tours/min.)	Durée d'agitation (min.)	
		Limite inf.	Limite sup.		Limite inf.	Limite sup.
Ultra-Turrax® T25	5	0,1	1	13500 ou 24000	1	10
Silverson® LR4	5	0,1	1	4500, 6200 ou 8900	1	10

VI.3.2.3 Réponse mesurée

La réponse mesurée est le pourcentage de MLS dont le diamètre géométrique est compris entre 0,5 et 6 μm . Cette mesure sera effectuée par diffractométrie laser à l'aide du module Scirrocco[®] 2000 du Mastersizer[®] 2000 (Malvern Instruments, Royaume-Uni). Chaque échantillon de MLS sera mesuré trois fois.

VI.3.2.4 Réalisation des plans d'expériences

En fonction des paramètres à étudier et de leurs limites de variation le logiciel Modde[®] 6.0 a déterminé les expériences à réaliser. Le plan d'expériences utilisant l'Ultra-Turrax[®] T25 (plan d'expériences n°1) est détaillé dans le Tableau VI-2 tandis que celui utilisant le Silverson[®] LR 4 (plan d'expériences n°2) est décrit dans le tableau VI-3. Chaque expérience sera réalisée deux fois (n=2).

**Tableau VI-2 : Plan d'expériences n°1 utilisant
l'Ultra-Turrax[®] T25**

N° expérience	N° ordre expérience	Concentration Lutrol [®] F68 (%) (p/p _{suspension})	Durée d'agitation (min. et s.)	Vitesse d'agitation (tours/minute)
1	13	0,1	1	24000
2	2	1	1	24000
3	14	0,1	10	24000
4	7	1	10	24000
5	15	0,55	5 min.30	24000
6	9	0,1	1	24000
7	5	1	1	13500
8	4	0,1	10	13500
9	16	1	10	13500
10	6	0,1	7	13500
11	8	1	4	13500
12	12	0,4	1	13500
13	11	0,7	10	13500
14	1	0,55	5 min.30	13500
15	10	0,55	5 min.30	13500
16	3	0,55	5 min.30	13500

**Tableau VI-3 : Plan d'expériences n° 2 utilisant
le Silverson® LR4**

N° expérience	N° ordre expérience	Concentration Lutrol® F68 (%) (p/p_{total})	Durée d'agitation (min. et s.)	Vitesse agitation (tours/minute)
1	17	0,1	1	4500
2	11	0,1	10	4500
3	16	1	10	4500
4	1	1	4	4500
5	14	0,7	1	4500
6	13	1	1	6200
7	5	0,1	7	6200
8	10	0,4	1	6200
9	4	0,7	10	6200
10	7	0,1	1	8900
11	6	1	1	8900
12	9	0,1	10	8900
13	15	1	10	8900
14	2	0,55	5 min.30	8900
15	8	0,55	5 min.30	8900
16	12	0,55	5 min.30	8900
17	3	0,55	5 min.30	8900

VI.3.3 Résultats

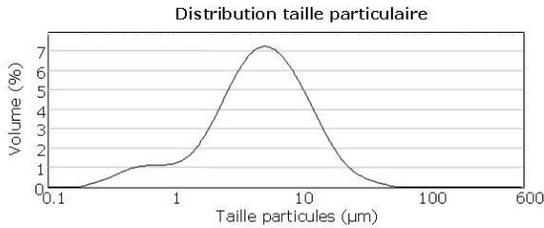
VI.3.3.1 Introduction

Le plan créé par le logiciel Modde® 6.0 est de type D-optimal et respecte le critère d'efficacité-G. Ce critère d'optimalité est utilisé par défaut par le logiciel Modde® et correspond à la valeur maximale de la variance de prédiction dans le domaine et est exprimée en pourcentage par rapport au meilleur plan possible suivant ce critère.

Les résultats expérimentaux obtenus sont résumés dans le tableau VI-4. Un exemple de distribution de taille fournie par le Mastersizer® 2000 lors d'une mesure de MLS est illustré à la figure VI-5.

Tableau VI-4 : Résultats expérimentaux des plans d'expériences 1 et 2

N° de l'expérience	MLS ayant un diamètre compris entre 0,5 et 6 µm (%)	
	Plan exp. n° 1	Plan exp. n° 2
1	64,59	40,47
2	27,63	51,48
3	35,73	42,06
4	10,70	42,91
5	19,06	34,98
6	65,82	39,32
7	33,69	41,45
8	33,28	46,07
9	16,81	19,45
10	36,57	58,82
11	29,40	14,59
12	43,66	65,03
13	21,00	15,34
14	19,08	12,83
15	23,50	13,03
16	19,95	15,95
17	-	14,12



Intervalle de taille (µm)	Volume (%)	Intervalle de taille (µm)	Volume (%)
0,010 - 0,5	3,06	6 - 10	21,55
0,5 - 6	55,52	10 - 100	19,87

Figure VI-5 : Exemple de mesure de MLS au Mastersizer® 2000

VI.3.3.2 Analyse statistique

La qualité du modèle fourni par l'analyse des données peut être estimée par deux grandeurs : R^2 et Q^2 .

- R^2 exprime le pourcentage de variabilité de la réponse expliqué par le modèle et est calculé au moyen de la formule suivante :

$$R^2 = \frac{SS_{\text{rég}}}{SS}$$

Où $SS_{\text{rég}}$ est la somme des carrés des écarts des prédictions à la moyenne (variance due au modèle),

SS est la somme des carrés des écarts à la moyenne (variance totale).

- Q^2 exprime le pourcentage de variabilité de la réponse qui peut être prédit par le modèle et est calculé au moyen de la formule suivante:

$$Q^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{SS}$$

Où PRESS représente la somme des carrés des écarts entre les valeurs observées et les valeurs prédites selon le modèle.

Les valeurs de R^2 et Q^2 sont habituellement comprises entre 0 et 1 et plus elles sont proches de 1, plus le modèle peut être considéré comme prédictif. Une valeur négative de Q^2 peut parfois se rencontrer dans le cas de modèles très peu prédictifs. En pratique, on considérera qu'une valeur positive de Q^2 permet de conclure à un modèle suffisamment prédictif (Modde 6.0 Software, 2001).

Les valeurs de R^2 et Q^2 obtenues pour les plans d'expérience 1 (utilisant l'Ultra-Turrax® T25) et 2 (utilisant le Silverson® LR4) sont présentées à la figure VI-6.

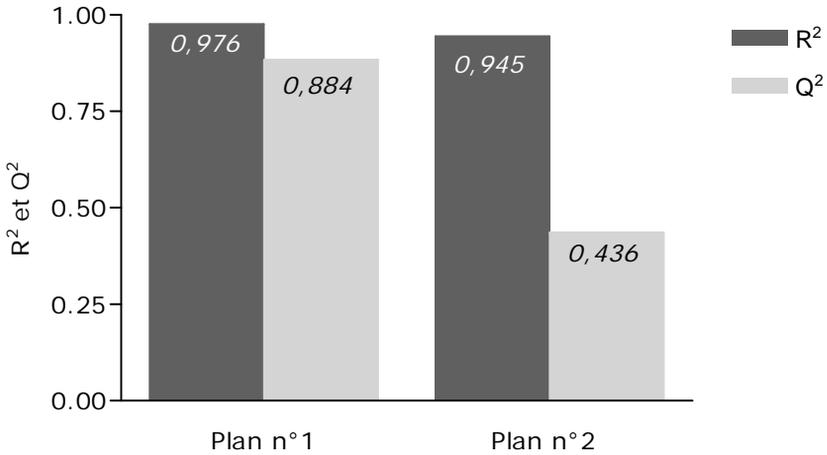


Figure VI-6 : Représentation des valeurs de R² et Q² pour les plans d'expériences 1 et 2.

Au vu de ces résultats, nous pouvons déduire que les modèles choisis expliquent en grande partie les variations observées. La qualité de prédiction du modèle est également bonne puisque dans les deux cas les valeurs de Q² sont positives.

VI.3.3.3 Estimation des effets principaux, des effets quadratiques et des interactions

VI.3.3.3.1 Plan d'expériences n°1 (Ultra-Turrax® T25)

La figure VI-7 représente les coefficients du modèle établi à partir de l'analyse des données du premier plan d'expériences, à un niveau de confiance de 90%. Ces coefficients sont considérés comme non significatifs quand ils sont englobés par l'intervalle de confiance.

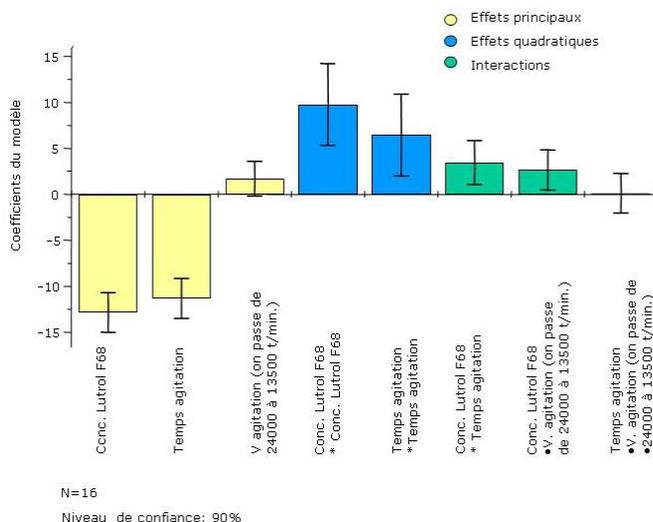


Figure VI-7 : Coefficients du modèle du plan d'expériences n° 1 (Ultra-Turrax® T25)

L'étude des effets principaux nous montre que :

- La concentration en Lutrol® F68 influence significativement la réponse, en l'occurrence le pourcentage de particules ayant un diamètre compris entre 0,5 et 6 μm : il diminue avec la concentration en Lutrol® F68 dans la zone de concentration comprise entre 0,1 et 1%.
- Le temps d'agitation influence significativement le pourcentage de particules de diamètre entre 0,5 et 6 μm : celui-ci diminue lorsque le temps d'agitation augmente entre 1 et 10 minutes.
- La vitesse d'agitation n'influence pas significativement le pourcentage de particules ayant un diamètre compris entre 0,5 et 6 μm . En fait celui-ci paraît augmenter légèrement quand la vitesse passe de 24000 à 13500 tours/minute mais cette augmentation n'est pas significative (au niveau de confiance 10%).

Deux effets quadratiques ont été observés. Ainsi, dans les limites étudiées, on peut dire que le pourcentage n'évolue pas de façon linéaire en fonction des deux paramètres suivants :

- La concentration en Lutrol® F68
- Le temps d'agitation

Deux effets d'interactions ont également été observés:

- Interaction entre la concentration en Lutrol® F68 et le temps d'agitation.
- Interaction entre la concentration en Lutrol® F68 et la vitesse d'agitation.

Ces interactions se traduiront par des torsions du plan représentant la réponse.

VI.3.3.3.2 Plan d'expériences n°2 (Silverson® LR4)

La figure VI-8 représente les coefficients du modèle établi à partir de l'analyse des données du second plan d'expériences, également à un niveau de confiance de 90%.

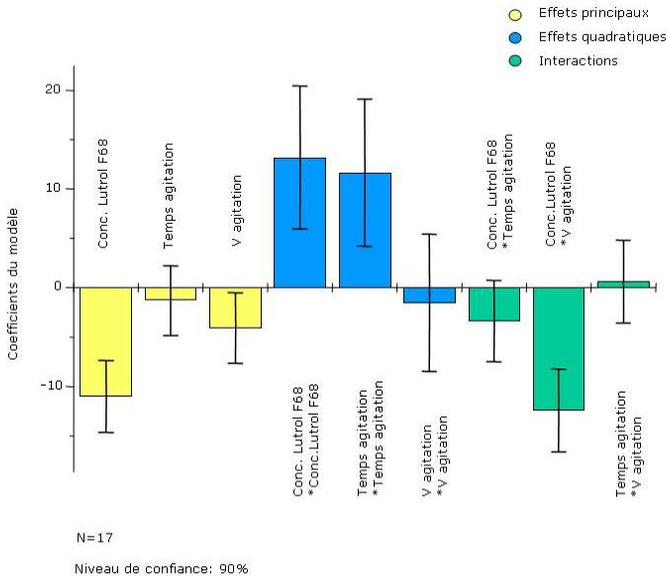


Figure VI-8 : Coefficients du modèle du plan d'expériences n° 2 (Silverson® LR4)

L'étude des effets principaux nous montre que:

- La concentration en Lutrol[®] F68 influence significativement la réponse, en l'occurrence le pourcentage de particules ayant un diamètre compris entre 0,5 et 6 μm : ce pourcentage diminue avec la concentration en Lutrol[®] F68 dans la zone de concentration entre 0,1 et 1%.
- Le temps d'agitation n'influence pas de façon significative le pourcentage de particules de diamètre entre 0,5 et 6 μm dans la zone du domaine expérimental.
- La vitesse d'agitation influence significativement le pourcentage de particules de diamètre entre 0,5 et 6 μm : il diminue légèrement quand on passe de 4500 à 6200 puis à 8900 tours/minute.

Deux effets quadratiques ont été observés. Ainsi, dans les limites étudiées, on peut dire que le pourcentage n'évolue pas de façon linéaire en fonction des deux paramètres suivants :

- La concentration en Lutrol[®] F68.
- Le temps d'agitation.

Un effet d'interaction a également été observé:

- Interaction entre la concentration en Lutrol[®] F68 et la vitesse d'agitation.

VI.3.3.4 Représentation des résultats

VI.3.3.4.1 Plan d'expériences n°1 (Ultra-Turrax[®] T25)

La réponse étudiée (à savoir le pourcentage de particules dont le diamètre est compris entre 0,5 et 6 μm) va être représentée en 3 dimensions sous forme d'une surface de réponse en fonction de la concentration en tensioactif et du temps d'agitation (Figure VI-9). Ce type de représentation ne permet de visualiser que deux paramètres (ainsi que la réponse choisie) simultanément. Il a donc fallu fixer un des facteurs étudiés. La vitesse d'agitation étant le seul facteur n'influençant pas

significativement la réponse, celle-ci a été arbitrairement fixée à 13500 tours/ minute.

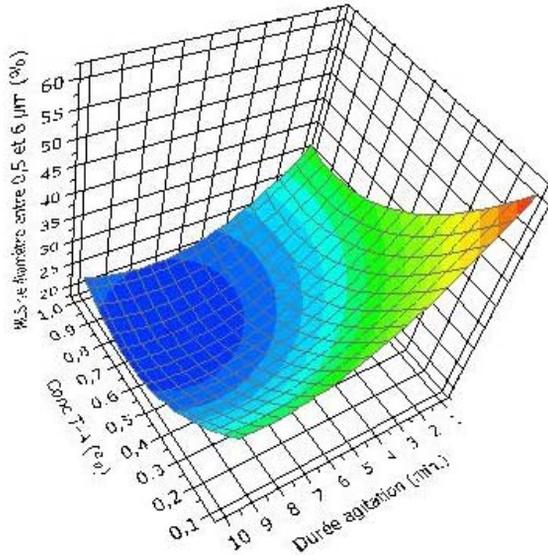


Figure VI-9 : Représentation de la surface de réponse du plan d'expériences n°1 (Ultra-Turrax® T25) pour une vitesse d'agitation fixée à 13500 t/min

VI.3.3.4.2 Plan d'expériences n°2 (Silverson® LR4)

La figure VI-10 représente la surface de réponse du second plan d'expériences en fonction de la concentration en tensioactif et de la vitesse d'agitation. Le temps d'agitation n'exerçant pas d'influence significative sur la réponse, a donc été fixé à une valeur intermédiaire de 5 minutes et 30 secondes.

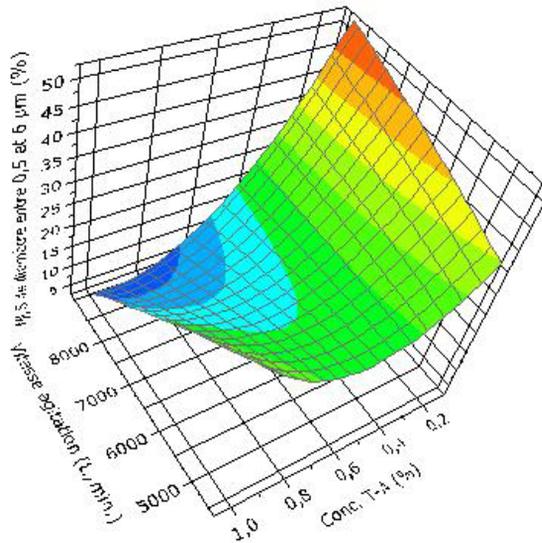


Figure VI-10 : Représentation de la surface de réponse du plan d'expériences n°2 (Silverson® LR4) pour une durée d'agitation fixée à 5 min. 30 s.

VI.3.3.5 Optimisation des paramètres de fabrication

Après traitement des résultats, le logiciel Modde® 6.0 a permis de déterminer les conditions optimales de fabrication des MLS. Celles-ci sont présentées dans le tableau VI-5 ainsi que le pourcentage optimal théorique correspondant de MLS dont le diamètre sera compris entre 0,5 et 6 µm.

Tableau VI-5 : Conditions optimales de fabrication des MLS et réponses optimales théoriques correspondantes

Appareillage utilisé	Concentration en Lutrol F68® (%)	Vitesse d'agitation (tours /min.)	Temps d'agitation (minutes)	MLS de diamètre compris entre 0,5 et 6 µm (%)
Ultra-Turrax® T25	0,1	24000	1	65,178
Silverson® LR4	0,1	8900	10	64,791

VI.3.3.5.1 Plan d'expériences n°1 (Ultra-Turrax® T25)

La prédiction des valeurs optimales nous donne des valeurs attendues pour la concentration en tensioactif et le temps d'agitation.

Par contre, la valeur optimale pour la vitesse d'agitation peut paraître en contradiction avec la conclusion quant à son effet principal sur le pourcentage de MLS dont le diamètre est compris entre 0,5 et 6 µm. En effet, pour rappel, on avait observé que le pourcentage de particules ayant un diamètre compris entre 0,5 et 6 µm semble augmenter légèrement quand la vitesse diminue de 24000 à 13500 tours/minute, mais toutefois de façon non significative.

Cette «apparente contradiction» entre la valeur de vitesse attendue et celle déterminée par le logiciel s'explique par l'interaction qui existe entre la vitesse d'agitation et la concentration en tensioactif, quand cette dernière est faible (Figure VI-11).

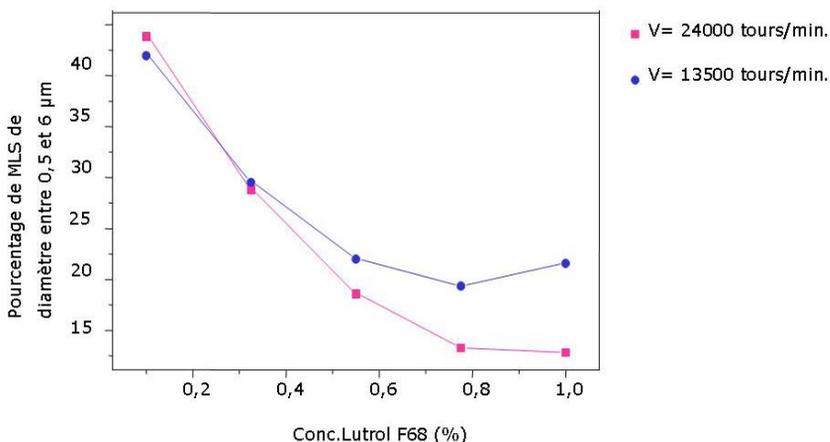


Figure VI-11 : Interaction entre la concentration en Lutrol® F68 et la vitesse d'agitation : Influence sur le pourcentage de MLS ayant un diamètre compris entre 0,5 et 6 µm

VI.3.3.5.2 Plan d'expériences n°2 (Silverson® LR4)

La prédiction des valeurs optimales nous donne des valeurs attendues pour la concentration en tensio-actif et le temps d'agitation.

Par contre, la valeur optimale pour la vitesse d'agitation est en contradiction avec la conclusion quant à son effet principal sur le pourcentage de MLS dont le diamètre est compris entre 0,5 et 6 µm. Pour rappel, on avait conclu que le pourcentage de MLS ayant un diamètre compris entre 0,5 et 6 µm diminue significativement quand la vitesse augmente.

Cette contradiction entre la valeur de vitesse attendue et celle fournie par le logiciel s'explique par l'effet d'interaction qui existe entre la vitesse d'agitation et la concentration en tensioactif (Figure VI-12).

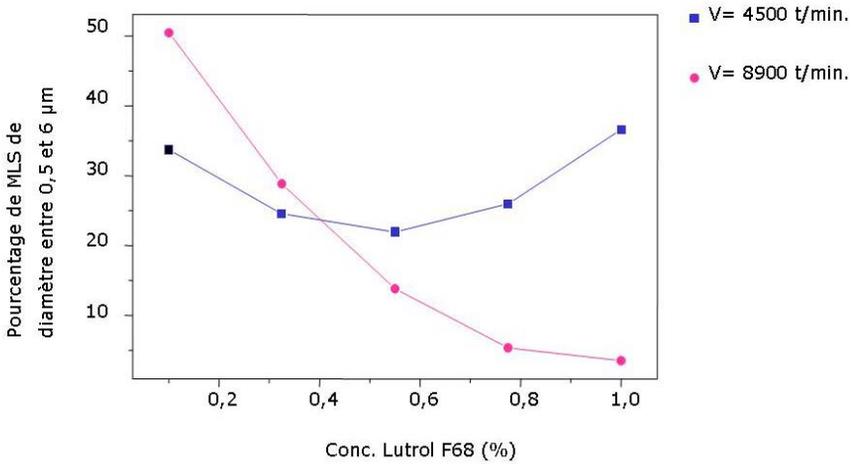


Figure VI-12: Interaction entre la concentration en Lutrol® F68 et la vitesse d'agitation : Influence sur le pourcentage de MLS ayant un diamètre compris entre 0,5 et 6 µm

VI.3.3.6 Répétitions expérimentales des conditions optimales théoriques de fabrication des MLS

Comme on peut le déduire au vu des figures VII-8 et VII-9, les conditions optimales de fabrication, c'est-à-dire celles permettant d'obtenir un pourcentage optimal de MLS possédant un diamètre compris entre 0,5 et 6 µm, ne paraissent pas extrêmement robustes. En effet, la zone de réponse correspondant aux conditions optimales n'est pas très étendue. Aux imprécisions opératoires près, on risque de passer dans une zone de réponse voisine.

Pour ces raisons, il nous a semblé d'autant plus important de réaliser des répétitions des conditions optimales théoriques de fabrication des MLS et de comparer les résultats expérimentaux avec les résultats théoriques calculés par le logiciel. Ainsi, trois suspensions ont été réalisées pour chacun des deux plans d'expériences en appliquant les conditions optimales théoriques. Les résultats expérimentaux correspondants sont présentés dans le tableau VI-6.

Tableau VI-6 : Répétitions des conditions optimales théoriques et réponses expérimentales correspondantes

MLS ayant un diamètre entre 0,5 et 6 µm (%)				
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Moyenne ± écart-type
Plan exp. 1 (Ultra-Turrax® T25)	60,38	61,35	66,32	62,68 ± 3,19
Plan exp. 2 (Silverson® LR4)	63,30	61,49	67,60	64,13 ± 3,14

VI.4. Conclusion

Une méthode de fabrication des MLS par homogénéisation à chaud suivie d'un mélange à haute vitesse de cisaillement a été mise au point. L'utilisation de la méthodologie des plans d'expériences a permis dans un premier temps la détermination théorique des paramètres de fabrication fournissant un pourcentage optimal de MLS d'un diamètre compris entre 0,5 et 6 µm. Ces paramètres ont ensuite été testés expérimentalement; les résultats obtenus se sont avérés être en corrélation avec les résultats théoriques attendus.

La répétition des conditions optimales théoriques a montré que le procédé de fabrication est reproductible même dans la zone de réponse correspondant aux conditions optimales et bien que cette zone ne soit pas très étendue.

VI.5. Références bibliographiques

Goupy J., 1996. Stratégie de recherche- Définition et objectifs. In: *La méthodologie des plans d'expériences*, chap.1, Paris, France, pp 1-8.

Jaspart S., Bodson C., Bertholet P., Chiap P., Delattre L., Evrard B., 2004a. Solid lipid microparticles for administration by inhalation: optimisation of manufacturing parameters. *Proceedings of the European conference on drug delivery and pharmaceutical technology, Sevilla, Spain*.

Jaspart S., Kirschvink N., Chiap P., Delattre L., Crommen J., Gustin P., Evrard B., 2004b. Solid lipid microparticles for administration by inhalation: optimisation of manufacturing parameters and preliminary tolerance study. *Proceedings 12th Forum of Pharmaceutical Sciences, Blankenberge, Belgium*.

Lanteri P., Longerey R., 1996. Chimie-métrie: le mariage réussi entre les sciences analytiques et l'informatique. *Analisis Magazine* 24, M17-M27.

Modde 6.0 Software, 2001. Manuel d'utilisation en ligne, Umetrics, Suède.

Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition, 2005. Conseil de l'Europe. Strasbourg.

Servais AC., 2004. Séparation et dosage de substances médicamenteuses par électrophorèse capillaire en milieu non aqueux: Influence de l'utilisation simultanée d'une cyclodextrine et d'un agent d'appariement d'ions. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sc. Pharmaceutiques, Université de Liège, Belgique.

Chapitre VII:

Essais de tolérance in vivo des MLS au niveau pulmonaire

VII.1. Présentation des essais réalisés

VII.1.1 Introduction

Les essais suivants ont été réalisés par le laboratoire de pharmacologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège selon un protocole approuvé par le comité d'éthique animale de cette même université.

Ces essais ont pour but de tester la tolérance des MLS vierges au niveau du tractus respiratoire. Comme décrit à la page 84, les MLS sont généralement supposées être biocompatibles, étant donné que les lipides qui les constituent sont proches des lipides physiologiques. Toutefois, il nous a semblé intéressant de tester la tolérance des MLS *in vivo*, notamment au vu de la présence d'un tensioactif (bien que présent en concentration relativement peu importante) dans ces MLS.

VII.1.2 Préparation des échantillons de MLS

VII.1.2.1 Matériel

Le Compritol® 888 ATO, le Lutrol® F68 et l'eau utilisés pour la fabrication des MLS vierges sont ceux décrits aux pages 107 et 108.

VII.1.2.2 Méthodes

Les suspensions de MLS vierges sont fabriquées selon la technique de l'homogénéisation à chaud suivie d'un mélange à haute vitesse de cisaillement décrite aux pages 108 à 111 et sont composées de 5% de Compritol® 888 ATO, de 0,4% de Lutrol® F68 et d'eau.

Les MLS sont obtenues sous forme sèche par lyophilisation puis sont redispersées dans du PBS stérile (Phosphate Buffer Saline- Tampon phosphate pH 7,4 isotonique) (Biowhittaker-Cambrex, Belgique) en présence de 2% de Lutrol® F68.

Les suspensions de MLS obtenues ont été stérilisées par autoclavage à 121°C, sous 1 bar pendant 20 minutes (Sanna et al., 2003). La taille des MLS a été mesurée avant et après stérilisation et il s'avère que la stérilisation par autoclavage en présence d'un tensioactif (Lutrol® F68) n'affecte pas la taille des particules de façon significative, comme cela a été démontré pour les nanoparticules lipidiques solides (NLS) (Cavalli et al., 1997; Heiati et al., 1998; Sanna et al., 2003). En effet, bien que les particules lipidiques fondent à cette température, reformant ainsi une microémulsion huile dans eau, il a été démontré que, lors du refroidissement, les microgouttelettes des émulsions reforment des microparticules et que le tensioactif en solution empêche la coalescence des particules (Cavalli et al., 1997). Notons néanmoins que dans le cas où un principe actif est incorporé dans les particules lipidiques, il convient de vérifier au préalable la stabilité de celui-ci à la température de l'autoclavage (Heiati et al., 1998).

VII.1.3 Description du protocole

VII.1.3.1 Essais de tolérance aiguë (24, 48 et 72h)

Les essais ont été effectués sur 54 rats de type Sprague Dawley : 18 d'entre eux (rats contrôles) ont reçu un placebo en l'occurrence 100 µl de PBS, par instillation intra-trachéale à l'aide d'un cathéter d'un diamètre

interne de 0,5 mm introduit via la cavité buccale et le larynx, et ce après anesthésie (xylazine 5 mg/kg + kétamine 50 mg/kg en injection intrapéritonéale).

Les autres rats ont reçu 100 µl d'une suspension à 0,5 % en MLS d'une part (n=18) et à 2,5 % en MLS d'autre part (n=18) dans du PBS, et ce, également par instillation intra-trachéale.

Les rats sont ensuite sacrifiés par injection mortelle de phénobarbital, 24 (T24), 48 (T48) ou 72 (T72) heures après l'instillation.

Les poumons sont ensuite extraits de la cage thoracique en vue d'effectuer un lavage bronchoalvéolaire (LBA). Pour ce faire, on instille 15 ml de solution stérile à 0,9 % en NaCl dans le lobe gauche ainsi que dans le droit, puis on aspire ce liquide lentement.

Le liquide recueilli (liquide broncho-alvéolaire) fait l'objet d'une analyse cytologique. Le nombre total de cellules (neutrophiles polymorphonucléaires, éosinophiles polymorphonucléaires, lymphocytes et macrophages) est déterminé dans les 6 heures qui suivent la récolte du liquide broncho-alvéolaire.

VII.1.3.2 Essais de tolérance chronique (2 et 4 semaines)

La même expérience a été réalisée sur 3 groupes de 12 rats. Le premier groupe a reçu une solution placebo, le second 100 µl d'une suspension à 0,5% en MLS et le dernier 100 µl d'une suspension à 2,5% en MLS à raison de deux fois par semaine. Au sein de chaque groupe 6 rats ont été sacrifiés après 2 semaines tandis que les 6 autres l'ont été au bout de 4 semaines.

VII.2. Résultats

Les résultats de l'analyse cytologique du LBA ont fait l'objet d'une analyse de variance à deux critères dans le but de déterminer si d'une part, l'administration de MLS à deux concentrations distinctes et d'autre

part, la durée sur laquelle s'étalent les administrations, influencent significativement le nombre de cellules totales, le pourcentage en macrophages, en lymphocytes, en neutrophiles et en éosinophiles.

Tout d'abord, tant pour les essais de tolérances aiguë que chronique, aucun éosinophile n'a été observé, tandis qu'à peine quelques lymphocytes ont été observés de façon sporadique et aléatoire. Les pourcentages respectifs de ces deux types de cellules ne sont donc pas repris dans les tableaux des résultats.

VII.2.1.1 Essais de tolérance aiguë (24, 48 et 72h)

Les figures suivantes représentent le comptage des cellules totales issues du lavage broncho-alvéolaire (Figure VII-1), le pourcentage de macrophages (Figure VII-2) et le pourcentage de neutrophiles (Figure VII-3) chez le rat, 24, 48 ou 72 heures après l'instillation intra-trachéale de 100 µl de PBS (groupe placebo), ou de 100 µl d'une suspension à 0,5 ou 2,5% en MLS. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type. Pour chaque groupe testé, c'est-à-dire pour un temps donné et un type de solution (placebo) ou de suspension (à 0,5 ou 2,5 % en MLS) donné, n = 6.

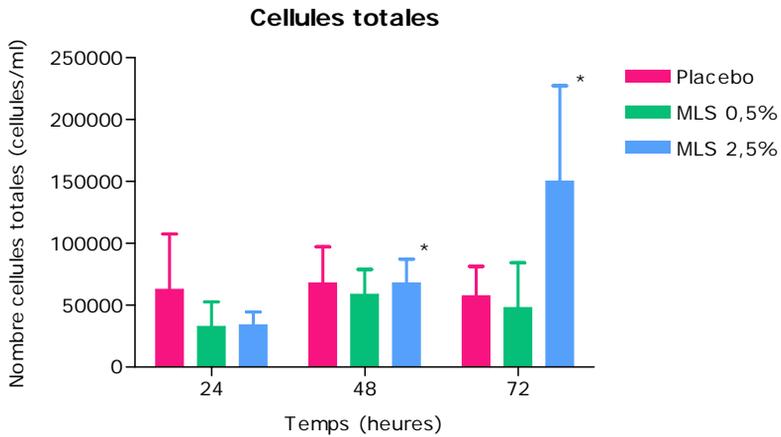


Figure VII-1 : Comptage des cellules totales (cellules/ml) issues du LBA- Essais de tolérance aiguë

* Valeurs significativement différentes de la valeur correspondant au temps T24, $p < 0,05$

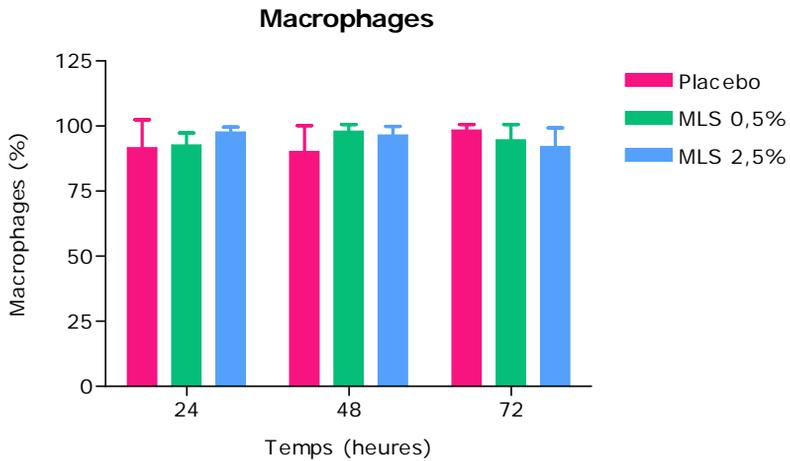


Figure VII-2 : Pourcentage de macrophages dans le LBA- Essais de tolérance aiguë

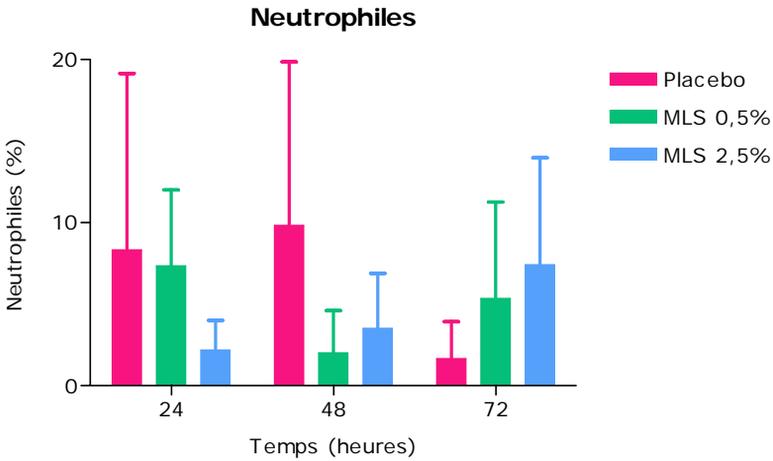


Figure VII-3 : Pourcentage de neutrophiles dans le LBA- Essais de tolérance aiguë

Les résultats évalués tant en terme du nombre de cellules totales qu'en terme de pourcentages de cellules différenciées (macrophages et neutrophiles) ne diffèrent pas significativement entre les groupes. Les seules différences significatives observées se situent au niveau du comptage des cellules totales du groupe de rats ayant reçu une suspension à 2,5% en MLS (Figure VII-1) : en effet, le nombre de cellules totales diffère selon le temps écoulé (24, 48 ou 72 heures) entre l'instillation et le sacrifice des rats. Ces valeurs ne sont toutefois pas significativement différentes de celles des groupes placebo correspondants, étant donné que l'écart-type des observations faites après 72 heures pour le groupe ayant reçu une suspension à 2,5% en MLS est relativement important (Sanna et al., 2003) (Figure VII-1).

VII.2.1.2 Essais de tolérance chronique (2 et 4 semaines)

Les figures suivantes représentent le comptage des cellules totales issues du lavage broncho-alvéolaire (Figure VII-4), le pourcentage de macrophages (Figure VII-5) et le pourcentage de neutrophiles (Figure VII-6) chez le rat, après une instillation intra-trachéale de 100 µl de PBS (groupe placebo), ou de 100 µl d'une suspension à 0,5 ou 2,5% en MLS pendant 2 ou 4 semaines à raison de 2 administrations par semaine. Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type. Pour chaque groupe testé, c'est-à-dire pour un temps donné et un type de solution (placebo) ou de suspension (à 0,5 ou 2,5 % en MLS) donné, n = 6.

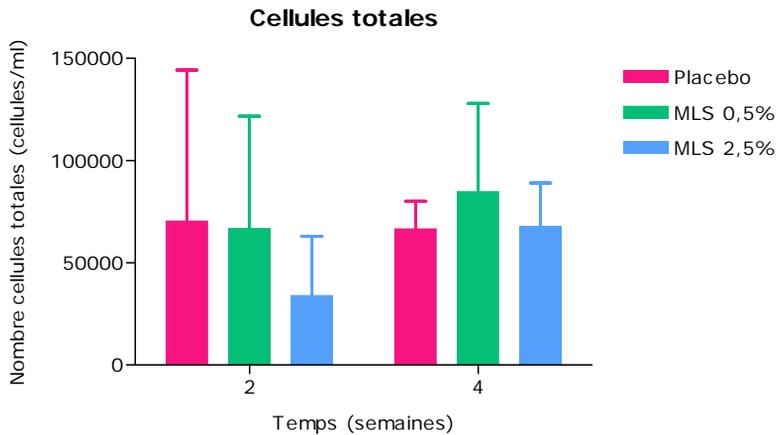


Figure VII-4 : Comptage des cellules totales (cellules/ml) issues du LBA- Essais de tolérance chronique

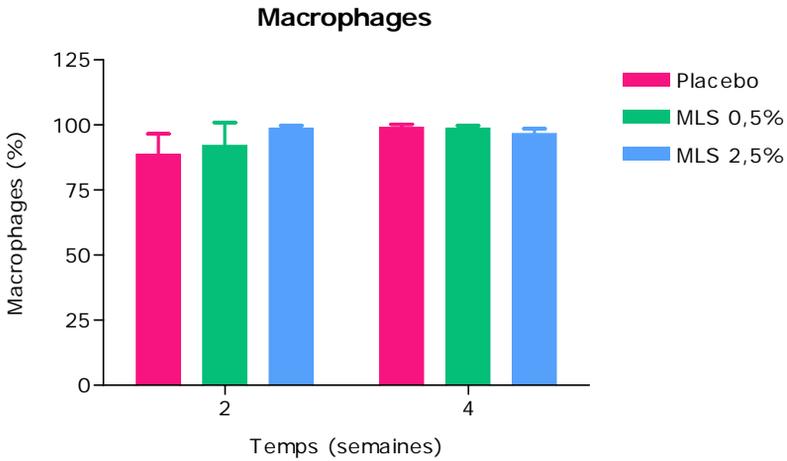


Figure VII-5 : Pourcentage de macrophages dans le LBA- Essais de tolérance chronique

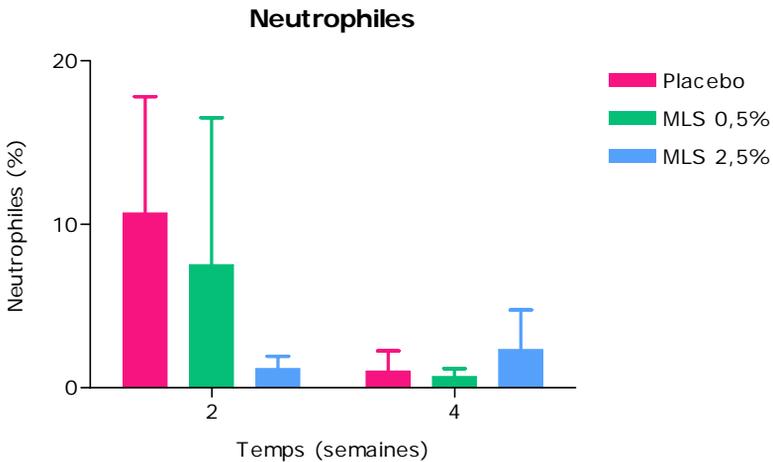


Figure VII-6 : Pourcentage de neutrophiles dans le LBA- Essais de tolérance chronique

Aucune augmentation significative du nombre de cellules totales et du pourcentage de cellules différenciées n'a pu être mise en évidence lorsque la concentration en MLS administrée augmente et/ou que la période d'administration est prolongée.

VII.3. Conclusion

Les résultats obtenus *in vivo* lors de cette étude préliminaire de la tolérance des MLS nous permettent de conclure que, chez le rat, les concentrations en MLS testées n'induisent pas de réponse inflammatoire aiguë ni chronique (c'est-à-dire au bout de 4 semaines à raison de 2 administrations par semaine) au niveau des voies aériennes. Ainsi, comme le laissait supposer leur composition, les MLS semblent biocompatibles pour l'administration au niveau du tractus respiratoire.

VII.4. Références bibliographiques

Cavalli R., Caputo O., Carlotti M.E., Trotta M., Scarnecchia C., Gasco M.R., 1997. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of pharmaceutics*. 148, 47-54.

Heiati H., Tawashi R., Phillips N.C., 1998. Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization. *J.Microencapsul*. 15 (2), 173-184.

Sanna V., Kirschvink N., Gustin P., Gavini E., Roland I., Delattre L., Evrard B., 2003. Preparation and in vivo toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration. *AAPS PharmSciTech* 5 (2), Article 27.

Chapitre VIII:

Synthèse et caractérisation de l'acétonide de salbutamol

VIII.1. Introduction

Le but ce travail de recherche est d'incorporer une molécule à action agoniste β_2 -adrénergique dans des microparticules lipidiques solides afin de prolonger sa libération et dès lors d'augmenter sa durée d'action. Or, comme décrit à la page 72, il est préférable de disposer d'une molécule suffisamment lipophile afin que celle-ci s'incorpore de façon efficace dans les MLS.

En effet les essais d'incorporation du salbutamol dans des MLS ont montré lors de dosage du salbutamol dans la phase aqueuse des suspensions de MLS, que le partage était en faveur de la phase aqueuse et que la charge en salbutamol était faible dans les MLS.

Or, actuellement, toutes les molécules β_2 -mimétiques disponibles sur le marché et non soumises à un brevet sont relativement hydrophiles. C'est la raison pour laquelle, nous avons choisi de synthétiser un dérivé lipophile d'une molécule β_2 -mimétique, à savoir le salbutamol.

La synthèse de différents dérivés du salbutamol a initialement été envisagée, à savoir :

- Laurylsulfate de salbutamol : Le rendement de cette synthèse s'est révélé intéressant. Toutefois, ce composé n'a finalement pas été retenu car, étant donné que le laurylsulfate est un composé assez

irritant, il est probable qu'il en soit de même pour le laurylsulfate de salbutamol

- Monoester isobutyrique de salbutamol : Ce dérivé ester du salbutamol aurait pu se révéler intéressant, cependant, il n'a pas été retenu car sa synthèse est particulièrement laborieuse et présente des rendements très faibles.
- Acétonide de salbutamol : La forme « acétonide » nous a été inspirée par d'autres molécules telles la fluocinolone et la triamcinolone (corticostéroïdes) qui se présentent la plupart du temps sous cette forme « acétonide ». En effet, les coefficients de partage théoriques calculés par le logiciel CS Chem draw[®] Pro version 4.5 (Voir page 143) montrent une augmentation de la lipophilie pour la forme « acétonide » comparativement à la molécule de départ (ex. : Log P fluocinolone = 0,5 et Log P acétonide de fluocinolone = 2,39).

Notons également que la synthèse de l'acétonide de salbutamol (AS) présente des rendements intéressants (Voir page 141).

Pour ces raisons, l'AS sera le dérivé lipophile du salbutamol choisi pour la suite de ce travail.

VIII.2. Synthèse de l'acétonide de salbutamol

VIII.2.1 Matériel

Le principal réactif utilisé pour la synthèse de l'acétonide de salbutamol est le salbutamol base qui provient de chez Cambrex Profarmaco (Italie). Les solvants utilisés sont de qualité CLHP et tous les autres réactifs sont de qualité analytique.

VIII.2.2 Méthodes

La synthèse de l'AS a été réalisée en collaboration avec le service de Chimie Pharmaceutique du Département de Pharmacie de l'Université de

Liège, selon une méthode décrite par Caira (Caira et al., 1999) (Figure VIII-1).

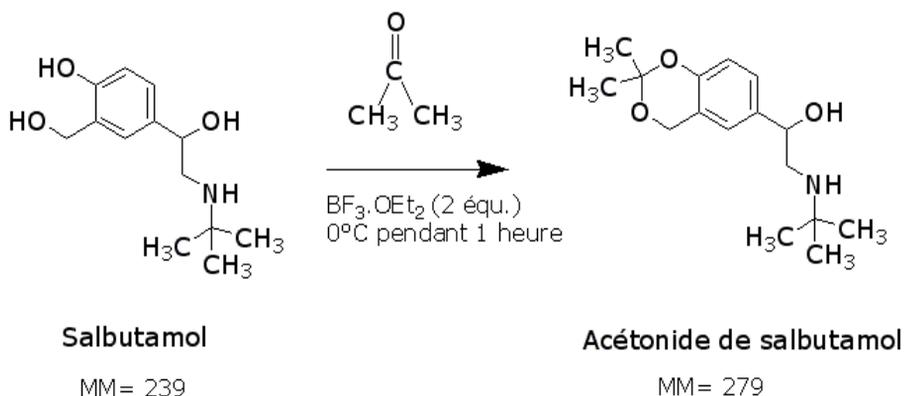


Figure VIII-1 : Synthèse de l'acétonide de salbutamol

Le BF₃ ou trifluorure de bore (gaz stabilisé sous forme de BF₃·OEt₂ par complexation avec l'éther diéthylique) est un acide de Lewis utilisé comme catalyseur de la réaction de condensation d'une molécule d'acétone au niveau de deux hydroxyles du salbutamol. L'AS obtenu est un dérivé acétal cyclique du salbutamol. Cette synthèse offre des rendements intéressants, proches de 85%. L'AS se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche.

A noter que cette synthèse a été réalisée dans un premier temps à partir de 10 mmoles de salbutamol ce qui nous a permis d'obtenir ± 8,5 mmoles d'AS. Dans un second temps, la synthèse a été adaptée et mise à l'échelle (« scaling up ») de façon à obtenir en une journée de manipulation des quantités d'AS relativement importantes (± 180 mmoles d'AS, c.-à-d. ± 50g d'AS) tout en conservant le même rendement.

VIII.3. Caractérisation de l'AS et développement de méthodes de dosage

L'AS synthétisé étant une molécule originale, la détermination de ses caractéristiques physico-chimiques a été nécessaire en vue de mettre au point les méthodes analytiques mais également en vue d'orienter le développement galénique faisant l'objet de ce travail de recherche. Les résidus de solvant issus de la synthèse de l'AS ont été déterminés, la lipophilie de l'AS a été évaluée, deux méthodes de dosage par CLHP ont été mises au point et validées (l'une pour le dosage de l'AS seul, l'autre pour le dosage simultané de l'AS et du salbutamol) et la stabilité de l'AS a été étudiée notamment dans les conditions opératoires utilisées au cours du développement galénique.

VIII.3.1 Matériel

L'AS qui sera utilisé tout au long de ce travail a été synthétisé en collaboration avec le laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Liège. Son analyse élémentaire s'est révélée conforme, les valeurs obtenues ne différant pas de plus de 0,5% par rapport aux valeurs théoriques.

Tous les solvants utilisés sont de qualité CLHP et les réactifs sont de qualité pour analyse.

VIII.3.2 Méthodes

VIII.3.2.1 Etude des résidus de solvant par chromatographie gazeuse

La méthode utilisée est celle dite d'identification et de contrôle des solvants résiduels recommandée par la Pharmacopée Européenne (Pharmacopée Européenne, 2005). L'appareillage utilisé est la

chromatographie gazeuse à espace de tête HP® 6890 (Hewlett Packard, USA).

VIII.3.2.2 Analyse thermique par DSC

Le point de fusion de l'AS a été déterminé par analyse thermique différentielle (DSC). Le thermogramme d'un échantillon de 10 mg a été enregistré entre 35 et 190°C à une vitesse de 10°C/min sous un flux d'azote de 20 ml/min, à l'aide d'un appareil Mettler-Toledo® DSC25-TC15 TA Controller, contrôlé par le logiciel STAR® System v 6.1 SW développé par Mettler-Toledo (Greifensee, Suisse).

VIII.3.2.3 Détermination du spectre UV/visible

L'enregistrement du spectre UV/visible d'une solution méthanolique d'AS à 100 µg/ml a été réalisé au moyen d'un spectrophotomètre Hitachi® U-300, piloté par le logiciel UV solutions, v 1.2, Build 20 et comparé au spectre d'une solution méthanolique de salbutamol à la même concentration. L'analyse a été effectuée entre 200 et 600 nm, à raison de 5 nm par seconde.

VIII.3.2.4 Evaluation de la lipophilie de l'AS

Tout d'abord, la lipophilie de l'AS a été évaluée à partir de la structure chimique de l'AS à l'aide du logiciel CS Chem draw® Pro version 4.5.

La lipophilie est caractérisée par une valeur de coefficient de partage. Celui-ci est généralement exprimé en Log P qui représente l'équilibre entre une phase polaire (aqueuse) et une phase non polaire (n-octanol), et où

$$P = \frac{[PA]_{org}}{[PA]_{aq}}$$

Ce logiciel a également permis de comparer le Log P de l'AS avec ceux du salbutamol mais aussi du salmétérol et du formotérol.

En ce qui concerne l'incorporation d'une molécule dans les MLS, comme décrit à la page 81, si la technique de production nécessite l'utilisation d'une phase externe aqueuse (et c'est le cas pour la technique de production utilisée), la solubilité de la molécule dans l'excipient lipidique influencera la charge et l'efficacité d'incorporation de cette molécule dans les MLS (Reithmeier et al., 1998; Reithmeier et al., 2001).

Il était donc important de déterminer expérimentalement le coefficient de partage de l'AS entre l'excipient lipidique (le Compritol® 888 ATO) et l'eau. Pour cela, une quantité de 40 mg d'AS est placée dans un tube en verre contenant 4g de Compritol® 888 ATO et 4g d'eau. Les tubes sont portés pendant 30 minutes sous agitation constante à 80°C, de façon à assurer la fusion de la phase lipidique. Après refroidissement à température ambiante, on centrifuge afin de pouvoir récolter un aliquot de la phase aqueuse, dans lequel l'AS sera dosé par la méthode CLHP décrite aux pages 144 et 145. La même manipulation sera réalisée avec le salbutamol afin de comparer les coefficients de partage de l'AS et du salbutamol entre le Compritol® 888 ATO et l'eau. Trois répétitions de cette mesure seront réalisées pour chacune de deux molécules testées.

VIII.3.2.5 Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'AS

Une méthode de dosage de l'AS par chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec détection UV/visible a été développée et validée. La méthode mise au point est dérivée de celle proposée par la Pharmacopée Européenne pour le dosage du salbutamol (Pharmacopée Européenne, 2005).

VIII.3.2.5.1 Appareillage

Le système chromatographique utilisé se compose de:

- Une pompe Merck-Hitachi® modèle L-7100
- Un échantillonneur Merck-Hitachi® modèle L-7200

- Un four Merck-Hitachi® modèle L-7350
- Un détecteur Merck-Hitachi® UV/visible L-7400
- Une interface Merck-Hitachi® D-7000, l'ensemble étant piloté par un logiciel d'acquisition de données « Chromatography Data Station Software » fourni par Merck - Hitachi

VIII.3.2.5.2 Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques utilisées sont les suivantes :

- Colonne : Lichrocart (125 x 4 mm d.i.)
- Phase stationnaire : octylsilane C8 LiChrospher® 60 RP-Select B (5µm) provenant de chez Merck
- Phase mobile : acétonitrile/ tampon phosphate pH=3,65 (0,018 M KH₂PO₄ et 0,008 M acide hexane sulfonique) (65 :35)
- Débit : 1 ml/min
- Température de travail : 30 °C
- Volume d'injection : 20 µl
- Longueur d'onde de détection : 220 nm

L'acétonide de salbutamol étant plus lipophile que le salbutamol, la composition de la phase mobile a été adaptée à partir de la méthode de dosage du salbutamol par CLHP décrite dans la Pharmacopée Européenne (Pharmacopée Européenne, 2005). Ainsi, la concentration en contre-ion a été réduite et la proportion de modificateur organique (acétonitrile) a été augmentée dans la phase mobile afin de réduire le temps de rétention, et d'affiner le pic.

VIII.3.2.5.3 Préparation des solutions témoins de référence

Une solution mère est réalisée par la pesée exacte d'environ 25 mg d'AS qui est transférée quantitativement avec de l'eau dans un ballon jaugé de 250 ml. On amène au volume avec le même solvant. Cette solution est diluée dans l'eau de manière à obtenir des solutions aux concentrations finales de 0,5 - 2- 5- 10 et 20 µg/ml en AS.

VIII.3.2.5.4 Validation de la méthode de dosage de l'AS par CLHP

Cette méthode a été validée selon la stratégie proposée par la Commission de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) pour la validation des méthodes analytiques (Caporal-Gautier et al., 1992). Les différents critères de validation sont la linéarité, la fidélité et l'exactitude de la méthode.

VIII.3.2.6 Mise au point et validation d'une méthode de dosage du salbutamol et de l'AS simultanément

Lors de différentes manipulations, il s'est avéré que le principal produit de dégradation de l'AS était le salbutamol, il a dès lors fallu également mettre au point une méthode de dosage par CLHP permettant le dosage simultané du salbutamol et de l'AS.

L'appareillage utilisé est le même que celui décrit au paragraphe précédent. Les conditions chromatographiques sont semblables à l'exception de la phase mobile qui est composée d'un mélange acétonitrile-tampon phosphate pH=3,65 (0,018 M KH_2PO_4 et 0,008 M acide hexane sulfonique) (78/22).

Les solutions témoins de référence ont été réalisées de la même façon que celles décrites au paragraphe précédent.

VIII.3.2.7 Etude de stabilité de l'AS dans les conditions opératoires et identification du (des) produit(s) de dégradation par spectrométrie de masse

Il est important de s'assurer de la stabilité de l'AS au cours de toutes les étapes du développement de la forme galénique ainsi que lors des étapes analytiques. Ainsi la stabilité de l'AS a été testée dans les conditions suivantes :

- Eau à température ambiante pendant 12 heures

- Phase mobile pour le dosage AS/Salbutamol décrite à la page 146, à température ambiante pendant 12 heures
- Eau/ Acétonitrile (78/22) à température ambiante pendant 12 heures
- Tampon phosphate pH 2 à 37°C pendant 12 heures
- Tampon phosphate pH 4 à 37°C pendant 12 heures
- Tampon phosphate pH 6 à 37°C pendant 12 heures
- Solution de Krebs-Henseleit à 37°C pendant 12 heures
- Miglyol® 812 à 90°C pendant 60 minutes

La composition des tampons phosphates utilisés est décrite dans la Pharmacopée Européenne (Pharmacopée Européenne, 2005).

La solution de Krebs-Henseleit à 37°C est la solution qui sera utilisée pour l'évaluation de l'activité pharmacologique (bronchodilatatrice) de l'AS sur bronches isolées (Voir pages 168 et 169). Sa composition pour un litre de solution est la suivante:

- NaCl: 6,925 g
- KCl: 0,353 g
- CaCl₂. 6H₂O: 0,186 g
- K₂HPO₄: 0,161 g
- MgSO₄. 7H₂O: 0,525 g
- NaHCO₃: 2,1 g
- Glucose: 1 g

On amène à 1 litre avec de l'eau distillée.

Le Miglyol® 812, un liquide huileux constitué d'un mélange de triglycérides d'acides gras saturés à chaînes de longueur moyenne (Pharmacopée Européenne, 2005) a été choisi dans le but de simuler les conditions opératoires de fabrication des MLS chargées en AS, c.-à-d. le chauffage à 90°C d'un excipient lipidique avec l'AS.

Dans les cas où une dégradation est observée, une analyse par spectrométrie de masse est effectuée afin de vérifier si le produit de dégradation est bien, comme on le suppose, le salbutamol. L'appareil utilisé est un spectromètre de masse Micromass® Ultima Quadrupole (Manchester, Angleterre) contrôlé par un ordinateur utilisant le logiciel

d'acquisition de données Masslynx[®] version 3.5. Les conditions de la source sont : configuration Z-spray, électrospray ion positif, tension du capillaire de 3 kV, température de la source égale à 145°C, température de désolvatation à 450°C, débit de gaz (N₂) au niveau du cône à 94 L/h, débit du gaz de désolvatation (N₂) de 552 L/h.

VIII.3.3 Résultats

VIII.3.3.1 Etude des résidus de solvant par chromatographie gazeuse

Les deux solvants utilisés pour la synthèse de l'AS sont l'acétone et l'acétate d'éthyle (Caira et al., 1999). L'étude des résidus de solvant par chromatographie gazeuse a donné les résultats suivants (Figure VIII-2) :

- Acétone : Teneur résiduelle d'environ 1000 ppm en acétone. Or, la quantité maximale acceptable est de 5000 ppm (Pharmacopée Européenne, 2005).
- Acétate d'éthyle : Aucun pic d'acétate d'éthyle n'apparaît sur le chromatogramme. L'échantillon testé ne contient donc pas de résidus d'acétate d'éthyle décelables par la technique utilisée.

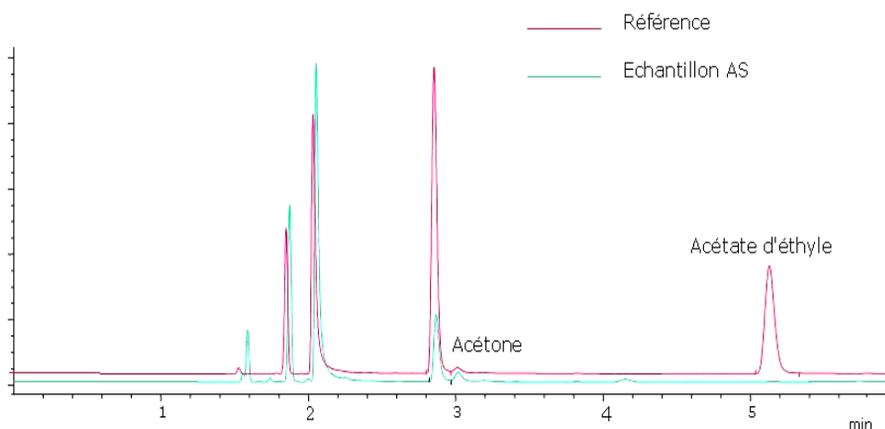


Figure VIII-2 : Chromatogrammes en phase gazeuse pour l'étude des résidus de solvant dans l'AS

L'AS obtenu est donc conforme aux exigences de la Pharmacopée Européenne en ce qui concerne les résidus de solvants

VIII.3.3.2 Analyse thermique par DSC

Le thermogramme de l'AS est repris à la figure VIII-3. On peut observer que l'AS présente un endotherme de fusion à 97°C, sans dégradation. La présence d'un seul pic de fusion indique que l'AS ne présente pas de phénomène de polymorphisme.

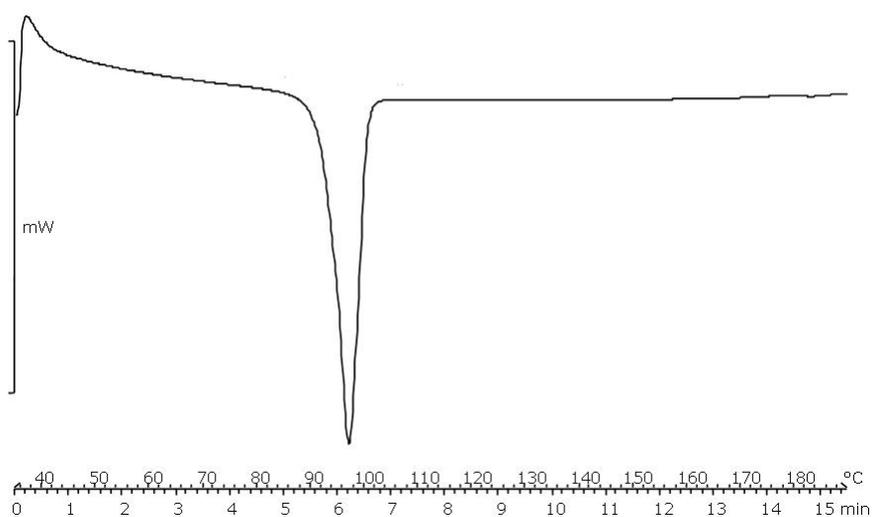


Figure VIII-3 : Thermogramme d'un échantillon de 10 mg d'AS

VIII.3.3.3 Détermination du spectre UV/visible

Les spectres UV/visible de l'AS et du salbutamol sont représentés à la figure VIII-4. Comme on s'y attendait au vu de leurs structures chimiques très proches et qui ne diffèrent pas au niveau des doubles liaisons conjuguées, l'AS et le salbutamol présentent des spectres UV superposables (Figure VIII-4). Lors du développement d'une méthode de dosage de l'AS par CLHP avec détection UV/visible, la longueur d'onde choisie sera donc la même que celle préconisée par la Pharmacopée

Européenne pour le dosage du salbutamol , c.-à-d. 220 nm (Pharmacopée Européenne, 2005).

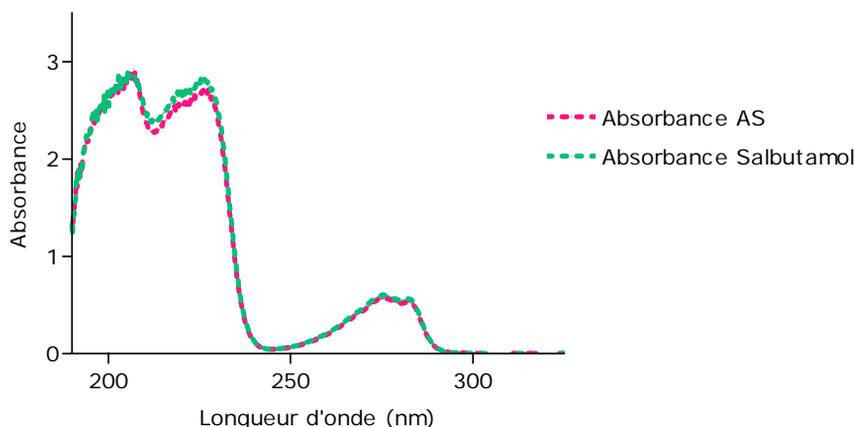


Figure VIII-4 : Spectres d'absorption dans l'UV/visible d'une solution méthanolique d'AS et d'une de salbutamol à 100 µg/ml

VIII.3.3.4 Evaluation de la lipophilie de l'AS

VIII.3.3.4.1 Détermination théorique du Log P

Les valeurs de Log P de l'AS et de différentes molécules agonistes β_2 -adrénergiques déterminées par le logiciel CS Chem draw[®] Pro version 4.5 sont les suivantes :

- Log P Acétonide de salbutamol = 1,82
- Log P Salbutamol = 0,06
- Log P Formotérol = 1,26
- Log P Salmétérol = 2,90

L'AS est donc comme prévu plus lipophile que le salbutamol et possède une lipophilie intermédiaire entre celles du formotérol et du salmétérol.

VIII.3.3.4.2 Détermination expérimentale du P et du Log P

Les coefficients de partage P_{exp} entre le Compritol[®] 888 ATO et l'eau obtenus pour l'AS et le salbutamol et les valeurs logarithmiques correspondantes sont présentés dans le tableau VIII-1. Ces résultats

montrent que l'AS est plus beaucoup plus soluble dans l'excipient lipidique que dans l'eau, et que son affinité pour l'excipient lipidique en présence d'eau est supérieure à celle du salbutamol.

Tableau VIII-1 : P_{exp} et $\text{Log } P_{exp}$ entre le Compritol® 888 ATO et l'eau obtenus pour l'AS et le salbutamol

	$P_{exp} \pm \text{Ecart-type (n=3)}$	$\text{Log } P_{exp}$
Acétonide de salbutamol	$46,88 \pm 0,87$	1,67
Salbutamol	$4,40 \pm 0,15$	0,64

VIII.3.3.5 Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'AS

VIII.3.3.5.1 Mise au point

La méthode CLHP pour le dosage de l'AS mise au point à partir de la méthode de dosage CLHP du salbutamol de la Pharmacopée Européenne est décrite aux pages 144 à 146. Elle permet d'obtenir un chromatogramme tel que celui de la figure VIII-5.

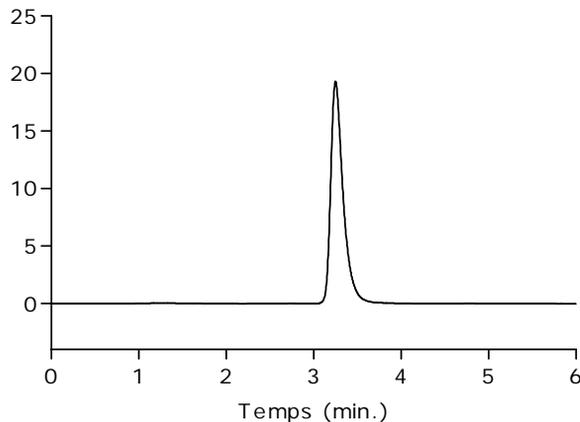


Figure VIII-5 : Chromatogramme obtenu après injection en CLHP d'une solution d'AS à 10 µg/ml

VIII.3.3.5.2 Validation

o La linéarité :

La linéarité permet de démontrer qu'il existe une relation linéaire entre les réponses (ici, l'aire des pics chromatographiques) et la concentration de la substance analysée. Elle est obtenue par l'étude de régression ayant pour équation $Y = ax + b$ et est caractérisée par un coefficient de détermination (r^2).

La droite de régression a été construite à partir de cinq concentrations (0,5; 2; 5; 10; 20 $\mu\text{g AS/ml}$), avec trois répétitions pour chacune de ces valeurs. Une régression linéaire réalisée à partir des réponses chromatographiques obtenues a permis d'établir la relation suivante :

$$Y = 28178 x - 326,84$$

Où y correspond à la concentration en AS ($\mu\text{g/ml}$)

x correspond à la surface du pic chromatographique

Le coefficient de détermination (r^2) vaut 0,9999. Il est donc raisonnable d'affirmer qu'il existe une très bonne corrélation entre la réponse chromatographique et les concentrations en AS comprises entre 0,5 et 20 $\mu\text{g/ml}$.

L'analyse de variance de la régression permet de vérifier la significativité de la pente, l'existence d'une ordonnée à l'origine et la validité de l'ajustement de la droite.

Existence d'une pente significative:

L'existence d'une pente significative est testée par un F de Snedecor au seuil de confiance de 95% (degrés de liberté = 1, n-2). Si le $F_{\text{calculé}}$ est supérieur au F de la table de Snedecor aux degrés de liberté (1, n-2), n étant le nombre total d'observations (ici n=15), le test est significatif, c.-à-d., la pente est différente de 0.

$$F_{\text{calculé}} = 632815 \quad F_{(0,95 ; 1 ; 13)} = 4,67$$

Comme le $F_{\text{calculé}}$ est supérieur au $F_{(0,95; 1; 13)}$, le test statistique est significatif et, au seuil de confiance déterminé, la pente est significativement différente de 0.

Test d'existence de l'ordonnée à l'origine :

Un test t de Student est effectué afin de vérifier l'existence d'une ordonnée à l'origine au seuil de confiance de 95% et au degré de liberté de n-2. Si le $t_{\text{calculé}}$ est supérieur au t de la table de Student à n-2 degrés de liberté, le test est significatif c.-à-d., l'ordonnée est différente de 0.

$$t_{\text{calculé}} = 0,88 \quad t_{(13; 0,95)} = 2,16$$

Comme le $t_{\text{calculé}}$ est inférieur au $t_{(13; 0,95)}$, on peut en conclure que l'ordonnée à l'origine peut être considérée comme nulle.

Test de validité de la droite d'ajustement :

Le test de validité de la droite d'ajustement permet de comparer les erreurs dues à l'ajustement et les erreurs expérimentales. Ce test s'effectue par un test de F de Snedecor. Si le critère $F_{\text{calculé}}$ est inférieur au F de la table de Snedecor aux degrés de liberté $(0,95; k-2; N-k)$, où k= nombre de « populations » (k= 5 dans ce cas), le test n'est pas significatif. La dispersion due à l'ajustement de la droite est alors considérée comme valide.

$$F_{\text{calculé}} = 3,46 \quad F_{(0,95; 3, 10)} = 3,71$$

Le $F_{\text{calculé}}$ étant inférieur au F de référence, le test est donc non significatif et l'ajustement de la droite est considéré comme valide.

o La fidélité

La fidélité de la méthode de dosage est exprimée par le coefficient de variation (C.V., %) obtenu en effectuant le rapport entre l'écart-type et la moyenne des réponses chromatographiques.

La répétabilité (fidélité intra-jour) et la fidélité intermédiaire (fidélité inter-jours ou reproductibilité) ont été observées à trois concentrations (0,5 , 5 et 20 $\mu\text{g/ml}$).

La méthode sera considérée comme fidèle si les C.V. de la répétabilité sont inférieurs à 2% et si les C.V. de la fidélité intermédiaire sont inférieurs à 2,8%.

Tableau VIII-2 : Données de répétabilité pour la validation du dosage de l'AS par CLHP

Concentration	n	C.V. (%)
0,5 µg/ml	6	1,84
5 µg/ml	6	1,10
20 µg/ml	6	0,57

Tableau VIII-3 : Données de fidélité intermédiaire pour la validation du dosage de l'AS par CLHP

Concentration	n	C.V. (%)
0,5 µg/ml	18	2,22
5 µg/ml	18	2,59
20 µg/ml	18	2,71

Au vu de ces résultats, on peut considérer que la méthode est fidèle.

o **L'exactitude**

L'exactitude exprime l'écart entre la valeur de la concentration réelle d'un échantillon reconstitué et la valeur mesurée par dosage. L'exactitude est évaluée sur l'ensemble des mesures brutes. Cet ensemble est transformé en un ensemble de rendement, obtenus en divisant la concentration calculée par la concentration réelle et en multipliant par cent. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VIII-4 et exprimés sous forme de rendements (% , ± écart-type) (n=6). La méthode est considérée comme exacte si la valeur de 100% est comprise dans l'intervalle de rendement ± écart-type.

Tableau VIII-4 : Données d'exactitude pour la validation du dosage de l'AS par CLHP

Concentration	n	Rendement (%)
0,5 µg/ml	6	99,67 ± 1,19
5 µg/ml	6	101,02 ± 1,04
20 µg/ml	6	100,44 ± 0,45

Au vu des résultats, la méthode est considérée comme exacte.

o Seuils de détection et de quantification

Le seuil de détection (SD) est défini comme étant la plus petite quantité (ou concentration) d'une substance à analyser dans un échantillon, pouvant être détectée, mais non quantifiée comme valeur exacte. Le seuil de quantification (SQ) correspond quant à lui, à la plus petite quantité (ou concentration) d'analyte pouvant être déterminée par la méthode avec une exactitude et une précision suffisantes.

Il est généralement admis que le SD et le SQ correspondent aux concentrations dont la réponse équivaut à l'amplitude du bruit de fond multipliée respectivement par trois et par dix (Edwardson et al., 1990). Les SD et SQ ont ainsi été déterminés et sont respectivement de 0,039 µg/ml et de 0,13 µg/ml.

VIII.3.3.6 Mise au point et validation d'une méthode de dosage simultané de l'AS et du salbutamol

VIII.3.3.6.1 Mise au point

La méthode CLHP pour le dosage de l'AS et du salbutamol décrite à la page 146 a été mise au point à partir de la méthode de dosage CLHP du salbutamol de la Pharmacopée Européenne et de celle de l'AS qui en est dérivée. Pour cela, différentes phases mobiles, c.-à-d. contenant des quantités variables en contre-ion et des concentrations relatives différentes en phase aqueuse (tampon phosphate pH 3,65) et en acétonitrile, ont été

testées, afin d'obtenir une séparation optimale des pics du salbutamol et de l'acétonide de salbutamol, tout en conservant un temps de rétention acceptable (et donc des pics suffisamment fins) pour les deux substances. La composition de la phase mobile retenue est décrite à la page 146. Il n'a pas été nécessaire d'utiliser un gradient d'éluion pour séparer correctement les pics du salbutamol et de l'AS. La figure VIII-6 représente un chromatogramme obtenu par la méthode CLHP mise au point pour le dosage simultané de l'AS et du salbutamol.

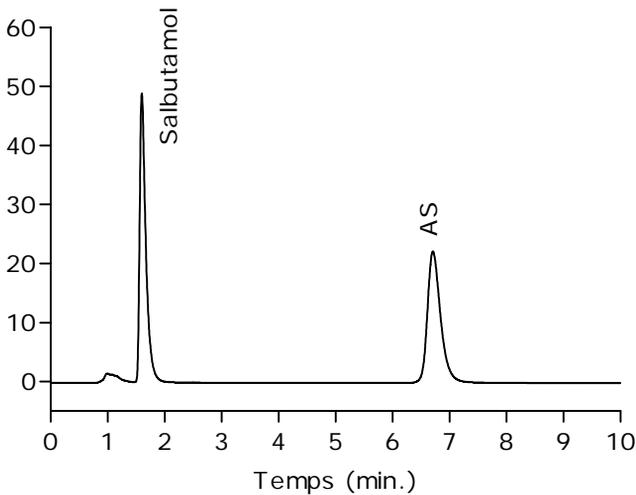


Figure VIII-6 : Chromatogramme obtenu après injection en CLHP d'une solution à 10 µg/ml en AS et en salbutamol

La validation de la méthode de dosage par CLHP du salbutamol et de l'AS a été réalisée indépendamment pour chacune des deux substances et selon le modèle décrit aux pages 152 à 155. Seuls les résultats seront donc présentés ci-dessous.

VIII.3.3.6.2 Validation du dosage du salbutamol par la méthode de dosage CLHP AS/Salbutamol

o La linéarité :

La droite de régression a été construite à partir de cinq concentrations (0,5 ; 2 ; 5 ; 10 ; 20 µg/ml), avec trois répétitions pour chacune de ces valeurs. Une régression linéaire réalisée à partir des réponses chromatographiques obtenues a permis d'établir la droite de régression suivante :

$$Y = 32907 x + 806,37 \quad (r^2 = 0,9999)$$

On peut donc affirmer qu'il existe une très bonne corrélation entre la réponse chromatographique et les concentrations en salbutamol comprises entre 0,5 et 20 µg/ml.

Existence d'une pente significative:

$$F_{\text{calculé}} = 203063 \quad F_{(0,95; 1; 13)} = 4,67$$

Comme le $F_{\text{calculé}}$ est supérieur au $F_{(0,95; 1; 13)}$, le test statistique est significatif et, au seuil de confiance déterminé, la pente est significativement différente de 0.

Test d'existence de l'ordonnée à l'origine :

$$t_{\text{calculé}} = 1,12 \quad t_{(13; 0,95)} = 2,16$$

Comme le $t_{\text{calculé}}$ est inférieur au $t_{(13; 0,95)}$, on peut en conclure que l'ordonnée à l'origine est considérée comme nulle.

Test de validité de la droite d'ajustement :

$$F_{\text{calculé}} = 2,77 \quad F_{(0,95; 3; 10)} = 3,71$$

Le $F_{\text{calculé}}$ étant inférieur au F de référence, le test est donc non significatif et l'ajustement de la droite est considéré comme valide.

o *La fidélité*

Tableau VIII-5 : Données de répétabilité pour la validation du dosage du salbutamol par la méthode CLHP AS/Salbutamol

Concentration	n	C.V. (%)
0,5 µg/ml	6	1,72
5 µg/ml	6	1,68
20 µg/ml	6	0,75

Tableau VIII-6 : Données de fidélité intermédiaire pour la validation du dosage du salbutamol par la méthode CLHP AS/Salbutamol

Concentration	n	C.V. (%)
0,5 µg/ml	18	2,28
5 µg/ml	18	2,57
20 µg/ml	18	1,30

Au vu de ces résultats, on peut considérer que la méthode est fidèle.

o *L'exactitude*

Tableau VIII-7: Données d'exactitude pour la validation du dosage du salbutamol par la méthode CLHP AS/Salbutamol

Concentration	n	Rendement (%)
0,5 µg/ml	6	100,01 ± 1,27
5 µg/ml	6	100,30 ± 0,34
20 µg/ml	6	99,72 ± 0,57

Au vu des résultats, la méthode est considérée comme exacte.

o *Seuils de détection et de quantification*

Les SD et SQ ont été déterminés et sont respectivement de 0,051 et de 0,17 µg/ml.

VIII.3.3.6.3 Validation du dosage de l'AS par la méthode de dosage CLHP AS/Salbutamol

o La linéarité :

La droite de régression a été construite à partir de cinq concentrations (0,5; 2; 5; 10; 20 µg/ml), avec trois répétitions pour chacune de ces valeurs. Une régression linéaire réalisée à partir des réponses chromatographiques obtenues a permis d'établir la droite de régression suivante :

$$Y = 28866 x + 270,22 \quad (r^2 = 0,9999)$$

On peut donc affirmer qu'il existe une très bonne corrélation entre la réponse chromatographique et les concentrations en AS comprises entre 0,5 et 20 µg/ml.

Existence d'une pente significative:

$$F_{\text{calculé}} = 549585 \quad F_{(0,95; 1; 13)} = 4,67$$

Comme le $F_{\text{calculé}}$ est supérieur au $F_{(0,95; 1; 13)}$, le test statistique est significatif et, au seuil de confiance déterminé, la pente est significativement différente de 0.

Test d'existence de l'ordonnée à l'origine :

$$t_{\text{calculé}} = 0,70 \quad t_{(13; 0,95)} = 2,16$$

Comme le $t_{\text{calculé}}$ est inférieur au $t_{(13; 0,95)}$, on peut en conclure que l'ordonnée à l'origine peut être considérée comme nulle.

Test de validité de la droite d'ajustement :

$$F_{\text{calculé}} = 3,70 \quad F_{(0,95; 3, 10)} = 3,71$$

Le $F_{\text{calculé}}$ étant inférieur au F de référence, le test est donc non significatif et l'ajustement de la droite est considéré comme valide.

o *La fidélité*

Tableau VIII-8 : Données de répétabilité pour la validation du dosage de l'AS par la méthode CLHP AS/Salbutamol

Concentration	n	C.V. (%)
0,5 µg/ml	6	1,58
5 µg/ml	6	1,46
20 µg/ml	6	0,81

Tableau VIII-9 : Données de fidélité intermédiaire pour la validation du dosage de l'AS par la méthode CLHP AS/Salbutamol

Concentration	n	C.V. (%)
0,5 µg/ml	18	1,58
5 µg/ml	18	2,71
20 µg/ml	18	1,37

Au vu de ces résultats, on peut considérer que la méthode est fidèle.

o *L'exactitude*

Tableau VIII-10: Données d'exactitude pour la validation du dosage du salbutamol par la méthode CLHP AS/Salbutamol

Concentration	n	Rendement (%)
0,5 µg/ml	6	100,34 ± 1,50
5 µg/ml	6	99,45 ± 2,01
20 µg/ml	6	100,02 ± 1,13

Au vu des résultats, la méthode est considérée comme exacte.

o *Seuils de détection et de quantification*

Les SD et SQ ont été déterminés et sont respectivement de 0,060 et de 0,200 µg/ml.

VIII.3.3.7 Etude de stabilité de l'AS dans les conditions opératoires

La stabilité de l'AS a été testée dans les conditions décrites aux pages 146 et 147. Les résultats sont présentés aux figures VIII-7 et VIII-8.

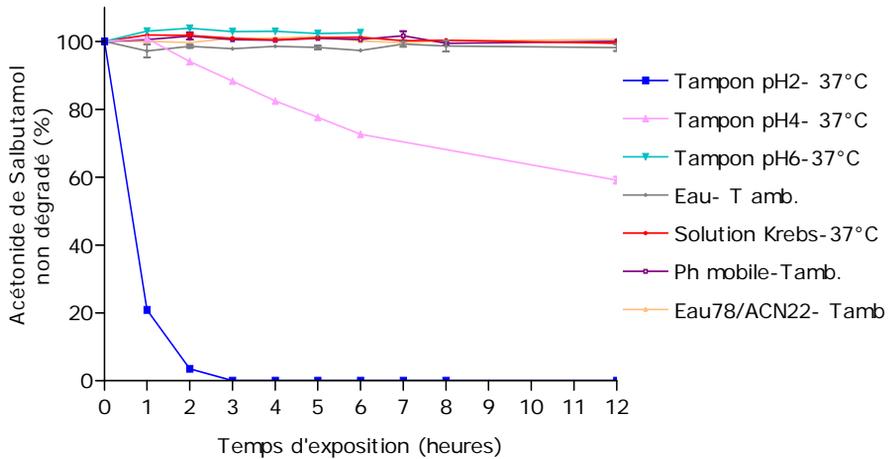


Figure VIII-7 : Stabilité de l'AS dans différentes conditions opératoires

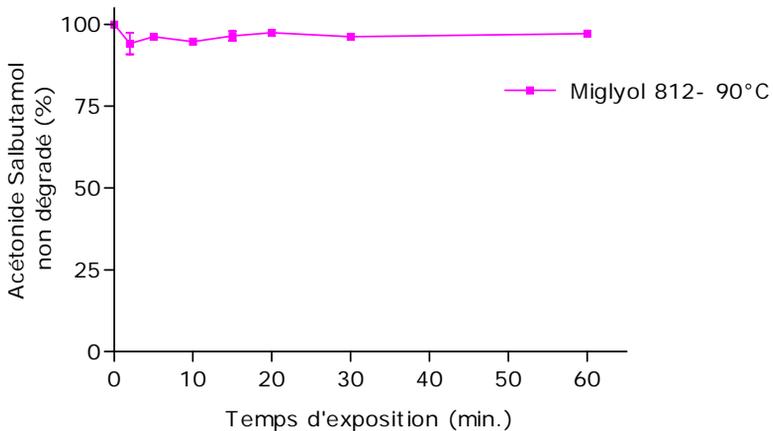


Figure VIII-8 : Stabilité de l'AS dans du Miglyol® 812 à 90°C

Au vu des résultats obtenus, on peut conclure que l'AS :

- o est stable dans la solution de Krebs à 37°C, c.-à-d. dans les conditions opératoires des essais pharmacologiques sur bronches isolées (Voir pages 168 à 170).
- o est stable dans la phase mobile utilisée pour le dosage CLHP ainsi que dans la phase utilisée pour les dilutions.
- o se dégrade lors de l'exposition à des pH acides.
- o est stable lors du chauffage dans un excipient lipidique et donc dans les conditions de fabrication des MLS.

Afin d'identifier qualitativement le produit de dégradation de l'AS à pH acide, la spectrométrie de masse a été utilisée. Les solutions échantillons ont été préparées en dissolvant l'AS dans 50 ml d'un mélange acétonitrile/eau (50/50) de manière à obtenir une concentration de 10 µg/ml. Les solutions obtenues ont ensuite été amenées à pH 1, pH 2 ou pH 3 avec du HCl 0,1N. Deux échantillons témoins, l'un à 10 µg salbutamol/ml, l'autre à 10 µg AS/ml ont également été préparés.

La figure VIII-9 représente le spectre obtenu avec la solution d'AS à pH 2.

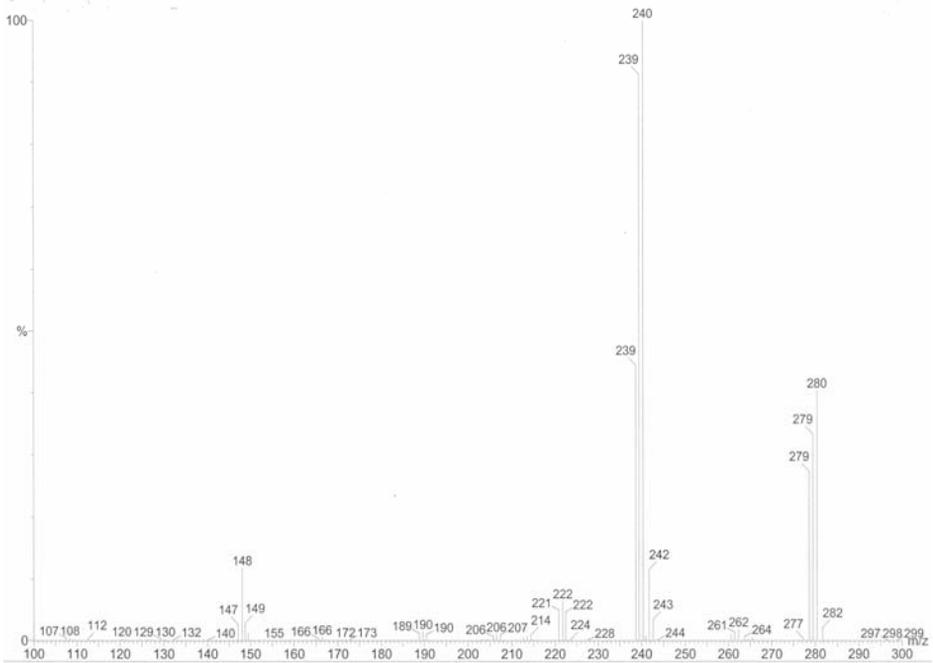


Figure VIII-9 : Spectre de masse de l'AS à pH 2

Les spectres obtenus montrent que lorsque le pH diminue un composé possédant une MM de 239 apparaît au fur-et-à mesure que disparaît le composé de MM égale à 279, c.-à-d. l'AS. Le composé de MM égale à 239 peut raisonnablement être identifié comme étant le salbutamol.

VIII.4. Références bibliographiques

Caira M.R., Hunter R., Nassimbeni L.R., Stevens A.T., 1999. Resolution of albuterol acetone. *Tetrahedron* 10, 2175-2189.

Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., Guilloteau M., Histe M., Lallier M., N'Guyen-Huu J.J., Russotto R., 1992. Guide de validation analytique. rapport d'une commission SFSTP. *S.T.P.pharma pratiques* 2 (4), 205-239.

Edwardson P.A., Bhaskar G., Fairbrother J.E., 1990. Method validation in pharmaceutical analysis. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 8 (8-12), 929-933.

Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition, 2005. Conseil de l'Europe. Strasbourg.

Reithmeier H., Gopferich A., Herrmann J., 1998. Preparation and characterization of lipid microparticles containing insulin, Proceedings of the 2nd World Meeting APGI/APV, Paris, France

Reithmeier H., Herrmann J., Gopferich A., 2001. Lipid microparticles as parenteral controlled release device for peptides. *J.Control.Release* 73 339-350.

Chapitre IX:

Evaluation de l'activité pharmacologique de l'acétonide de salbutamol

IX.1. Essais *ex vivo* de métabolisation de l'AS

IX.1.1 Introduction

Comme décrit aux pages 26 et 27, l'activité enzymatique du système respiratoire n'est pas négligeable. C'est la raison pour laquelle il nous a paru important avant de commencer l'investigation sur l'effet pharmacologique de l'AS, de vérifier si, au niveau bronchique, l'AS est métabolisé ou non. Ainsi, dans le cas où une activité pharmacologique (bronchodilatatrice) de l'AS est observée, cela nous permettra de savoir si celle-ci peut être attribuée à l'AS ou à un éventuel métabolite qui pourrait être le salbutamol. Dans ce dernier cas l'AS agirait comme une pro-drogue.

IX.1.2 Matériel

L'AS utilisé est celui synthétisé selon la méthode décrite aux pages 140 et 141.

L'étude de métabolisation de l'AS a été réalisée en présence de bronchioles de porc. Celles-ci ont été prélevées à partir de blocs trachéopulmonaires de porcs sains sacrifiés à l'abattoir public de Droixhe (Belgique), l'Institut d'expertise vétérinaire de cet abattoir ayant au préalable marqué son accord pour le prélèvement tissulaire en fin de

chaîne d'abattage. Un lobe pulmonaire est prélevé, les conduits aériens sont rincés plusieurs fois à l'aide d'une solution aqueuse à 0,9% en NaCl. Durant le transport, le tissu prélevé est conservé dans une solution de Krebs-Henseleit à 4°C préalablement oxygénée. Dès l'arrivée au laboratoire, des fragments bronchiques d'une longueur de 5 à 10 mm et d'un diamètre de ± 1 mm sont isolés par dissection.

Tous les solvants utilisés sont de qualité CLHP et les autres réactifs sont de qualité pour analyse.

IX.1.3 Méthodes

L'étude de métabolisation de l'AS a été réalisée avec le même dispositif expérimental que les essais *ex vivo* de bronchodilatation sur organes isolés dont il est question au paragraphe suivant. L'appareillage utilisé se compose de huit cuves (ou bains d'organe) d'une contenance maximale de 25 ml et thermostatées à 37°C. La solution contenue dans la cuve est continuellement oxygénée. Les cuves disposent d'un robinet à trois voies permettant à la fois l'approvisionnement en solution de Krebs-Henseleit (solution utilisée pour l'évaluation pharmacologique de l'AS sur bronches isolées et dont la composition a été décrite à la page 147) et l'élimination de solutions usagées.

Dans quatre des huit cuves, on place 20 ml d'une solution de Krebs-Henseleit à 100 μg AS/ml ainsi que quelques fragments de bronches de porc. Des aliquots sont prélevés après 6h et 24h et remplacés par de la solution de Krebs-Henseleit fraîche. Ces prélèvements sont filtrés sur membrane en PVDF, puis dosés par la méthode CLHP AS/salbutamol décrite à la page 146.

Deux témoins sont réalisés de la même façon mais en l'absence de fragments bronchiques.

Un essai contrôle sera également réalisé, c.-à-d 20 ml de solution de Krebs-Henseleit ne contenant pas d'AS sera mis en présence d'un fragment bronchique. Cet essai contrôle a pour but de mettre en évidence

d'éventuels composés biologiques pouvant interférer lors des dosages par CLHP.

La dernière cuve sera utilisée pour quantifier la faible fraction d'eau s'évaporant de la solution de Krebs-Henseleit au cours de l'expérimentation. Un facteur de correction tenant compte de l'évaporation pourra ainsi être appliqué aux dosages.

Les fragments de bronches sont récupérés après expérimentation, sont rincés plusieurs fois à l'eau puis lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur de type Heto[®] DW 8 de Heto – Holten (Allerød, Danemark). Une extraction au méthanol est ensuite réalisée sur le lyophilisat, dans le but de recueillir l'AS ou un éventuel produit de métabolisation (peut-être le salbutamol) qui se serait accumulé au niveau du tissu bronchique. Les extraits méthanoliques sont finalement dosés par la méthode CLHP AS/salbutamol décrite à la page 146.

IX.1.4 Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans l'histogramme suivant (Figure IX-1) et sont exprimés en pourcentage d'AS soit non dégradé soit dégradé en salbutamol.

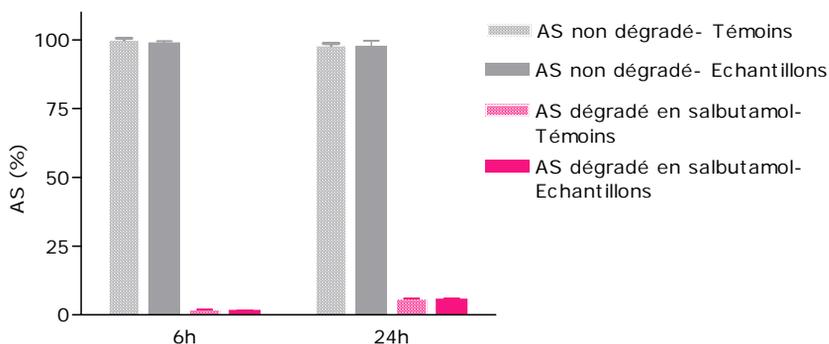


Figure IX-1 : Etude de métabolisation de l'AS en présence de bronches de porc

Aucune trace d'AS ni de salbutamol n'a été décelée dans les extraits méthanoliques des fragments de bronches de porc lyophilisés. L'AS ne semble donc pas s'accumuler dans les tissus au cours de l'expérimentation.

IX.1.5 Conclusion

On observe à la fois dans les solutions témoins et dans les échantillons qu'une très faible proportion d'AS s'est dégradée en salbutamol. Aucune différence n'ayant été décelée entre les échantillons et les témoins, la dégradation ne peut être attribuée à la présence de bronches de porc dans le milieu. En conclusion, l'AS n'est pas métabolisé par le tissu bronchique porcin. Par la suite, si une action bronchodilatatrice notable est observée, celle-ci pourra raisonnablement être attribuée à l'AS.

IX.2. Essais *ex vivo* de bronchodilatation sur organes isolés

Les essais de bronchodilatation sur organes isolés ont été réalisés par le laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège. Les résultats ayant fait l'objet d'un mémoire de DEA en Sciences Vétérinaires (Leemans, 2004), la méthode de travail ne sera dès lors que brièvement décrite et seuls les résultats principaux seront présentés.

IX.2.1 Méthodes

Le pouvoir bronchodilatateur de l'AS a été investigué sur les muscles lisses trachéaux de cobayes et bronchiques de porcs et de chats dans un dispositif de bains d'organes. Le pouvoir bronchodilatateur de l'AS a été comparé dans les mêmes conditions opératoires à celui d'autres molécules à savoir le salbutamol (agoniste β_2 -adrénergique de courte durée d'action), l'isoprénaline (un agoniste adrénergique mixte c.-à-d. agoniste β_1 et β_2 -adrénergique), la théophylline (un bronchodilatateur dérivé de la

méthylxanthine) et le formotérol (un agoniste β_2 adrénergique à longue durée d'action) (Leemans, 2004).

IX.2.2 Résultats

Des résultats obtenus, il ressort principalement que :

- Chez le cobaye, l'AS ne montre aucune propriété bronchodilatatrice vis-à-vis du muscle lisse trachéal. Parmi les molécules testées, le formotérol est l'agoniste β_2 -adrénergique le plus puissant et le plus efficace après l'isoprénaline.
- Chez le porc, l'activité des agonistes β_2 -adrénergiques est fortement réduite, y compris avec l'isoprénaline mais dans une moindre mesure. L'AS exhibe chez le porc une activité bronchodilatatrice plus importante que le salbutamol mais qui reste un peu moins puissante et efficace que celle de l'isoprénaline.
- Chez le chat, l'isoprénaline s'est montrée le plus puissant bronchodilatateur ainsi que le plus efficace devant le formotérol. L'AS exerce sur les bronches de chat une activité bronchodilatatrice significative mais de puissance et d'efficacité inférieures à celle du salbutamol.

IX.2.3 Conclusion

Au vu de ces résultats, il ne semble pas évident de tirer des conclusions quant à l'éventuel effet β_2 -mimétique de l'AS, d'autant plus que les récepteurs impliqués dans la bronchodilatation ne sont pas clairement identifiés chez toutes les espèces animales.

Cependant, le cobaye reste l'espèce de choix pour l'étude des effets bronchodilatateurs des agonistes β_2 -adrénergiques. Chez cette espèce, les récepteurs impliqués dans la bronchodilatation sont bien de type β_2 (Ball et al., 1991; Lemoine et al., 1992; Linden et al., 1996; Roux et al., 1996).

En ce qui concerne le chat, les études dévolues à la caractérisation du système adrénergique de son arbre respiratoire sont rares (Leemans,

2004). Il semblerait toutefois que la relaxation des voies respiratoires périphériques soit permise par l'activation d'une population mixte de récepteurs β -adrénergiques avec prédominance du sous-type β_2 (Lulich et al., 1976).

Ces données semblent en accord avec l'activité prononcée des agonistes β_2 -adrénergiques chez le cobaye et chez le chat.

Par contre en ce qui concerne le porc, les récepteurs adrénérgiques impliqués dans la relaxation des muscles lisses ne sont pas identifiés. Or, pour rappel, dans l'étude réalisée, les agonistes β_2 -adrénergiques montrent une activité bronchodilatatrice nettement diminuée chez le porc alors que celle de l'isoprénaline ne diminue que légèrement et que l'acétonide de salbutamol y montre des propriétés bronchodilatatrices significatives. Au vu des résultats obtenus, l'auteur de l'étude a émis l'hypothèse que la bronchodilatation observée avec l'AS chez le porc est permise par l'activation de récepteurs adrénérgiques de type β_1 (Leemans, 2004). L'AS ayant montré des propriétés bronchodilatatrices à la fois chez le porc et chez le chat mais pas chez le cobaye, il est difficile de conclure avec certitude quant à son éventuelle activité β_1 ou β_2 -mimétique. C'est la raison pour laquelle cette étude sera complétée par des essais *in vitro* de binding (Voir paragraphe suivant).

IX.3. Etude in vitro des interactions ligand-récepteur (Essais de binding)

IX.3.1 Introduction

Les essais *ex vivo* n'ayant pu confirmer ni infirmer l'éventuel effet β_2 -mimétique de l'AS, des essais *in vitro* de binding ont été réalisés en vue d'évaluer l'affinité de l'AS pour les récepteurs β_1 et β_2 . Ces essais ont été réalisés par le Professeur Jean-François Liégeois ainsi que par le Docteur Amaury Graulich du service de Chimie Pharmaceutique de l'Université de

Liège. L'affinité β_1 et β_2 de l'AS a été évaluée comparativement au salbutamol et au S(-)-propranolol.

IX.3.2 Matériel

- Les récepteurs β -adrénergiques humains (exprimés dans des cellules Sf9) utilisés proviennent de chez SignalScreen® et sont disponibles sous forme de suspensions de protéines de membranes cellulaires contenant le récepteur dans un tampon pH 7,4 à 50 mM en TRIS-HCl, à 10% en glycérol et 1% en serum albumine bovine (BSA). L'activité spécifique des récepteurs β_1 utilisés est de 2,6 pmole par mg de protéine membranaire et la suspension membranaire contient 3,2 mg de protéine/ml. Les récepteurs β_2 utilisés ont une activité spécifique de 1,5 pmole par mg de protéine membranaire tandis que la suspension membranaire contient 4,4 mg de protéine/ml.
- Le radioligand utilisé est le [3 H](-)-CGP-1177, (4-(3-tertiarybutylamino-2-hydroxypropy)-benzimidazole-2-hydrochloride) qui est le ligand adéquat pour l'étude de l'affinité envers les récepteurs β -adrénergiques (Staehelin et al., 1983b; Staehelin et al., 1983a). Son activité est de 30 Ci/mmoles.
- Le ligand non-spécifique choisi est le S(-)-propranolol (antagoniste compétitif non-sélectif des récepteurs β_1 et β_2). Il est utilisé à une concentration de 1 μ M dans un tampon pH 7,4.
- L'AS utilisé est celui synthétisé selon la méthode décrite aux pages 140 et 141. Le salbutamol base provient de chez Cambrex Profarmaco (Italie). Les solutions d'AS et de salbutamol utilisées pour les essais sont à 420 μ M dans le DMSO.
- Le tampon d'incubation est composé de 75 mM de TRIS (tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane), de 12,5 mM de Mg Cl₂, de 2 mM d'EDTA et est tamponné à pH 7,4. Le tampon de rinçage est une solution aqueuse à 50 mM de TRIS.

- Les filtres en microfibres de verre (GF/C, Whatman®) utilisés au cours de l'expérimentation sont incubés durant 1 heure avant la filtration dans une solution aqueuse de polyéthylèneimine à 0,3% puis rincés avec 2,5 ml de tampon 50 mM TRIS.
- Le liquide de scintillation utilisé est de l'Ecoscint®.
- Tous les solvants et réactifs utilisés sont de qualité pour analyse.

IX.3.3 Méthodes

Les suspensions membranaires sont tout d'abord diluées 200 fois dans le liquide d'incubation. Les échantillons destinés aux essais de compétition sont composés de :

- 1000 µl de suspension membranaire diluée
- 25 µl de radioligand à 0,14 nM
- 25 µl de tampon ou de ligand non marqué (propranolol, salbutamol ou AS)

On laisse incuber les échantillons durant 1 heure à 27°C. La mesure de la liaison totale du radioligand est obtenue par filtration rapide sous vide des échantillons ne contenant pas de ligand non marqué. Le radioligand lié est collecté sélectivement sur le filtre en microfibres de verre, tandis que la fraction de radioligand qui est non liée est éliminée. Les filtres sont ensuite plongés dans du liquide de scintillation afin d'évaluer la radioactivité en présence (Graulich, 2004). Le comptage de la radioactivité est réalisée le lendemain à l'aide d'un compteur à scintillation de type Perkin Elmer® TriCarb scintillation analyser Model 1600 TR.

Il convient ensuite de différencier la liaison spécifique du radioligand sur un site récepteur (phénomène saturable) de sa liaison non spécifique par adsorption sur les lipides, les protéines et le filtre (phénomène non saturable). Ainsi, des expériences sont menées en parallèle en présence d'un excès de ligand non marqué afin de déterminer la liaison non spécifique. La liaison spécifique sera obtenue en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale (Graulich, 2004; Williams et al., 1989).

Les résultats seront exprimés en IC₅₀ qui correspond à la concentration de ligand non marqué qui inhibe 50% de la liaison spécifique du radioligand. Des valeurs de K_i correspondant à la constante de dissociation du ligand non marqué vis-à-vis des sites de liaison du radioligand, seront ensuite calculées par l'équation suivante (équation de Cheng et Prussoff) (Cheng et al., 1973) :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{(1 + L/K_d)}$$

où L est équivalent à la concentration du radioligand dans le milieu d'incubation (nM) et K_d est la constante de dissociation du radioligand pour les sites de liaison (nM). Les valeurs de K_d fournies par Signascreen® pour le radioligand utilisé sont :

$$K_d (\beta_1) = 0,17 \text{ et } K_d (\beta_2) = 0,30$$

La sélectivité d'un composé vis-à-vis des récepteurs β_2 sera obtenue par le rapport K_i (β_2) / K_i (β_1).

IX.3.4 Résultats

Les valeurs d'IC₅₀ et de K_i pour l'étude de l'affinité de l'AS, du salbutamol et du propranolol vis-à-vis des récepteurs β_1 sont présentées dans le tableau IX-1 tandis que ces mêmes valeurs pour l'étude de l'affinité vis-à-vis des récepteurs β_2 sont présentées au tableau IX-2.

Tableau IX-1 : Valeurs d'IC₅₀ et de K_i pour l'étude de l'affinité β_1 de l'AS, du salbutamol et du propranolol

Binding β_1		
	IC₅₀ (nM) ± écart-type	K_i (nM) ± écart-type
S(-)-Propranolol*	3,25 ± 0,07	1,34 ± 0,03
Salbutamol	8631 ± 499	3557 ± 205
Acétonide de salbutamol	5229 ± 250	2143 ± 103

*K_i= 0,080 nM (Selon SignalScreen®)

Tableau IX-2 : Valeurs d'IC₅₀ et de K_i pour l'étude de l'affinité β_2 de l'AS, du salbutamol et du propranolol

Binding β_2		
	IC ₅₀ (nM) \pm écart-type	K _i (nM) \pm écart-type
S(-)-Propranolol*	0,97 \pm 0,23	0,53 \pm 0,12
Salbutamol	2297 \pm 134	1248 \pm 73
Acétonide de salbutamol	1676 \pm 78	911 \pm 43

*K_i = 0,012 nM (Selon SignalScreen®)

Les valeurs de sélectivité des composés testés sont exposées dans le tableau IX-3.

Tableau IX-3 : Sélectivité des composés testés vis-à-vis des récepteurs β_2

	Sélectivité vis-à-vis des récepteurs β_2
S(-)-Propranolol	2,53
Salbutamol	2,83
Acétonide de salbutamol	2,35

Les valeurs d'affinité du S(-)-propranolol obtenues expérimentalement sont en accord avec celles rapportées par SignalScreen®, ce qui valide la méthode de travail utilisée. Les valeurs de K_i obtenues montrent que l'AS présente une affinité supérieure au salbutamol pour les deux types de récepteurs examinés pour une sélectivité comparable.

IX.4. Conclusion

Les résultats de binding obtenus avec l'AS sont encourageants mais ne semblent pas en adéquation avec ceux obtenus sur les bronches de porc isolées ni avec l'hypothèse formulée à la suite des expériences de bronchodilatation *ex vivo* (à savoir que la bronchodilatation observée avec

l'AS chez le porc serait permise par un effet agoniste au niveau des récepteurs adrénergiques de type β_1).

Au vu de ces résultats, plusieurs nouvelles hypothèses peuvent être avancées :

- o Soit l'AS possède effectivement une bonne affinité pour les récepteurs β_2 mais il agit comme antagoniste compétitif c.-à-d. qu'il se fixe sur le même site que l'agoniste mais sans induire d'action pharmacologique. Ceci expliquerait les mauvais résultats en termes de bronchodilatation obtenus chez le cobaye. La bronchodilatation observée chez le chat ne peut toutefois pas être expliquée par cette théorie.
- o Soit l'AS agit comme agoniste β -adrénergique mixte, c.-à-d. à la fois β_1 et β_2 -adrénergique. Cependant, dans ce cas, les effets de bronchodilatation chez le cobaye auraient probablement dû être plus importants.

En résumé, à ce stade des investigations pharmacologiques, il semble difficile de conclure avec certitude quant à l'éventuel effet β_2 -mimétique de l'AS. Pour cela, il sera probablement nécessaire de recourir à des essais *in vivo* de bronchodilatation sur des espèces dont le système adrénergique de l'arbre respiratoire est clairement caractérisé.

Pour la suite de notre travail, nous avons toutefois décidé de conserver l'AS comme molécule modèle dans la mise au point de formes à libération prolongée destinées à l'administration par inhalation.

IX.5. Références bibliographiques

Ball D.I., Brittain R.T., Coleman R.A., Denyer L.H., Jack D., Johnson M., Lunts L.H., Nials A.T., Sheldrick K.E., Skidmore I.F., 1991. Salmeterol, a novel, long-acting beta 2-adrenoceptor agonist: characterization of pharmacological activity in vitro and in vivo. *Br.J.Pharmacol.* 104 (3), 665-671.

Cheng Y., Prusoff W.H., 1973. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem.Pharmacol.* 22 (23), 3099-3108.

Graulich A., 2004. Synthèse et évaluation pharmacologique d'analogues de la N-méthyl-laudanoline, un bloqueur des canaux SK. Mémoire présenté en vue de l'obtention du DEA en Sc. Pharmaceutiques, Université de Liège, Belgique.

Leemans J., 2004. Etude comparative in vitro de cinq substances bronchodilatatrices chez le cobaye, le porc et le chat. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme d'études approfondies en sciences vétérinaires, Université de Liège, Belgique.

Lemoine H., Overlack C., Kohl A., Worth H., Reinhardt D., 1992. Formoterol, fenoterol, and salbutamol as partial agonists for relaxation of maximally contracted guinea pig tracheae: comparison of relaxation with receptor binding. *Lung* 170 (3), 163-180.

Linden A., Rabe K.F., Lofdahl C.G., 1996. Pharmacological basis for duration of effect: formoterol and salmeterol versus short-acting beta 2-adrenoreceptor agonists. *Lung* 174 (1), 1-22.

Lulich K.M., Mitchell H.W., Sparrow M.P., 1976. The cat lung strip as an in vitro preparation of peripheral airways: a comparison of beta-adrenoceptor agonists, autacoids and anaphylactic challenge on the lung strip and trachea. *Br.J.Pharmacol.* 58 (1), 71-79.

Roux F.J., Grandordy B., Douglas J.S., 1996. Functional and binding characteristics of long-acting beta 2-agonists in lung and heart. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 153 (5), 1489-1495.

Staelin M., Hertel C., 1983a. [3H]CGP-12177, a beta-adrenergic ligand suitable for measuring cell surface receptors. *J.Recept.Res.* 3 (1-2), 35-43.

Staelin M., Simons P., Jaeggi K., Wigger N., 1983b. CGP-12177. A hydrophilic beta-adrenergic receptor radioligand reveals high affinity binding of agonists to intact cells. *J.Biol.Chem.* 258 (6), 3496-3502.

Williams, M., Glennon, R. A., Timmermans, P. B. M. W. M., 1989. Receptor Pharmacology and Function. Dekker, M. (Ed), New-York

Chapitre X:

Formulation de MLS contenant de l'AS et optimisation des paramètres de production

X.1. Introduction

Ce chapitre décrit la production de microparticules lipidiques solides (MLS) chargées en AS ainsi que l'optimisation des paramètres de fabrication par utilisation de la méthodologie des plans d'expériences afin d'obtenir une taille de particules convenant à l'administration pulmonaire (Jaspart et al., 2005; Jaspart et al., 2007).

X.2. Fabrication de MLS contenant l'AS

X.2.1 Matériel

Le matériel est le même que celui utilisé pour la formulation de MLS vierges (Voir pages 107 et 108) auquel est ajouté l'AS, issu de la synthèse décrite aux pages 140 et 141.

X.2.2 Méthodes

Comme pour les MLS vierges, la méthode de production choisie est l'homogénéisation à chaud suivie d'un mélange à haute vitesse de cisaillement. Pour rappel, le Compritol® 888 ATO auquel on ajoute cette fois l'AS, est chauffé au bain-marie à 90°C, tandis que l'eau et le Lutrol® F68 sont portés ensemble à la même température. La phase aqueuse est versée dans la phase lipidique sous agitation à l'aide d'un mélangeur à haute vitesse de

cisaillement de type UltraTurrax® T25 IKA de Janke & Kunkel (Staufen, Allemagne). Une émulsion huile dans eau est ainsi obtenue par inversion de phase.

Après refroidissement, une suspension est obtenue. Celle-ci est finalement lyophilisée à l'aide d'un appareil de type Heto® DW8 de Heto-Holten (Allerød, Danemark).

X.3. Optimisation des paramètres de production des MLS par utilisation des plans d'expériences

X.3.1 Introduction

La méthodologie des plans d'expériences a été utilisée pour l'optimisation des paramètres de production des MLS, afin d'obtenir un pourcentage maximal (en terme de volume) de particules possédant un diamètre géométrique compris entre 0,5 et 6 μm . Le logiciel de planification expérimentale utilisé est MODDE® 6.0. (Umetrics, Suède) (Modde 6.0 Software, 2001).

X.3.2 Méthodes

X.3.2.1 Paramètres de production des MLS

Dans un premier temps, les paramètres critiques ont été fixés. Par rapport à la fabrication de MLS vierges, un nouveau paramètre pouvant influencer la taille des particules intervient, à savoir la concentration en AS.

Les paramètres étudiés seront :

- La concentration en AS
- La concentration en Lutrol® F68
- La durée de mélange

Les limites de variation des paramètres étudiés ont été déterminées après quelques essais expérimentaux préalables. Ainsi, la concentration en AS sera étudiée entre 5 et 25% (calculé par rapport au poids total de la phase dispersée c.-à-d. du Compritol® 888 ATO ainsi que de l'AS). La limite

Chapitre X: Formulation de MLS contenant l'AS et optimisation de la production

supérieure (25%) correspond approximativement à la quantité maximale d'AS qui se dissout dans le Compritol® 888 ATO fondu.

La concentration en tensioactif sera étudiée entre 0,1 et 0,5% (calculé par rapport au poids total de la suspension). La limite inférieure (0,1%) correspond à la quantité minimale de tensioactif nécessaire pour obtenir une émulsion stable tandis que la limite supérieure (0,5%) est la valeur au-dessus de laquelle l'apparition de mousse devient gênante.

La durée de mélange sera étudiée entre 1 et 10 minutes, comme on l'avait fait pour la fabrication des MLS vierges.

La concentration en phase dispersée a été fixée à 5% (par rapport au poids total de la suspension).

La vitesse d'agitation a été choisie lors de l'étape de screening. Pour ce faire, des valeurs intermédiaires de concentration en tensioactif (0,25%), de durée d'agitation (5 min.) et de concentration en AS (10%) ont été choisies et différentes vitesses d'agitation (8000, 13500 et 24000 tours/min.) ont été testées. Les meilleurs résultats en termes de taille de particules ayant été obtenus à une vitesse de mélange de 8000 tours/min., c'est cette valeur qui a été choisie pour la réalisation des plans d'expérience.

Le tableau X-1 résume les paramètres de fabrication ayant été fixés, ceux qui seront étudiés ainsi que les limites de variation de ces derniers.

Tableau X-1 : Paramètres de fabrication des MLS

Paramètres fixés			Paramètres étudiés					
Appareillage utilisé	Vitesse d'agitation (tours/min.)	Phase dispersée (%) (p/p _{suspension})	Tensio-actif (%) (p/p _{suspension})		Durée d'agitation (min.)		Concentration en AS (%) (p/p _{suspension})	
			Limite inf.	Limite sup.	Limite inf.	Limite sup.	Limite inf.	Limite sup.
Ultra-Turrax® T25	8000	5	0,1	0,5	1	10	5	25

X.3.2.2 Réponse mesurée

La réponse mesurée est le pourcentage de MLS dont le diamètre géométrique est compris entre 0,5 et 6 μm . Cette mesure sera effectuée par diffractométrie laser à l'aide du module Scirrocco[®] 2000 du Mastersizer[®] 2000 de chez Malvern Instruments (Worcestershire, Royaume-Uni). Chaque échantillon de MLS sera mesuré trois fois. A titre informatif les valeurs de diamètre médian $D_{(v;0,5)}$ (défini à la page 79) seront également mentionnées.

X.3.2.3 Réalisation du plan d'expériences

En fonction des paramètres à étudier et de leurs limites de variation, le logiciel Modde[®] 6.0 a déterminé les expériences à réaliser. Le plan d'expériences est détaillé dans le Tableau X-2. Chaque expérience sera réalisée deux fois ($n=2$).

Tableau X-2 : Schéma du plan d'expériences

N° expérience	N° ordre expérience	Concentration Lutrol® F68 (% (p/p _{suspension}))	Durée d'agitation (min.)	Conc. AS (%(p/p _{ph. dispersée}))
1	10	0,1	1	1
2	7	0,5	1	1
3	6	0,1	10	1
4	3	0,5	10	1
5	1	0,1	1	25
6	15	0,5	1	25
7	12	0,1	10	25
8	14	0,5	10	25
9	4	0,1	5,5	13
10	2	0,5	5,5	13
11	9	0,3	1	13
12	8	0,3	10	13
13	16	0,3	5,5	1
14	13	0,3	5,5	25
15	11	0,3	5,5	13
16	5	0,3	5,5	13
17	17	0,3	5,5	13

X.3.3 Résultats

X.3.3.1 Introduction

Le plan généré par le logiciel Modde® 6.0 est de type composite centré (CCF-Central Composite Face-centered). C'est le type de plan le plus utilisé pour l'estimation de surfaces de réponse, et qui fait intervenir uniquement des facteurs quantitatifs. Les plans composites centrés sont particulièrement appropriés pour faire de la prédiction ou rechercher un optimum dans un domaine d'intérêt donné (Govaerts et al., 1997). Les résultats expérimentaux sont résumés dans le tableau X-3. Les valeurs présentées sont une moyenne de la taille (exprimée en pourcentage de MLS dont le diamètre est compris

entre 0,5 et 6 μm ainsi qu'en $D_{(v;0,5)}$) des deux échantillons de MLS produits pour chacune des conditions expérimentales testées.

Tableau X-3 : Résultats expérimentaux du plan d'expériences

N° de l'expérience	MLS ayant un diamètre compris entre 0,5 et 6 μm (%)	$D_{(v;0,5)}$ (μm)
1	25,31 \pm 1,77	10,39 \pm 0,67
2	20,38 \pm 1,26	12,06 \pm 0,38
3	44,40 \pm 2,61	6,40 \pm 0,39
4	25,42 \pm 3,29	10,51 \pm 1,10
5	29,83 \pm 2,76	8,84 \pm 0,47
6	30,68 \pm 0,51	8,52 \pm 0,13
7	44,72 \pm 4,35	6,50 \pm 1,17
8	28,05 \pm 1,87	10,63 \pm 0,75
9	43,28 \pm 1,29	6,52 \pm 0,18
10	30,73 \pm 1,19	8,95 \pm 0,33
11	32,07 \pm 2,75	8,36 \pm 0,47
12	32,09 \pm 1,03	9,22 \pm 0,33
13	32,31 \pm 1,11	8,20 \pm 0,21
14	37,28 \pm 1,41	7,60 \pm 0,27
15	34,63 \pm 3,21	8,07 \pm 0,77
16	36,85 \pm 2,85	7,62 \pm 0,53
17	33,28 \pm 1,32	8,35 \pm 0,31

X.3.3.2 Analyse statistique

La qualité du modèle fourni par l'analyse des données peut être estimée par deux grandeurs : R^2 et Q^2 (Voir page 117).

Les valeurs de R^2 et Q^2 obtenues sont présentées à la figure X-1.

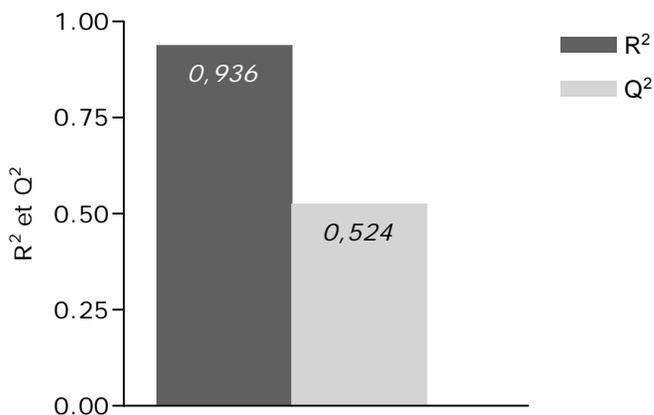


Figure X-1 : Représentation des valeurs de R² et Q²

A l'examen de ces résultats, nous pouvons déduire que le modèle choisi explique en grande partie les variations observées. La qualité de prédiction du modèle est également bonne puisque la valeur de Q² est positive.

X.3.3.3 Estimation des effets principaux, des effets quadratiques et des interactions

La figure X-2 représente les coefficients du modèle établis à partir de l'analyse des données du plan d'expériences, à un niveau de confiance de 95%. Pour rappel, ces coefficients sont considérés comme non significatifs quand ils sont englobés par l'intervalle de confiance.

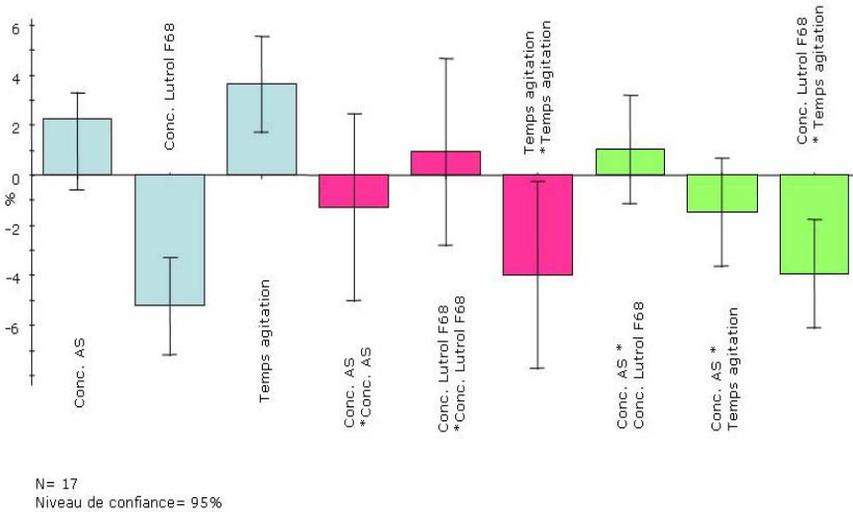


Figure X-2 : Représentation des coefficients du modèle

L'étude des effets principaux nous montre que :

- La concentration en Lutrol® F68 influence significativement la réponse, en l'occurrence le pourcentage de particules ayant un diamètre compris entre 0,5 et 6 μm : il diminue avec la concentration en Lutrol® F68 dans la zone de concentration entre 0,1 et 0,5%.
- Le temps d'agitation influence significativement le pourcentage de particules de diamètre entre 0,5 et 6 μm : celui-ci augmente lorsque le temps d'agitation augmente entre 1 et 10 minutes.
- La concentration en AS n'influence pas significativement le pourcentage de particules ayant un diamètre compris entre 0,5 et 6 μm .

Un effet quadratique a été observé. Ainsi, dans les limites étudiées, on peut dire que le pourcentage n'évolue pas de façon linéaire en fonction de la durée d'agitation du mélange.

Un effet d'interaction a également été observé entre la concentration en Lutrol® F68 et le temps d'agitation. Cette interaction se traduira par une torsion du plan représentant la réponse.

X.3.3.4 Représentation des résultats

La réponse étudiée (à savoir le pourcentage de particules dont le diamètre est compris entre 0,5 et 6 μm) va être illustrée en 3 dimensions sous forme d'une surface de réponse en fonction de la concentration en tensioactif et du temps d'agitation (Figure X-3) ainsi que sous forme d'une représentation topographique également en fonction de la concentration en tensioactif et du temps d'agitation (Figure X-4). Ce type de représentation ne permet de visualiser que deux paramètres (ainsi que la réponse choisie) simultanément. Il a donc fallu fixer un des facteurs étudiés. La concentration en AS étant le seul facteur n'influençant pas significativement la réponse, celle-ci a été fixée à une valeur intermédiaire de 13%.

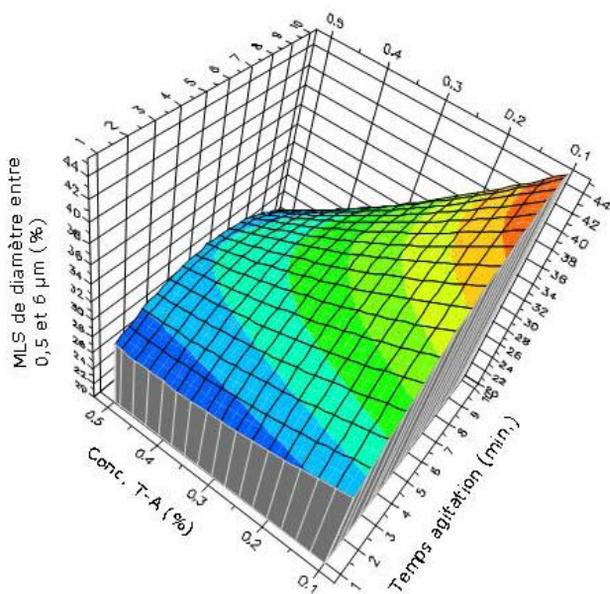


Figure X-3 : Représentation de la surface de réponse du pourcentage de MLS de diamètre compris entre 0,5 et 6 μm pour une concentration en AS fixée à 13%

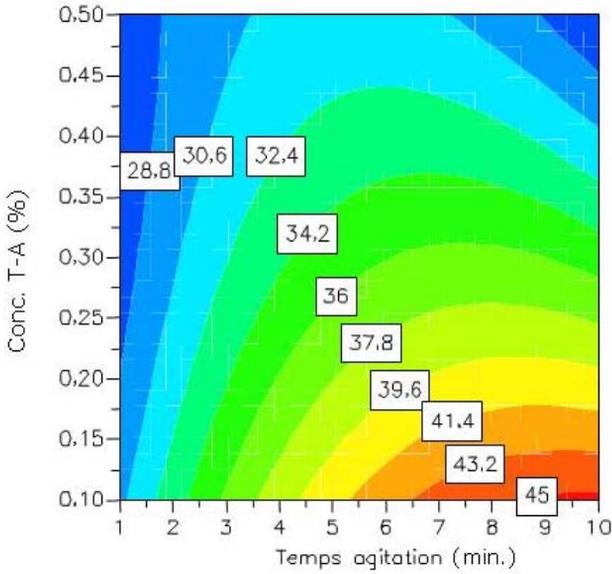


Figure X-4 : Représentation topographique du pourcentage de MLS de diamètre compris entre 0,5 et 6 µm pour une concentration en AS fixée à 13%

X.3.3.5 Optimisation des paramètres de fabrication

Après traitement des résultats, le logiciel Modde® 6.0 a permis de déterminer les conditions optimales théoriques de fabrication des MLS, c'est-à-dire les conditions opératoires permettant d'obtenir un pourcentage maximal de MLS dont le diamètre est compris entre 0,5 et 6 µm. Ces conditions opératoires sont présentées dans le tableau X-4 ainsi que les pourcentages optimaux théoriques correspondants de MLS dont le diamètre sera compris entre 0,5 et 6 µm.

Tableau X-4 : Conditions optimales théoriques de fabrication des MLS chargées en AS et réponses optimales théoriques correspondantes

Paramètres fixés			Paramètres étudiés			Réponse théorique
Appareillage utilisé	Vitesse agitation (tours/min.)	Phase dispersée (%) (p/p _{susp.})	Conc. T-A (%) (p/ p _{susp.})	Tps agitation (min.)	Conc. AS (%) (p/p _{susp.})	MLS de diamètre entre 0,5 et 6 µm (%)
Ultra-Turrax®	8000	5	0,1	10	5,5	45,00
Ultra-Turrax®	8000	5	0,1	10	11,5	45,31
Ultra-Turrax®	8000	5	0,1	10	16,5	44,53
Ultra-Turrax®	8000	5	0,1	10	20,2	44,73

X.3.3.6 Répétitions expérimentales des conditions optimales théoriques de fabrication des MLS

Comme on peut le déduire au vu des figures X-3 et X-4 et comme on l'avait également observé lors de la fabrication de MLS vierges, les conditions optimales de fabrication, c'est-à-dire celles permettant d'obtenir un pourcentage optimal de MLS possédant un diamètre compris entre 0,5 et 6 µm, ne paraissent pas extrêmement robustes. En effet, la zone de réponse correspondant aux conditions optimales n'est pas très étendue. Aux imprécisions opératoires près, on risque de passer dans une zone de réponse voisine.

Partie expérimentale

Pour ces raisons, il est important de réaliser des répétitions de ces conditions optimales théoriques de fabrication des MLS et de comparer les résultats expérimentaux avec les résultats théoriques calculés par le logiciel.

Vu que la concentration en AS n’influence pas directement la réponse, nous avons choisi d’utiliser les MLS contenant 5, 10, 15 et 20% en AS à la fois pour les répétitions expérimentales des conditions optimales théoriques de fabrication ainsi que pour les essais ultérieurs (Voir chapitres XI, XII et XIII).

Ainsi, trois suspensions ont été réalisées en appliquant les conditions optimales théoriques. Les résultats expérimentaux correspondants sont présentés dans le tableau X-5.

Tableau X-5 : Répétitions des conditions optimales théoriques et réponses expérimentales correspondantes

Paramètres étudiés			Réponses expérimentales		Réponse théorique
Conc. T-A (%) (p/p suspension)	Tps agitation (min.)	Conc. AS (%) (p/ρ _{suspension})	$D_{(v;0,5)}$ (μm)	MLS de diamètre entre 0,5 et 6 μm (%)	MLS de diamètre entre 0,5 et 6 μm (%)
			Moyenne ± Ecart-type (n=3)	Moyenne ± Ecart-type (n=3)	
0,1	10	5	6,53±1,45	44,52 ± 0,61	44,90
0,1	10	10	6,84±0,96	43,21 ± 1,42	45,30
0,1	10	15	6,56±1,26	44,47 ± 1,61	45,25
0,1	10	20	6,71±1,31	43,59 ± 0,87	44,76

Les valeurs présentées dans le tableau X-5 obtenues expérimentalement sont très proches des réponses théoriques prévues par le modèle et calculées par le logiciel Modde® 6.0. Les MLS utilisées pour les essais ultérieurs seront donc composées de 5% de phase dispersée, de 0,1% en Lutrol® F68 et seront

formulées à l'aide de l'Ultra-Turrax® T25 travaillant à 8000 tours/minute pendant 10 minutes. Les MLS étudiées contiendront 5, 10, 15 ou 20% en AS.

Notons également qu'une apparition d'un précipité d'AS a été observée dans le fond du récipient après refroidissement des suspensions quand on tente d'incorporer 25% en AS. La solubilité de l'AS dans l'excipient lipidique (Compritol® 888 ATO) semble diminuer au cours de la phase de refroidissement. C'est la raison pour laquelle, pour la suite du travail la concentration en AS sera limitée à 20% dans les MLS.

X.4. Conclusion

La méthode de production des MLS a été optimisée par la méthodologie de la planification expérimentale de façon à obtenir un pourcentage maximal de particules dans la zone de taille de 0,5 à 6 µm. Dans un premier temps les paramètres optimaux théoriques ont été déterminés. Ces paramètres ont ensuite été testés expérimentalement; les résultats obtenus se sont avérés être en corrélation avec les résultats théoriques attendus.

X.5. Références bibliographiques

Govaerts, B., Leboulengé, E., 1997. Planification expérimentale: Méthodologie et techniques. Institut de Statistique, Université Catholique de Louvain (Ed), Louvain (Belgique)

Jaspart S., Bertholet P., Delattre L., Evrard B., 2005. Study of Solid Lipid Microparticles as sustained release delivery system for pulmonary administration. *15th International Symposium on Microencapsulation, Parma, Italy.*

Jaspart S., Bertholet P., Piel G., Dogne J.M., Delattre L., Evrard B., 2007. Solid lipid microparticles as a sustained release system for pulmonary drug delivery. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 65, 47-56.

Modde 6.0 Software, 2001. Manuel d'utilisation en ligne, Umetrics, Suède.

Chapitre XI:

Caractérisation des MLS contenant l'AS

XI.1. Introduction

Pour la suite du travail, les MLS chargées en AS seront fabriquées selon les conditions opératoires déterminées au chapitre précédent. La seule variable qui sera conservée parmi les paramètres de production est la concentration en AS. Il a en effet été prouvé que ce paramètre n'influçait pas significativement la taille des particules dans la zone de concentration de 1 à 20% en AS.

Ce chapitre a pour objet la caractérisation des MLS chargées en AS. Cette caractérisation comprend la détermination de leur densité vraie (qui permettra l'estimation de leur diamètre aérodynamique), l'observation de la forme et de la surface des MLS par microscopie électronique, l'analyse de la forme cristalline de l'AS au sein des MLS ainsi que la détermination de la charge réelle en AS.

XI.2. Matériel

L'AS utilisé est issu de la synthèse exposée aux pages 140 et 141. Les MLS contenant l'AS seront produites en appliquant les paramètres optimaux de fabrication détaillés à la page 188 et en utilisant les matières premières décrites aux pages 107 et 108.

XI.3. Méthodes

XI.3.1 Détermination de la densité vraie des MLS et estimation du diamètre aérodynamique

Comme mentionné aux pages 17 à 19, la déposition des particules dans l'arbre respiratoire dépend de leur masse et donc de leur taille et de leur densité. Or, habituellement les particules sont caractérisées par leur taille plutôt que par leur masse. La notion de diamètre aérodynamique a donc été introduite afin de caractériser la taille d'une particule en tenant compte de sa densité. Le diamètre aérodynamique se définit comme le diamètre d'une particule sphérique de densité unitaire, ayant la même vitesse de sédimentation (et donc la même masse) que la particule décrite.

Les MLS choisies pour la détermination de la densité vraie ont été fabriquées selon les paramètres optimaux décrits à la page 188 et contiennent une charge intermédiaire en AS à savoir 10%.

Certaines techniques exposées préalablement permettent de mesurer *in vitro* (Voir pages 39 à 41) mais également *in vivo* (Voir page 42) la déposition de particules au sein de l'arbre respiratoire. Ces méthodes sont toutefois lourdes et n'ont pas leur place lors d'essais préliminaires et de screening de développement.

Le diamètre aérodynamique pourra donc être estimé à l'aide de la formule suivante (Fiegel et al., 2004):

$$d_{aéro} = \frac{d_{géom.} \cdot (\rho / \rho_a)^{1/2}}{\gamma}$$

où $d_{aéro}$ = diamètre aérodynamique

$d_{géom}$ = diamètre géométrique

ρ = densité de la particule

ρ_a = densité de l'eau (= 1)

γ = facteur de forme (= 1 dans le cas de particules sphériques)

Pour appliquer cette formule, il conviendra de déterminer au préalable le diamètre géométrique ainsi que la densité des particules.

Ainsi, dans un premier temps le diamètre géométrique $d_{\text{géom}}$ (correspondant au $D_{(v;0,5)}$) des particules sera évalué par diffractométrie laser à l'aide du Mastersizer[®] 2000- Scirocco[®] 2000 (Malvern Instruments, Royaume-Uni).

La densité vraie ρ des particules sera évaluée de la façon suivante: une quantité connue (m) de MLS sous forme sèche est pesée dans un cylindre gradué. Les MLS sont fondues à 80°C au bain-marie. Enfin le volume final (V) est lu après refroidissement à température ambiante. Trois répétitions de cette mesure seront réalisées. La densité ρ sera calculée en appliquant la formule suivante :

$$\rho = m(\text{g}) / V (\text{ml})$$

XI.3.2 Visualisation des MLS par microscopie électronique à balayage

La morphologie et la surface des MLS seront visualisées par microscopie électronique à balayage à l'aide d'un microscope de type Jeol JSM-840A. Au préalable les échantillons seront recouverts d'une couche de platine sous atmosphère d'argon. L'examen se fera sous une tension d'accélération de 20kV.

Les différents échantillons qui seront observés sont :

- AS seul
- MLS non chargées en AS
- MLS à 1% AS
- MLS à 25% AS

XI.3.3 Analyse thermique des MLS par DSC

Des mesures de calorimétrie différentielle (DSC pour Differential Scanning Calorimetry) seront réalisées dans le but de caractériser l'état

solide sous lequel se trouve l'AS dans les MLS et de voir si la charge en AS influence son état au sein des MLS.

Pour cela, une quantité précise d'environ 10 mg de composé à analyser est introduite dans une cupule standard en aluminium d'un volume de 40 μ l dont le couvercle est percé d'un trou.

Les thermogrammes sont enregistrés entre 35 et 190°C à une vitesse de chauffe de 10°C par minute, sous un flux de 20 ml d'azote par minute à l'aide d'un appareil Mettler-Toledo® DSC25-TC15 TA Controller piloté par un ordinateur utilisant le logiciel STAR® System version 6.1 de Mettler-Toledo (Greifensee, Suisse).

Les différents échantillons qui seront analysés par DSC sont les suivants:

- AS seul
- Béhénate de glycérol (Compritol® 888 ATO)
- MLS non chargées en AS
- MLS à 1% et à 20% en AS
- Mélanges physiques à différentes proportions de Compritol® 888 ATO et d'AS (70/30 – 50/50 et 30/70)

XI.3.4 Analyse de la forme cristalline de l'AS dans les MLS par diffraction des rayons-X

Cette technique est utilisée afin d'évaluer les éventuelles modifications de structure cristalline de l'AS au sein des MLS et ainsi de confirmer ou compléter les résultats obtenus par DSC. L'appareil utilisé est un diffractomètre à rayons-X Siemens® DX500 de source Cu K α travaillant à une température constante de 25°C.

Les différents échantillons qui seront analysés par la diffraction des rayons X sont :

- AS seul
- Béhénate de glycérol (Compritol® 888 ATO)
- Poloxamer 188 (Lutrol® F68)
- MLS non chargées en AS

- MLS à 5% et à 20 % en AS
- Mélanges physiques à différentes proportions de Compritol® 888 ATO et d'AS (95/5 et 80/20)

XI.3.5 Détermination de la charge réelle en AS dans les MLS

XI.3.5.1 Introduction

La méthode habituellement appliquée pour la détermination de la charge en principe actif incorporé dans des systèmes microparticulaires consiste à laver les particules sur un filtre à l'aide d'un solvant dans lequel la molécule est soluble tandis que la matrice lipidique y est insoluble. Le but de l'étape de lavage est d'éliminer les molécules qui ne sont pas incorporées à l'intérieur des microparticules. La détermination de la charge en principe actif peut alors se faire soit par dosage différentiel (en soustrayant la quantité de principe actif non incorporé de la quantité de principe actif mise en œuvre au départ), soit en solubilisant les particules dans un solvant adéquat et en dosant directement le principe actif dans ce milieu.

Dans le cas des MLS qui ont été fabriquées, il apparaît que l'étape de lavage sur filtre est particulièrement délicate. En effet, de nombreux filtres ont été testés (matières et seuils de coupure différents) et il s'avère que les plus petites particules colmatent les pores de ces filtres, rendant rapidement la filtration impossible. C'est la raison pour laquelle, pour la suite du travail, il a été décidé d'utiliser les MLS telles qu'obtenues après lyophilisation (poudre de MLS). Cette poudre contient des MLS chargées en AS mais pourrait aussi contenir d'éventuels cristaux d'AS libres (c.-à-d. non incorporés dans les MLS).

Les mesures de charges en AS seront donc également réalisées directement sur les poudres de MLS (non lavées). Il conviendra donc, dans ce cas, de garder à l'esprit que la charge réelle (par opposition à la charge théorique) en AS ne tient compte que d'éventuelles pertes en AS lors du

processus de fabrication, notamment sur les surfaces des récipients et matériels utilisés, particulièrement lors de la phase de refroidissement des suspensions. En pratique, compte tenu du fait que les poudres de MLS seront utilisées telles quelles (non lavées) pour la mise au point de poudres pour inhalation et à condition que le profil de libération soit connu et adéquat, il n'est pas gênant de ne pas quantifier exactement la quantité incorporée à l'intérieur des particules

XI.3.5.2 Description de la méthode

Une méthode d'extraction liquide-liquide à appliquer directement sur les poudres de MLS a donc été développée et validée. Une quantité connue de poudre de MLS est pesée et dissoute dans du chloroforme. Trois extractions de la phase organique sont réalisées consécutivement à l'aide d'une solution d'HCl 0,1N. Au contact de cette solution acide, l'AS est totalement dégradé en salbutamol. Vu sa relative hydrophilie, le salbutamol obtenu passe donc en phase aqueuse. Avant le dosage, la phase aqueuse sera chauffée modérément ($\pm 70^{\circ}\text{C}$) sous agitation afin d'éliminer les résidus de CHCl_3 . On amène ensuite la phase aqueuse à un volume déterminé avec de l'eau dans un jaugé. Le salbutamol est dosé par la méthode CLHP décrite dans la Pharmacopée Européenne (Pharmacopée Européenne, 2005). La concentration en salbutamol est finalement exprimée en termes de concentration en AS. La charge réelle en AS peut donc être calculée et comparée à la charge théorique. L'efficacité d'incorporation ou d'encapsulation (EE) de l'AS dans la poudre de MLS pourra être déterminée à partir de l'équation suivante (Jaspart et al., 2005):

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{Charge réelle en AS}}{\text{Charge théorique en AS}} \times 100$$

XI.3.5.3 Validation de la méthode d'extraction

Une étude des rendements d'extraction a été réalisée sur un jour afin de valider le processus d'extraction de l'AS à partir de l'excipient lipidique des MLS, à savoir le Compritol® 888 ATO.

Les échantillons sont préparés en pesant une quantité précise d'AS (ou de trituration d'AS dans du Compritol® 888 ATO) et en amenant à 5 g dans un berlin avec le Compritol® 888 ATO de façon à obtenir des échantillons à 0,5, à 5, à 10 et à 100 mg AS/g Compritol® 888 ATO. Afin de permettre l'incorporation de l'AS dans la matrice lipidique, les mélanges sont chauffés à 85°C puis refroidis. Le temps de chauffage doit être suffisant pour permettre la fusion de l'excipient et la dissolution de l'AS dans celui-ci.

Pour chacune des concentrations étudiées, trois extractions seront réalisées par la méthode décrite ci-dessus.

XI.4. Résultats

XI.4.1 Détermination de la densité vraie des MLS et estimation du diamètre aérodynamique

La valeur de la densité vraie ρ obtenue expérimentalement est égale à $0,752 \pm 0,013$ ($n=3$). Or, comme expliqué aux pages 17 à 19, le diamètre aérodynamique des particules doit être compris entre 0,5 et 5 μm pour que leur déposition s'effectue au niveau des voies aériennes les plus étroites ainsi que dans les alvéoles pulmonaires (Malcolmson et al., 1998).

En appliquant l'équation du diamètre aérodynamique (Voir page 194) pour ρ égale à 0.752 et en considérant qu'au vu de la forme sphérique des MLS (Voir paragraphe suivant), le facteur de forme γ vaut 1, l'équivalent en diamètre géométrique de la zone de taille 0,5-5 μm vaut 0,55-5,80 μm .

En pratique, on considérera que la zone de taille (exprimée en termes de diamètre géométrique) adéquate pour l'administration par inhalation des MLS produites s'étend approximativement de 0,5 à 6 μm .

XI.4.2 Visualisation des MLS par microscopie électronique à balayage

Les figures ci-dessous montrent les images de microscopie électronique des cristaux d'AS (Figure XI-1A), des MLS non chargées en AS (Figure XI-1B), des MLS contenant 1% (Figures XI-1C et XI-1D) et 25% (Figure XI-1E) d'AS. A partir de ces images, on a pu observer que les cristaux d'AS sont en forme d'aiguille, que les MLS sont relativement sphériques et que leur surface est plutôt lisse.

Des cristaux d'AS ont été observés en dehors des MLS pour l'échantillon de MLS à 25% en AS. Cela signifie qu'au moins une partie de l'AS se trouve sous forme libre (non incorporée dans les MLS). Ces cristaux d'AS n'ont pas été repérés sur l'image des MLS à 1% en AS. Le nombre de cristaux d'AS situés en dehors des MLS semble augmenter avec la charge théorique des MLS en AS.

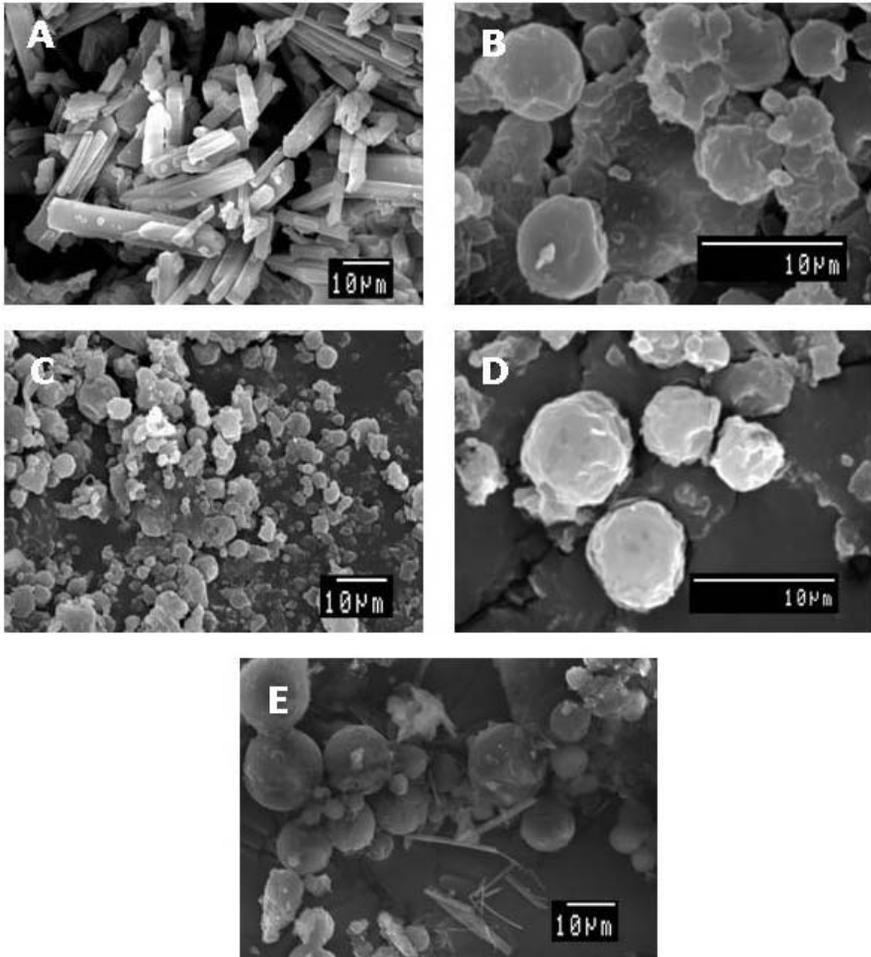


Figure XI-1 : Images de microscopie électronique de (A) AS seul, (B) MLS non chargées en AS, (C) et (D) MLS à 1% en AS, (E) MLS à 25% en AS

XI.4.3 Analyse thermique des MLS par DSC

Les thermogrammes obtenus pour l'AS seul, pour le Compritol® 888 ATO, pour le Lutrol® F68, pour les MLS sans AS, pour les MLS à 1% et à 20% en AS sont présentés à la figure XI-2.

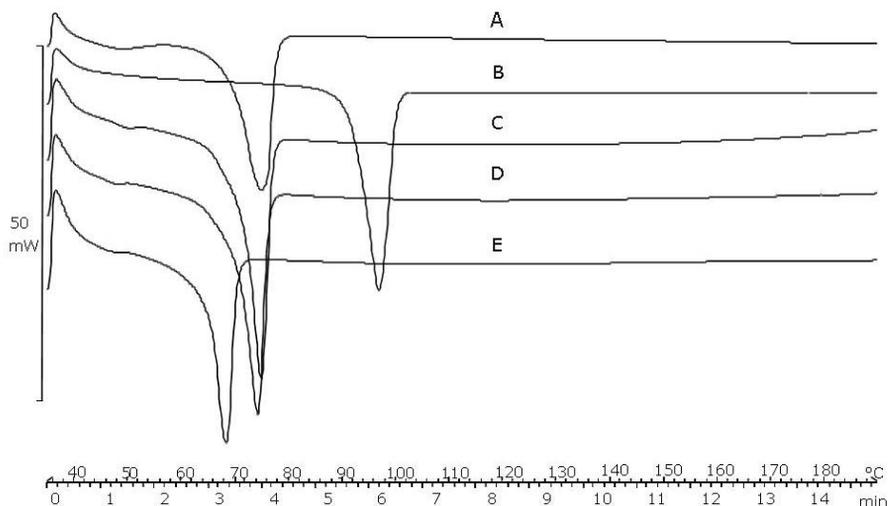


Figure XI-2 : Thermogrammes de (A) Compritrol® 888 ATO, (B) AS, (C) MLS sans AS, (D) MLS chargées à 1% en AS, (E) MLS chargées à 20% en AS

L'analyse par DSC a montré que l'excipient lipidique utilisé pour la fabrication des MLS, à savoir le béhénate de glycérol (Compritrol® 888 ATO), présente un point de fusion égal à 74°C. Pour rappel, comme mentionné à la page 149, le point de fusion de l'AS se situe à 97°C. Or les thermogrammes des MLS contenant de l'AS (tant à 1 qu'à 20%) ne montrent aucun endotherme correspondant à la fusion de l'AS.

A priori, cette observation pourrait indiquer que l'AS ne se trouve plus sous forme cristalline lorsqu'il est incorporé dans les MLS.

Afin de confirmer cette hypothèse, des thermogrammes ont été réalisés sur des mélanges physiques contenant différentes proportions de Compritrol® 888 ATO et d'AS (Figure XI-3). Il a été observé que, même lorsque la quantité d'AS était de 30% dans les mélanges physiques (Compritrol® 888 ATO /AS; 70/30) c.-à-d. supérieure à la quantité relative d'AS contenue dans les MLS produites, le pic de fusion de l'AS n'apparaît pas sur les thermogrammes (Figure XI-3.C). Sur le thermogramme du

mélange physique contenant 50% de Compritol® 888 ATO et 50% d'AS, un petit endotherme correspondant probablement à la fusion de l'AS apparaît (Figure XI-3D) et gagne en importance lorsque la concentration relative en AS dans le mélange physique augmente (Figure XI-3E).

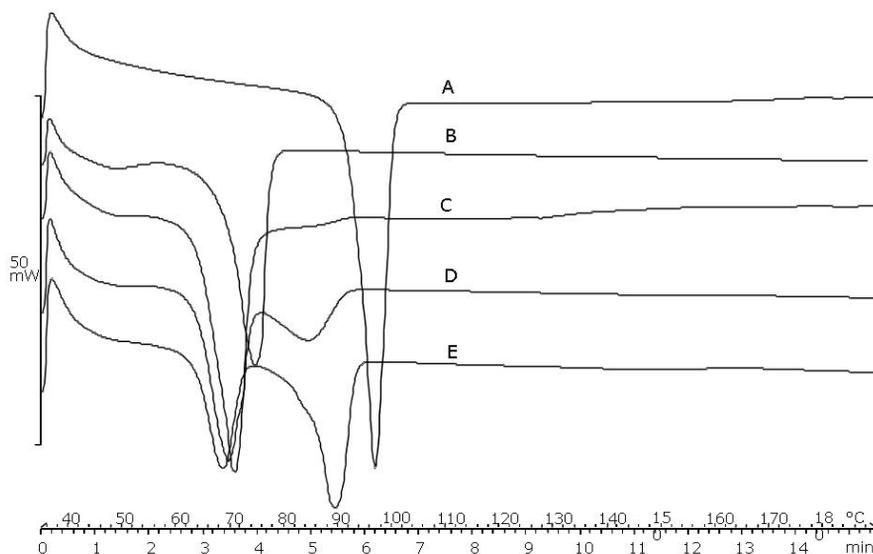


Figure XI-3 : Thermogrammes de (A) AS, (B) Compritol® 888 ATO, (C) mélange physique Compritol® 888 ATO /AS (70/30), (D) mélange physique Compritol® 888 ATO /AS (50/50), (E) mélange physique Compritol® 888 ATO /AS (30/70)

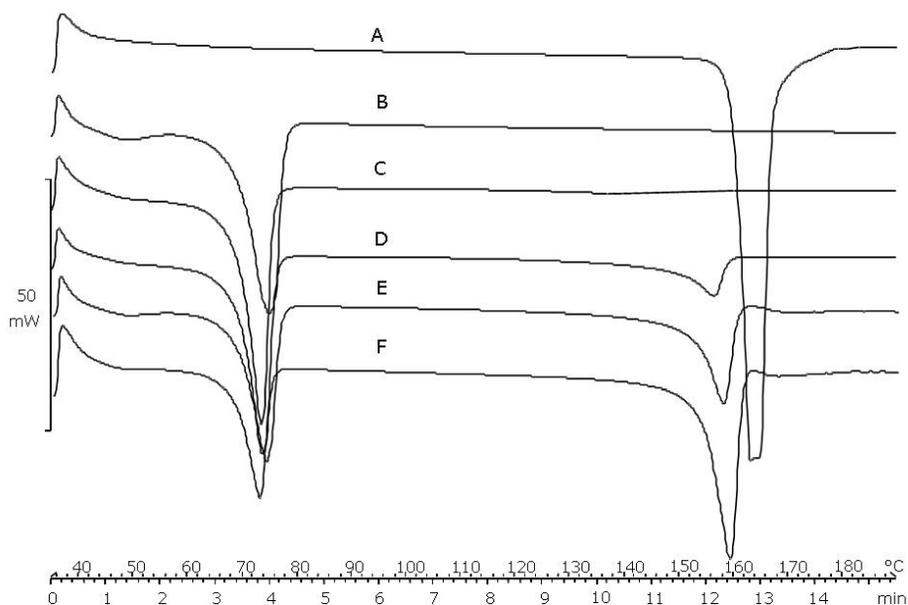
Les observations faites sur les thermogrammes des mélanges physiques peuvent s'expliquer par le fait que, durant la phase de chauffage de l'analyse thermique, l'AS se dissout dans le Compritol® 888 ATO vu que ce dernier possède un point de fusion plus bas que celui de l'AS. Le pic de fusion de l'AS n'apparaîtrait donc qu'à partir du moment où le Compritol® 888 ATO fondu est saturé en AS. Ce phénomène a été décrit antérieurement pour d'autres excipients lipidiques (Gines et al., 1995; Passerini et al., 2002; Passerini et al., 2003). Vippagunta a pour sa part

précisé que les analyses par DSC ne convenaient pas à la caractérisation de l'état solide à température ambiante d'un principe actif lorsque celui-ci est soluble dans l'excipient fondu (Vippagunta et al., 2002).

La technique de DSC ne nous permet donc pas de conclure quant à l'état cristallin ou non cristallin de l'AS au sein des MLS.

Cependant l'analyse et l'intégration des pics de fusion de l'AS obtenus sur les thermogrammes des mélanges physiques Compritol® 888 ATO /AS (50/50 et 30/70) a permis de déterminer la solubilité de l'AS dans le Compritol® 888 ATO fondu. Celle-ci est égale à $0,309 \pm 0,023$ mg AS/mg Compritol® 888 ATO (n=6).

La même expérience a ensuite été réalisée avec le salbutamol en vue de déterminer sa solubilité dans le Compritol® 888 ATO fondu et de montrer que celle-ci est moindre que la solubilité de l'AS dans le même excipient. Les thermogrammes obtenus sont représentés à la figure XI-4. La solubilité maximale du salbutamol dans le Compritol® 888 ATO fondu est de $0,104 \pm 0,003$ mg salbutamol/mg Compritol® 888 ATO (n=6). Le thermogramme C de la figure XI-4 montre effectivement une disparition du pic de fusion du salbutamol lorsque sa concentration relative est de 10% par rapport au Compritol® 888 ATO.



**Figure XI-4 : Thermogrammes de
(A) Salbutamol, (B) Compritol® 888 ATO,
(C) mélange physique Compritol® 888 ATO /Salbutamol (90/10),
(D) mélange physique Compritol® 888 ATO /Salbutamol (80/20),
(E) mélange physique Compritol® 888 ATO /Salbutamol (50/50)**

Une dépression du point de fusion du Compritol® 888 ATO a été observée sur les thermogrammes de mélanges physiques de Compritol® 888 ATO et d'AS testés (30/70; 50/50 et 70/30) mais également sur les thermogrammes des MLS contenant 20% d'AS. Ceci n'a au contraire pas été mis en évidence avec les mélanges physiques contenant le salbutamol (et le Compritol® 888 ATO) et ce même aux hautes concentrations en salbutamol.

Ce phénomène de dépression du point de fusion d'un excipient lipidique a déjà été observé dans les cas de nanoparticules lipidiques (Venkateswarlu et al., 2004) et a été attribué à la présence de concentrations importantes en tensioactifs (Jenning et al., 2000). Ce n'est pas le cas pour les échantillons que nous avons testés. Cependant, au vu

de sa structure chimique, on peut considérer que, contrairement au salbutamol, l'AS possède des propriétés amphiphiles. Ceci pourrait expliquer, qu'à l'instar des composés tensioactifs, l'AS provoque à forte concentration une dépression du point de fusion de l'excipient dans lequel il s'est dissous.

En conclusion, certaines informations intéressantes ont pu être obtenues à partir de l'analyse thermique par DSC. Toutefois, il n'a pas été possible d'élucider l'état sous lequel se trouve l'AS dans les MLS. C'est la raison pour laquelle il a été nécessaire de recourir à une autre méthode, à savoir la diffractométrie des rayons X (Voir paragraphe ci-dessous).

XI.4.4 Analyse de la forme cristalline de l'AS dans les MLS par diffraction des rayons-X

Les diffractogrammes des rayons X de l'AS, du Compritol® 888 ATO, du Lutrol® F68, des MLS non chargées en AS, des MLS à 5% et à 20 % en AS ainsi que des mélanges physiques à différentes proportions de Compritol® 888 ATO et d'AS (95/5 et 80/20) sont présentés à la figure XI-5.

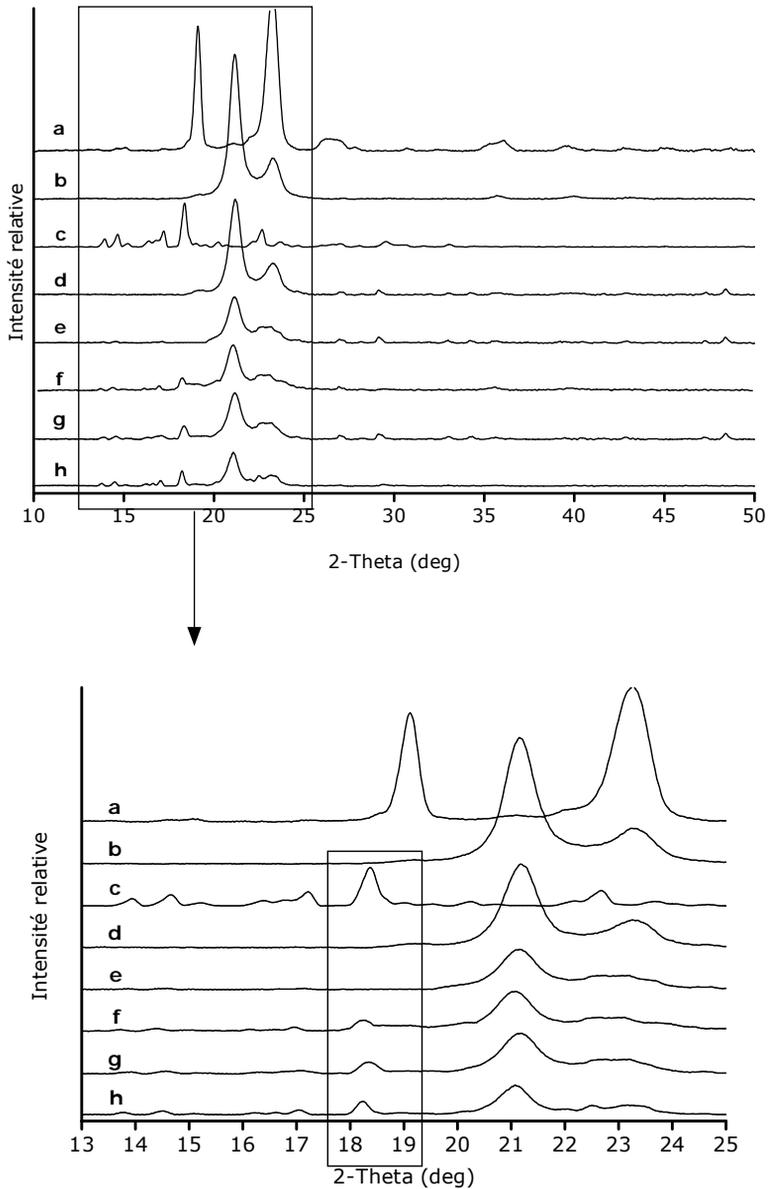


Figure XI-5 : Diffractogrammes des rayons X de (a) Lutrol[®] F68, (b) Compritol[®] 888 ATO, (c) AS, (d) MLS non chargées en AS, (e) MLS 5% AS, (f) MLS 20% AS, (g) Mélange physique Compritol[®] 888 ATO/AS (95/5), (h) Mélange physique Compritol[®] 888 ATO/AS (80/20)

En comparant les diffractogrammes des MLS à 5 et à 20% en AS avec ceux des mélanges physiques correspondants, on observe que le pic caractéristique de l'AS localisé à $18,4\ 2\theta$ est présent dans le cas des mélanges physiques ainsi que des MLS à 20% en AS. Ce pic n'apparaît pas sur le diffractogramme des MLS à 5% en AS.

L'AS serait donc au moins partiellement à l'état cristallin dans les MLS à 20% en AS tandis qu'il apparaît principalement non cristallin et serait donc à l'état amorphe ou dissous dans les MLS à 5% en AS.

XI.4.5 Détermination de la charge réelle en AS dans les MLS

XI.4.5.1 Validation de la méthode d'extraction de l'AS

Les concentrations en AS obtenues après extraction ainsi que les rendements d'extraction calculés sont exposés dans le tableau XI-1 et représentés à la figure XI-6.

Tableau XI-1 : Détermination des concentrations en AS après extraction et calculs des rendements d'extraction

N° échantillon	Conc. théor. en AS de l'échantillon (mg AS/g Compritol®)	Conc. théor. en AS de la solution issue de l'extraction (µg AS/ml)	Conc. en AS après extraction (µg AS/ml)	Rendement de l'extraction(%)	Moyenne des rendements (%) ± écart-type
1.1	0,501	5,01	5,01	100,03	98,79 ± 0,95
1.2	0,492	4,92	4,87	98,95	
1.3	0,504	5,04	4,95	98,24	
2.1	4,921	49,21	49,14	99,86	99,07 ± 0,90
2.2	4,872	48,72	47,77	98,06	
2.3	4,914	49,14	48,37	98,44	
3.1	9,844	98,44	98,25	99,81	99,38 ± 0,43
3.2	9,904	99,04	98,41	99,37	
3.3	9,836	98,36	97,32	98,95	
4.1	98,341	983,41	981,38	99,79	98,37 ± 1,42
4.2	102,874	1028,74	997,32	96,95	
4.3	102,472	1024,72	1007,97	98,37	

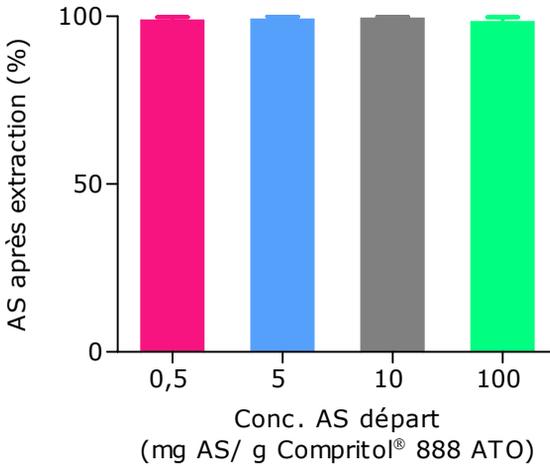


Figure XI-6 : Rendements d'extraction de l'AS à partir du Compritol® 888 ATO

On observe que les taux de récupération ou rendements sont proches de 100% et qu'ils sont constants dans l'intervalle de concentrations étudié. On peut dès lors conclure que la méthode d'extraction de l'AS à partir du Compritol® 888 ATO peut être considérée comme valide en termes de rendements d'extraction.

Cette méthode sera donc utilisée pour la détermination de la charge réelle en AS dans les poudres de MLS (Voir paragraphe suivant).

XI.4.5.2 Détermination de la charge réelle en AS dans les MLS

Les valeurs de charges réelles en AS des poudres de MLS contenant théoriquement 5, 10, 15 et 20% en AS ainsi que les valeurs d'efficacité d'encapsulation (EE) sont résumées dans le tableau XI-2. Pour rappel, les valeurs d'EE présentées dans ce travail tiennent compte à la fois de l'AS incorporé à l'intérieur des MLS mais également de l'AS non incorporé dans les MLS mais contenu dans les poudres de MLS obtenues après lyophilisation (Voir pages 197 et 198). La détermination de l'EE tient donc

essentiellement compte des pertes en AS liées au processus de fabrication. Au vu des résultats, ces pertes sont de l'ordre de 10 à 13% de la quantité en AS initialement mise en œuvre.

Notons également que, comme l'a mentionné Gonzalez-Rothi, la présence de principe actif non incorporé dans le véhicule est souhaitable particulièrement dans le cas des agents bronchodilatateurs. Ceux-ci requièrent à la fois une dose de charge (constituée par la fraction de principe actif non incorporée dans le véhicule) qui agirait rapidement ainsi qu'une libération prolongée du principe actif incorporé dans le véhicule (Gonzalez-Rothi et al., 1995).

Tableau XI-2 : Détermination des charges réelles et des EE de l'AS dans les MLS chargées théoriquement à 5, 10, 15 et 20% en AS

Charge théorique des MLS (%)	Charge réelle (%) ± écart-type (n=3)	Efficacité d'encapsulation (%) ± écart-type (n=3)
5	4,36 ± 0,02	87,30 ± 0,44
10	8,83 ± 0,46	88,27 ± 4,65
15	13,06 ± 0,26	87,08 ± 1,74
20	18,03 ± 0,60	90,17 ± 3,03

XI.5. Conclusion

La caractérisation des MLS contenant l'AS a impliqué tout d'abord la détermination de la densité vraie de ces particules, ce qui a permis d'estimer le diamètre aérodynamique lorsque le diamètre géométrique est connu. La détermination de la densité vraie a d'ores et déjà permis de déterminer, pour les MLS étudiées, la zone de diamètre géométrique adéquate pour l'administration par inhalation.

La microscopie électronique a mis en évidence la forme relativement sphérique et la surface lisse des MLS. Des cristaux d'AS ont été observés lorsque la charge en AS augmente. Ce phénomène pourrait avoir une

influence sur la libération de l'AS à partir des poudres de MLS (Voir chapitre XII).

L'analyse thermique par DSC n'a pas permis d'élucider l'état sous lequel se trouve l'AS dans les MLS. Au final, seule la solubilité de l'AS dans le Compritol® 888 ATO fondu (et dans les conditions opératoires décrites) a pu être déterminée.

L'analyse par diffraction des rayons X a par contre montré que dans les MLS chargées à 20% en AS, l'AS se trouve au moins partiellement à l'état cristallin, ce qui confirme les images de microscopie électronique tandis que l'AS se trouve principalement à l'état non cristallin (amorphe ou dissous) dans les MLS à 5% en AS.

La charge réelle et l'efficacité d'encapsulation de l'AS dans les poudres de MLS ont pu être déterminées par une méthode d'extraction préalablement mise au point et validée.

Retenons principalement de ce chapitre qu'au vu des images de microscopie électronique et des résultats de diffraction des rayons-X, une fraction de l'AS initialement mis en œuvre n'est pas incorporée à l'intérieur des MLS mais se trouve sous forme cristalline en dehors des MLS. Cette proportion d'AS non incorporée augmente avec la charge initiale en AS. Cette fraction d'AS libre n'a pu être isolée des MLS par les techniques de séparation habituellement utilisées. Toutefois, comme cela a été souligné par Gonzalez-Rothi, la présence d'une fraction d'AS libre peut être souhaitable à l'instauration d'un effet pharmacologique rapide (Gonzalez-Rothi et al., 1995).

XI.6. Références bibliographiques

Fiegel J., Fu J., Hanes J., 2004. Poly(ether-anhydride) dry powder aerosols for sustained drug delivery in the lungs. *J.Control.Release* 96 (3), 411-423.

Gines J.M., Veiga M.D., Arias M.J., Rabasco A.M., 1995. Elaboration and thermal study of interactions between cinnarizine and gelucire(R) 53/10 physical mixtures and solid dispersions. *Int.J.Pharm.* 126 (1-2), 287-291.

Gonzalez-Rothi R.J., Schreier H., 1995. Pulmonary delivery of liposome-encapsulated drugs in asthma therapy. *Clinical Immunotherapy* 4 (5), 331-337.

Jaspart S., Piel G., Delattre L., Evrard B., 2005. Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterisation, drug release and applications. *Expert Opini.Drug Deliv.* 2 (1), 75-87.

Jenning V., Thunemann A.F., Gohla S.H., 2000. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int.J.Pharm.* 199 (2), 167-177.

Malcolmson R.J., Embleton J.K., 1998. Dry powder formulations for pulmonary delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1 (9), 394-398.

Passerini N., Perissuti B., Albertini B., Voinovich D., Moneghini M., Rodriguez L., 2003. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. *J.Control.Release* 88, 263-275.

Passerini N., Perissuti B., Moneghini M., Voinovich D., Albertini B., Cavallari C., Rodriguez L., 2002. Characterization of carbamazepine-Gelucire 50/13 microparticles prepared by a spray-congealing process using ultrasounds. *J.Pharm.Sci.* 91 (3), 699-707.

Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition, 2005. Conseil de l'Europe. Strasbourg.

Venkateswarlu V., Manjunath K., 2004. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *J.Control.Release* 95, 627-638.

Vippagunta S.R., Maul K.A., Tallavajhala S., Grant D.J.W., 2002. Solid-state characterization of nifedipine solid dispersions. *Int.J.Pharm.* 236 (1-2), 111-123.

Chapitre XII:

Etudes *in vitro* et *ex vivo* de libération de l'AS à partir des microparticules lipidiques solides

XII.1. Introduction

Des études de libération de l'AS ont été réalisées dans le but de mettre en évidence une éventuelle libération prolongée de l'AS à partir des MLS.

Les appareillages permettant l'étude de la libération de principes actifs *in vitro* sont ceux décrits dans la Pharmacopée Européenne pour les essais de dissolution. Parmi ceux-ci on peut citer les méthodes avec palettes et paniers, les cellules à flux continu ainsi que les essais de dissolution spécifiques des dispositifs transdermiques (Pharmacopée Européenne, 2005). Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe aucun test de dissolution qui reproduit les conditions de l'administration par inhalation (Davies et al., 2003).

Dans ce travail de recherche, le but de l'utilisation des MLS est d'obtenir une libération prolongée de l'AS. Or, les MLS devant être administrées par inhalation, la composition du milieu de dissolution à utiliser devrait être la plus proche possible de celle des fluides pulmonaires. Plusieurs auteurs ont ainsi décrits des solutions complexes dont les compositions se rapprocheraient du liquide du tractus respiratoire (Davies et al., 2003; Diems, 1970; Moss, 1979). Malheureusement aucune de ces compositions ne fait actuellement l'objet d'un consensus. Il a également été rapporté que l'ajout de quantités plus ou moins importantes

de surfactants physiologiques (L- α -phosphatidylcholine ou DPPC) pouvait modifier les cinétiques de libération (Davies et al., 2003).

Etant donné qu'aucune composition de fluides pulmonaires ne fait l'unanimité et que de nombreux composés endogènes pourraient également être ajoutés à ces milieux de dissolution, il a été décidé d'utiliser un tampon isotonique à pH 7,4.

Pour toutes les raisons précédemment citées, les essais de dissolution réalisés n'auront pas pour but de mimer exactement les conditions *in vivo* mais bien de comparer le profil de libération de différentes formulations (MLS chargées à différents pourcentages en AS).

XII.2. Etude *in vitro* de libération de l'AS à partir des MLS

XII.2.1 Matériel et méthodes

Les essais de dissolution ont été réalisés selon la méthode à paniers rotatifs décrite dans le chapitre « Essai de dissolution des formes solides » de la Pharmacopée Européenne, à l'aide d'un appareil Sotax[®] AT7 couplé à un échantillonneur Sotax[®] C615.

Les MLS utilisées sont chargées théoriquement à 5, 10, 15 et 20% en AS et ont été fabriquées selon les paramètres décrits à la page 188. Leurs tailles ont été déterminées par diffractométrie laser (Mastersizer 2000[®], Malvern Instruments, Royaume-Uni) préalablement aux essais de libération.

Les échantillons sont pesés de façon à contenir une quantité exactement connue et proche de 10 mg d'AS. Pour chaque type d'échantillon testé, sept répétitions seront effectuées. Afin de connaître la quantité d'AS dans les prises d'essais, l'AS sera préalablement dosé dans les lots de MLS chargées théoriquement à 5-10-15 et 20% en AS par la technique d'extraction et de dosage exposée à la page 198. Le problème majeur rencontré est que les MLS, vu leur densité inférieure à 1, flottent à la surface des bains de dissolution. Les paniers rotatifs ont donc été choisis

afin d'assurer l'immersion des MLS. Cependant les mailles des paniers sont trop larges pour empêcher les MLS de s'en échapper. Il a donc fallu enfermer la prise d'essai dans un filtre. Celui-ci a été choisi selon les critères suivants:

- Le filtre doit permettre au liquide de dissolution de circuler librement à travers l'échantillon
- Le seuil de filtration doit permettre d'éviter la fuite des MLS
- Les MLS ne doivent pas colmater le filtre
- L'AS ne peut s'adsorber sur le filtre
- Le filtre doit résister à une immersion de longue durée dans un tampon phosphate à 37°C

Différents filtres ont été testés selon les critères exposés ci-dessus et les filtres Whatman® GF/F n°1825-025 en microfibres de verre (seuil de filtration 0,5 µm) ont finalement été retenus. L'échantillon sera donc placé sur le filtre et un second filtre sera accolé au premier à l'aide de cyanoacrylate. Les échantillons ainsi préparés sont ensuite placés dans les paniers rotatifs qui sont eux-mêmes plongés dans des cuves contenant 800 ml de tampon phosphate isotonique à pH 7,4.

Le bain est thermostaté à 37°C et la vitesse de rotation des paniers est fixée à 150 tours/minute. Des prélèvements de 2 ml sont réalisés aux temps 5, 30 et 60 minutes ainsi qu'aux temps 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 32 et 48 heures et sont dosés par la méthode CLHP décrite aux pages 144 à 146.

A la fin de la manipulation, le résidu des MLS dans les filtres sera récupéré et une extraction de l'AS sera opérée selon la méthode décrite à la page 198. L'AS sera ensuite dosé après extraction sous forme de salbutamol par la méthode chromatographique décrite dans la Pharmacopée Européenne (Pharmacopée Européenne, 2005).

Les profils de libération obtenus pour chacune des formulations testées seront analysés statistiquement et comparés deux à deux. Dans cette optique, les résultats seront exprimés sous forme de moyenne et d'écart-type. Les moyennes seront comparées à chaque temps à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA-1). Les comparaisons multiples

seront réalisées par la méthode de Scheffé. Enfin, un test non paramétrique (Kruskal-Wallis) sera effectué. Les résultats seront considérés comme étant significatifs au niveau d'incertitude de 5% ($p < 0,05$). Le logiciel statistique utilisé est SAS® (version 8.2 pour Windows).

XII.2.2 Résultats et discussion

XII.2.2.1 Détermination préalable de la taille des MLS

Les tailles des particules utilisées pour les essais de libération sont présentées dans le tableau XII-1. La taille y est exprimée à la fois en termes de diamètre volumétrique médian $D_{(v;0,5)}$ (μm) ainsi qu'en pourcentage de particules dont le diamètre géométrique est compris entre 0,5 et 6 μm .

Tableau XII-1 : Taille des MLS utilisées pour les essais de libération

	$D_{(v;0,5)}$ (μm)	MLS de diamètre entre 0,5 et 6 μm (%)
MLS 5% AS	6,18	45,75
MLS 10% AS	6,30	44,80
MLS 15% AS	6,58	43,38
MLS 20% AS	6,77	42,60

XII.2.2.2 Profils de libération

La dissolution de l'AS a été comparée à la libération de l'AS à partir des MLS contenant 5, 10, 15 et 20% en AS. La dissolution de l'AS à partir de mélanges physiques contenant les MLS vierges et l'AS à différentes concentrations relatives (5/95 et 20/80) a également été étudiée. Cela va permettre de mettre en évidence une éventuelle différence entre les profils de libération de l'AS quand celui-ci est incorporé dans les MLS et quand il est seulement physiquement mélangé à celles-ci. Les profils de libération obtenus sont présentés à la figure XII-1.

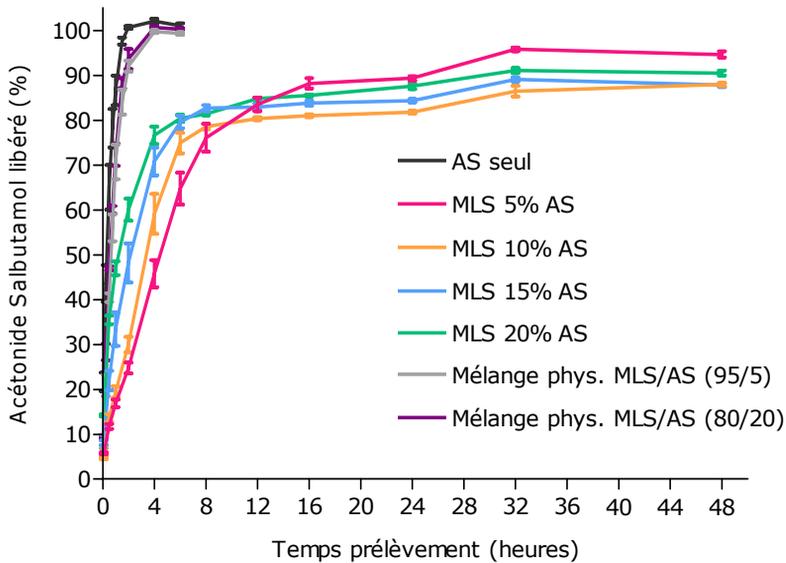


Figure XII-1 : Profils de dissolution de l'AS, de l'AS à partir de MLS à 5-10-15 et 20% en AS et à partir de mélanges physiques contenant des MLS vierges et l'AS (5/95 et 20/80) (n=7)

La figure XII-1 montre que l'AS seul est complètement dissous en moins de deux heures et que la vitesse de libération est la plus faible pour les MLS chargées à 5% en AS. La vitesse de libération augmente avec la charge en AS mais est dans tous les cas inférieure à la vitesse de dissolution intrinsèque de l'AS.

Notons également que le plateau atteint par les MLS à 5 - 10 - 15 et 20% en AS correspond à des pourcentages de libération inférieurs à 100%. Les pourcentages d'AS non libéré au bout de 48h et fournis par les dosages de l'AS résiduel dans les MLS sont présentés au tableau XII-2.

Tableau XII-2: Dosage de l'AS résiduel dans les MLS (exprimé en % par rapport à l'AS mis en œuvre au départ) (n=7)

	MLS 5% AS	MLS 10% AS	MLS 15% AS	MLS 20% AS
AS libéré au bout de 48 heures (%) ± écart-type	95,73 ± 1,09	86,40 ± 3,12	89,06 ± 1,19	91,05 ± 1,56
AS résiduel (%) ± écart type	5,05 ± 1,20	10,35 ± 2,81	9,33 ± 3,56	7,32 ± 1,46

XII.2.2.3 Interprétation statistique des résultats

En ce qui concerne l'interprétation statistique des résultats, les différentes formulations ont fait l'objet de comparaisons multiples à chaque temps. Parmi les nombreuses données issues de cette analyse statistique, les résultats suivants ont été obtenus :

Au temps t= 5 minutes :

- Le pourcentage d'AS seul libéré est déjà significativement différent du pourcentage d'AS libéré à partir des formulations de MLS mais également à partir des mélanges physiques.
- Le pourcentage d'AS libéré à partir des formulations de MLS n'est pas significativement différent de celui à partir des mélanges physiques. Ceci s'explique probablement par la fraction d'AS non incorporé dans les MLS et qui se dissout prioritairement.
- A ce stade de l'expérimentation, seule la libération à partir des MLS à 20% en AS est significativement différente de la libération à partir des MLS à 15, 10 et 5%.

Au temps t= 30 minutes :

- Le pourcentage d'AS seul libéré est significativement différent du pourcentage d'AS libéré à partir des formulations de MLS.
- La libération à partir des MLS à 20% en AS est toujours significativement différente de la libération à partir des MLS à 15, 10 et 5%.

Aux temps $t = 1$ heure et $t = 2$ heures :

- Le pourcentage d'AS seul libéré n'est pas significativement différent des pourcentages d'AS libéré depuis les mélanges physiques AS-MLS mais est significativement différent des pourcentages d'AS libéré à partir des formulations de MLS.
- Les pourcentages de libération à partir des MLS à 20% et à 15% en AS sont significativement différents de ceux des MLS à 10 et 5%. Par contre, les MLS à 20 et 15% en AS présentent des pourcentages de libération qui ne sont pas significativement différents l'un de l'autre.

Aux temps $t = 4$ heures et $t = 6$ heures

- Le pourcentage d'AS seul libéré n'est pas significativement différent des pourcentages d'AS libéré depuis les mélanges physiques AS-MLS mais est significativement différent des pourcentages d'AS libéré à partir des formulations de MLS.
- Le pourcentage de libération d'AS à partir des MLS à 20% en AS est significativement différent de ceux des MLS à 10 et 5% en AS. Tandis que le pourcentage d'AS libéré à partir des MLS à 15% est significativement différent de celui des MLS à 5%.

Au bout de 8 heures :

- Les pourcentages d'AS libéré à partir des MLS se rapprochent du niveau du plateau. A ce stade, les différentes formulations de MLS testées ne diffèrent plus significativement entre elles.

L'intégralité des résultats des comparaisons multiples de l'analyse statistique est présentée à l'Annexe 3 (pages 269 à 279).

En résumé, les tendances générales issues de l'analyse statistique des données de libération sont les suivantes :

- o Les mélanges physiques composés d'AS et de MLS présentent des profils de libération de l'AS qui ne sont pas significativement différents du profil de dissolution de l'AS seul (excepté dans la phase initiale de libération où $t < 1h$). Comme prévu, la libération de l'AS à partir des mélanges

physiques n'est donc pas prolongée. En effet, comme Malamataris et Savolainen l'ont montré, la substance active doit être dissoute ou dispersée dans la matrice lipidique pour être libérée de façon prolongée (Malamataris et al., 1991; Savolainen et al., 2002).

- Dès le départ, la dissolution de l'AS seul est significativement plus rapide que la libération de l'AS à partir des MLS (quelque soit la charge en AS de celles-ci). Ceci confirme le potentiel des MLS à libérer de façon prolongée l'AS qu'elles contiennent.
- La comparaison des formulations de MLS entre elles montre que la libération de l'AS à partir des MLS à 20% en AS est significativement plus lente que celle à partir des MLS à 5% en AS. Si on compare deux à deux chaque formulation de MLS avec celle voisine en termes de concentrations en AS (c.-à-d. MLS 20% AS versus MLS 15 % AS ; MLS 15% AS versus MLS 10 % AS ; MLS 10% AS versus MLS 5% AS), les différences observées sur le graphique des profils de libération (Figure XII-1) ne sont pas significatives aux temps considérés. Au vu des comparaisons entre les libérations de l'AS à partir des MLS à 20% en AS et à partir des MLS à 5% en AS, on peut toutefois raisonnablement affirmer que, dans les MLS, la libération est d'autant plus prolongée que la charge en AS est faible.

XII.2.2.4 Etude du mécanisme de libération

Afin d'élucider les mécanismes contrôlant la libération de l'AS à partir des MLS, un essai de modélisation mathématique du processus de libération a été réalisé. Les mécanismes susceptibles de contrôler la libération à partir d'un système microparticulaire sont multiples.

Parmi ceux-ci, les principaux sont (Washington, 1990) :

- La diffusion du principe actif en dehors des microparticules
- La dissolution du principe actif par pénétration du solvant dans les microparticules

- La dégradation ou la dissolution (érosion) des microparticules

En pratique, le profil de libération peut résulter d'une combinaison de ces différents mécanismes de libération (Washington, 1990).

Etant donné la petite taille des MLS et vu que celles-ci ne sont pas poreuses, ne s'hydratent et ne se dissolvent pas en phase aqueuse, on pourrait s'attendre à priori à ce que la libération de l'AS à partir des MLS soit le résultat d'un phénomène de diffusion (Arifin et al., 2006; Washington, 1990).

Afin de vérifier cette hypothèse, l'équation suivante proposée par Sinclair et Peppas (Sinclair et al., 1984) a été appliquée aux données expérimentales :

$$M_t / M_\infty = k \cdot t^n$$

Où M_t représente la quantité de principe actif libérée au temps t et M_∞ correspond à la quantité totale de principe actif dans le véhicule.

Où n est le paramètre « exposant de la diffusion » et prendra différentes valeurs selon le type de diffusion en présence et selon la géométrie du système :

- Lorsque n est égal à 1, la diffusion obéit à une cinétique d'ordre zéro (Kockisch et al., 2005).
- Dans le cas où la valeur de n est comprise entre 0,5 et 1, la diffusion est qualifiée de non Fickienne (Agnihotri et al., 2004).
- n sera égal à 0,5 en présence d'une diffusion Fickienne à partir d'une matrice plane. Dans ce cas, la libération du principe actif est une fonction linéaire de la racine carrée du temps (= Loi de la racine carrée, forme simplifiée de l'équation d'Higuchi) (Washington, 1990).
- Une diffusion Fickienne à partir de sphères est caractérisée par $n = 0,432$ (Washington, 1990).

La microscopie électronique ayant montré que les MLS étudiées sont relativement sphériques (Voir page 200), l'équation $M_t / M_\infty = k \cdot t^{0,432}$ a été appliquée aux résultats expérimentaux de la première phase de la libération (jusque $M_t/M_\infty = 0,7$) (Ganza-Gonzalez et al., 1999). La figure XII-2 représente la linéarisation des profils de libération de l'AS à partir des MLS à 5 -10 -15 et 20% en AS ainsi que les équations et les r^2 s'y rapportant.

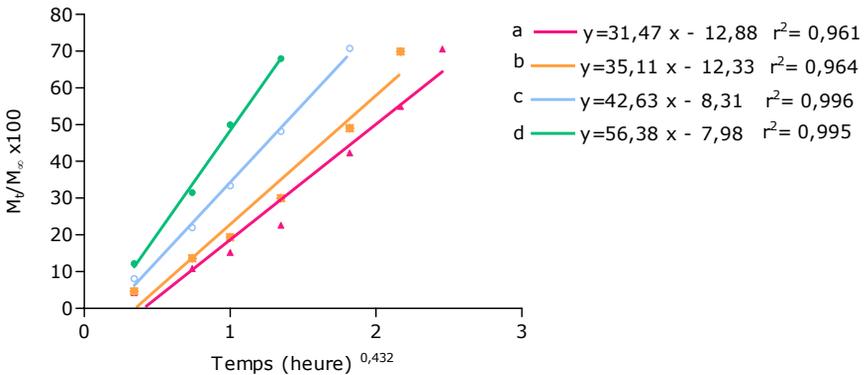
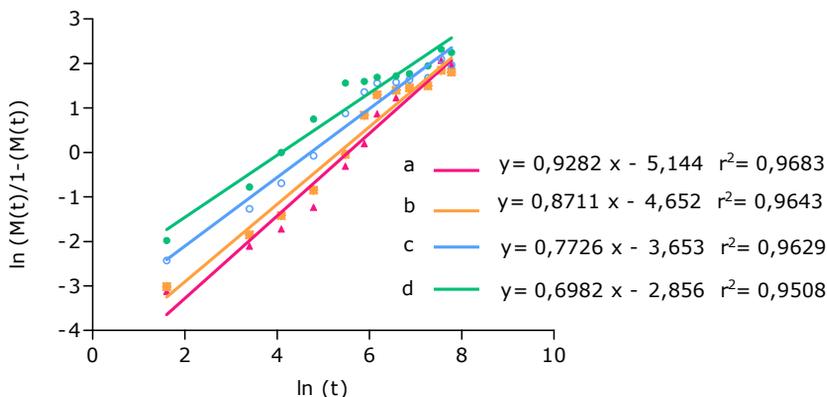


Figure XII-2 : Représentation de la fraction d'AS libérée à partir des (a) MLS 5% AS, (b) MLS 10% AS, (c) MLS 15% AS, (d) MLS 20% AS en fonction du temps^{0,432} (pour $M_t/M_\infty \leq 0,7$)

Les valeurs de r^2 obtenues pour la linéarisation des profils de libération selon l'équation $M_t / M_\infty = k \cdot t^{0,432}$ sont comprises entre 0,961 et 0,995. Au vu de ces résultats, on peut raisonnablement penser que la diffusion est le mécanisme principalement impliqué dans la libération de l'AS à partir des MLS. Notons toutefois qu'il est probable que d'autres mécanismes secondaires interviennent également dans la libération de l'AS à partir des MLS. En effet, les MLS utilisées contenant à la fois de l'AS incorporé dans les particules mais également une fraction d'AS non incorporé (Voir pages 200 et 201), le mécanisme de dissolution intervient vraisemblablement en partie dans le processus de libération de l'AS.

XII.2.2.5 Linéarisation des profils de libération

Afin de faciliter la comparaison des courbes entre elles et de calculer le temps nécessaire à la libération de 25, 50 et 75% de l'AS, une linéarisation a été effectuée, cette fois, sur l'ensemble des données (Figure XII-3). Les valeurs obtenues sont exposées dans le tableau XII-3.



où $M(t)$ représente la fraction d'AS libérée au temps t considérant que $M(\infty)=1$

Figure XII-3 : Linéarisation des profils de libération de l'AS à partir des (a) MLS 5% AS, (b) MLS 10% AS, (c) MLS 15% AS, (d) MLS 20% AS

Tableau XII-3 : Temps (min.) nécessaire à libération de 25% (t_{25}), de 50% (t_{50}) ou de 75% (t_{75}) de l'AS

	AS seul	MLS 5% AS	MLS 10% AS	MLS 15% AS	MLS 20% AS
t_{25} (min.)	6,2	78,1	59,1	27,3	12,4
t_{50} (min.)	16,1	255,0	208,6	113,2	59,8
t_{75} (min.)	40,8	832,8	736,5	469,2	288,7

XII.2.3 Conclusion

L'analyse des résultats suggère qu'une libération prolongée peut être obtenue par incorporation de l'AS dans les MLS. La dissolution de l'AS lorsqu'il se trouve en mélange physique avec des MLS a également été mesurée afin de prouver que le ralentissement de la vitesse de libération de l'AS à partir des MLS s'explique bien par l'incorporation de l'AS dans les MLS et non pas seulement par une éventuelle adsorption de l'AS en surface des MLS.

Dans les MLS, la libération est d'autant plus prolongée que la charge en AS est faible. Cette observation a été rapportée à maintes reprises dans la littérature (Adeyeye et al., 1994; Bodmeier et al., 1992; El Gibaly et al., 2005; Lee et al., 1998; Lewis et al., 1998; Varshosaz et al., 2001).

XII.3. Etude *ex vivo* de libération de l'AS à partir des MLS

XII.3.1 Introduction

Pour l'administration pulmonaire, il est difficile de corrélérer les résultats obtenus *in vitro* avec ce qui se passe *in vivo*. Les essais *in vitro* réalisés ci-dessus ont simplement eu pour but de comparer des formulations les unes par rapport aux autres.

Lorsqu'un effet local est recherché lors de l'administration par inhalation d'un principe actif dans un véhicule galénique, il est particulièrement difficile de mettre en évidence *in vivo* une libération prolongée de ce principe actif. En effet, les dosages plasmatiques de principes actifs sont souvent inadéquats lorsque l'administration n'a pas de visée systémique (Voir page 43). Dès lors, afin d'étudier la libération d'un principe actif au niveau de son site de déposition, il conviendrait :

- Soit d'étudier directement la réponse pharmacologique au cours du temps lorsque cela est possible (c'est le cas pour les bronchodilatateurs). L'AS ayant montré *ex vivo* des résultats

mitigés en termes de bronchodilatation (Voir pages 168 à 170), il n'a pas été possible d'évaluer la cinétique de libération de l'AS au niveau pulmonaire par des mesures de bronchodilatation.

- Soit de récolter les MLS à des temps donnés au niveau de leur site de déposition, ce qui est très difficilement réalisable en pratique (Wichert et al., 1993).

C'est la raison pour laquelle des essais de libération *ex vivo* ont été réalisés en présence de tissus pulmonaires dans le but principal d'évaluer l'influence de la présence d'enzymes pulmonaires sur la libération.

XII.3.2 Matériel

Les MLS utilisées sont chargées théoriquement à 5 et 20% en AS et ont été fabriquées selon les paramètres décrits à la page 188. Les lots de MLS utilisés sont les mêmes que pour les essais précédents utilisant les bains de dissolution à paniers rotatifs ; leurs tailles ont donc été antérieurement déterminées.

Les tissus pulmonaires ont été prélevés à partir de porcs sains fraîchement sacrifiés à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège (Belgique). Après prélèvement, les tissus pulmonaires sont rincés plusieurs fois à l'aide d'une solution aqueuse à 0,9% en NaCl, sont congelés rapidement dans de l'azote liquide (« shock freezing ») puis conservés à -70°C jusqu'à utilisation (Freiwald et al., 2005). Selon Wichert et Rohdewald, cette technique de « shock freezing » permet de maintenir une haute activité des enzymes présentes dans le tissu prélevé (Rohdewald et al., 1990; Wichert et al., 1993).

XII.3.3 Méthodes

Les essais de dissolution ont été réalisés selon une méthode utilisant des membranes de dialyse. Lors de la réalisation d'essais *ex vivo* en présence de tissus biologiques, la technique de dialyse présente l'avantage

de permettre des dosages en milieu propre à condition de choisir un seuil de coupure adéquat permettant la diffusion du principe actif tout en limitant celle des macromolécules biologiques et notamment des protéines. Cette technique présente donc un intérêt évident pour l'obtention d'échantillons destinés à l'analyse chromatographique (Chiap, 2000).

Les échantillons sont placés dans 5 ml de tampon phosphate isotonique à pH 7,4 à l'intérieur de tubes de dialyse Spectra/Por® 6 de 18 mm de largeur et possédant un seuil de coupure de 2000 daltons. Ces tubes sont fermés par des pinces pour dialyse Spectra/Por® et sont placés dans des flacons fermés contenant 80 ml de tampon phosphate isotonique pH 7,4. Le tout est maintenu à 37°C sous agitation.

Les échantillons testés et préparés de façon à contenir chacun 2 mg d'AS, sont les suivants :

- AS (pesé sous forme d'une trituration à 5% dans du lactose)
- MLS 5% AS
- MLS 20% AS
- AS en présence de $\pm 2,5$ g de broyat de poumon de porc
- MLS 5% AS en présence de $\pm 2,5$ g de broyat de poumon de porc
- MLS 20% AS en présence de $\pm 2,5$ g de broyat de poumon de porc

Le broyat de poumon de porc a été obtenu en mixant de petits fragments de tissus à l'aide du mélangeur Ultra-Turrax® T25.

Les échantillons sont placés dans des bains d'agitation thermostatés à 37°C. Des prélèvements d'un ml sont réalisés aux temps 15, 30, 45, 60 et 90 minutes ainsi qu'aux temps 2, 3, 4, 6, 8, 24 et 48 heures et sont remplacés par un ml de tampon phosphate isotonique pH 7,4 frais. Les aliquotes prélevés sont dosés par la méthode chromatographique décrite aux pages 144 à 146.

A la fin de la manipulation, le résidu des MLS issu des échantillons placés en milieu propre, sera récupéré et une extraction de l'AS sera opérée selon la méthode exposée à la page 198. L'AS extrait sera ensuite

dosé sous forme de salbutamol par la méthode chromatographique décrite dans la Pharmacopée Européenne (Pharmacopée Européenne, 2005).

Les résultats obtenus pour chacune des formulations testées seront analysés statistiquement. Pour cela, les résultats seront exprimés sous forme de moyenne et d'écart-type. Pour chacun des temps étudiés, les moyennes des essais réalisés en milieu propre seront comparées à l'aide d'un test t de student aux moyennes des essais correspondants réalisés *ex vivo* (en présence de tissus pulmonaires). Enfin, un test non paramétrique (Wilcoxon) sera effectué. Les résultats seront considérés comme étant significatifs au niveau d'incertitude de 5% ($p < 0,05$). Le logiciel statistique utilisé est SAS® (version 8.2 pour Windows).

XII.3.4 Résultats et discussion

XII.3.4.1 Profils de libération

Les résultats obtenus sont représentés à la figure XII-4.

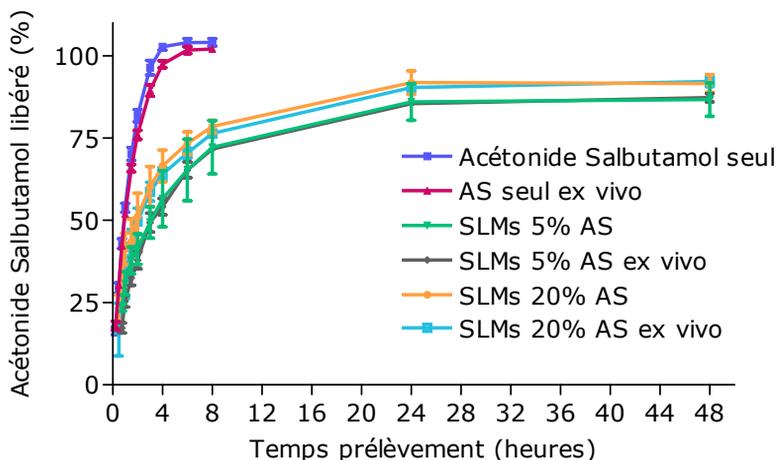


Figure XII-4 : Dissolution de l'AS et libération de l'AS à partir des MLS à 5 et 20% en AS – Comparaison des résultats obtenus en milieu propre et en conditions *ex vivo*

Partie expérimentale

A l'analyse de la figure XII-4, on observe que les profils de libération de l'AS en milieu propre et en présence de fragments de tissus pulmonaires porcins sont superposables deux à deux pour chacune des trois formulations testées (AS seul, MLS 5% AS et MLS 20% AS).

A priori, la présence de tissus pulmonaires et de leurs enzymes intrinsèques ne semble pas affecter la libération de l'AS à partir des MLS. Ceci sera confirmé par l'analyse statistique (Voir paragraphe suivant). Bien qu'il convienne de rester particulièrement prudent lors de corrélations *in vitro/ in vivo*, les résultats obtenus sont encourageants dans l'optique de prolonger *in vivo* la libération d'un principe actif à partir de MLS.

Notons également que la libération de l'AS à partir des MLS à 5% en AS semble plus lente qu'à partir des MLS à 20% en AS, cependant cette différence est sensiblement moins marquée que pour les essais utilisant la technique des bains de dissolution à paniers rotatifs.

Comme c'était déjà le cas pour les essais *in vitro* réalisés dans les bains de dissolution, les plateaux obtenus au bout de 24 heures (et à fortiori au bout de 48 heures) de libération correspondent à des valeurs inférieures à 100%. Les pourcentages d'AS non libéré au bout de 48h et fournis par les dosages de l'AS résiduel dans les MLS sont présentés dans le tableau XII-4.

Tableau XII-4: Dosage de l'AS résiduel dans les MLS en milieu propre (exprimé en % par rapport à l'AS mis en œuvre au départ) (n=3)

	MLS 5% AS	MLS 20% AS
AS libéré au bout de 48 heures (%) ± écart-type	86,72 ± 8,82	91,61 ± 4,62
AS résiduel (%) ± écart type	12,06 ± 3,52	6,41 ± 2,24

On observe qu'un certain pourcentage d'AS n'est pas libéré au bout de 48 heures. Notons que lorsque l'expérience est prolongée au-delà de 48 heures, une partie de l'AS préalablement libéré dans le milieu récepteur se

dégrade en salbutamol. En pratique, le dosage de l'AS total dans le milieu récepteur n'atteindra donc jamais les 100%.

XII.3.4.2 Interprétation statistique des résultats

Les conclusions faites à priori à partir des graphiques présentant les profils de libération ont été affinées par une analyse statistique des résultats. Celle-ci s'est intéressée spécifiquement à la comparaison deux à deux, à chaque temps étudié, des profils de libération obtenus en milieu propre et leurs équivalents obtenus *ex vivo*.

Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative entre les pourcentages de libération obtenus en milieu propre et en présence de tissus biologiques pour les trois types de comparaisons effectués (AS seul versus AS seul *ex vivo* ; MLS 5% AS versus MLS 5% AS *ex vivo* ; MLS 20% AS versus MLS 20% AS *ex vivo*).

L'intégralité des résultats des comparaisons multiples de l'analyse statistique est présentée à l'Annexe 4 (pages 280 à 287).

XII.4. Conclusion

Les essais réalisés *in vitro* dans l'appareil à paniers rotatifs ont mis en évidence une libération prolongée de l'AS depuis les MLS comparativement à la libération de l'AS à partir d'un simple mélange physique entre l'AS et des MLS vierges.

La libération de l'AS s'est avérée être d'autant plus prolongée que la charge initiale théorique en AS est faible. Cela s'explique par le fait que l'incorporation de la molécule est d'autant plus efficace que la charge est faible. Pour rappel, les images de microscopie électronique (Voir page 200) ont effectivement montré que lorsqu'on tente d'augmenter la charge en AS des MLS, on observe l'apparition de cristaux d'AS à l'extérieur des MLS. Ce sont très probablement ces cristaux qui se dissolvent le plus rapidement.

Une seconde étude utilisant la technique de dialyse a été menée dans le but de mettre en évidence une éventuelle influence de la présence de

tissus pulmonaires (et particulièrement de leurs enzymes) sur la libération de l'AS à partir des MLS.

Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence entre les profils de libération obtenus en milieu propre et ceux obtenus lorsque les MLS sont mises en présence de fragments de tissu pulmonaire porcin.

En attendant de pouvoir confirmer ces résultats par des études *in vivo*, on peut d'ores et déjà considérer les MLS étudiées (qui possèdent une taille adéquate pour l'administration par inhalation) comme des véhicules prometteurs susceptibles de prolonger la libération d'un principe actif.

XII.5. Références bibliographiques

Adeyeye C.M., Price J.C., 1994. Development and evaluation of sustained-release ibuprofen-wax microspheres. II. In vitro dissolution studies. *Pharm.Res.* 11 (4), 575-579.

Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N., Aminabhavi T.M., 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J.Control.Release* 100 (1), 5-28.

Arifin D.Y., Lee L.Y., Wang C.H., 2006. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Adv.Drug Deliver.Rev.* 58 (12-13), 1274-1325.

Bodmeier R., Wang J., Bhagwatwar H., 1992. Process and formulation variables in the preparation of wax microparticles by a melt dispersion technique. I. Oil-in-water technique for water-insoluble drugs. *J.Microencapsul.* 9 (1), 89-98.

Chiap P., 2000. Association de la dialyse à la chromatographie liquide pour le dosage automatisé de médicaments dans le plasma. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sc. Pharmaceutiques, Université de Liège, Belgique.

Davies N.M., Feddah M.R., 2003. A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products. *Int.J.Pharm.* 255 (1-2), 175-187.

Diems K., 1970. Documenta Geigy Scientific Tables. 7th Edition, 523-524.

El Gibaly I., Abdel-Ghaffar S.K., 2005. Effect of hexacosanol on the characteristics of novel sustained-release allopurinol solid lipospheres (SLS): factorial design application and product evaluation. *Int.J.Pharm.* 294 (1-2), 33-51.

Freiwald M., Valotis A., Kirschbaum A., McClellan M., Murdter T., Fritz P., Friedel G., Thomas M., Hogger P., 2005. Monitoring the initial pulmonary absorption of two different beclomethasone dipropionate aerosols employing a human lung reperfusion model. *Respir.Res.* 6 (1), 21-36.

Ganza-Gonzalez A., Anguiano-Igea S., Otero-Espinar F.J., Blanco Mendez J., 1999. Chitosan and chondroitin microspheres for oral-administration controlled release of metoclopramide. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 48 (2), 149-155.

Kockisch S., Rees G.D., Tsibouklis J., Smart J.D., 2005. Mucoadhesive, triclosan-loaded polymer microspheres for application to the oral cavity:

preparation and controlled release characteristics. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 59 (1), 207-216.

Lee B.J., Choe J.S., Kim C.K., 1998. Preparation and characterization of melatonin-loaded stearyl alcohol microspheres. *J.Microencapsul.* 15 (6), 775-787.

Lewis L., Boni R., Adeyeye C.M., 1998. Effect of emulsifier blend on the characteristics of sustained release diclofenac microspheres. *J.Microencapsul.* 15 (3), 283-298.

Malamataris S., Panagopoulou A., Hatzipantou P., 1991. Controlled release from glycerol palmito-stearate matrices prepared by dry-heat granulation and compression at elevated temperature. *Drug.Dev.Ind.Pharm.* 17, 1765-1777.

Moss O.R., 1979. Simulants of lung interstitial fluid. *Health Phys.* 36 (3), 447-448.

Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition, 2005. Conseil de l'Europe. Strasbourg.

Rohdewald P., von Eiff M., Würthwein G., 1990. Aktivierung von beclometason-dipropionat in bronchialsekret sowie rezeptoraffinität und löslichkeit inhalativ angewandter glukokortikoide. *Atemw.-Lungenkrkh.* 16 (2), 79-84.

Savolainen M., Khoo C., Glad H., Dahlqvist C., Juppo A.J., 2002. Evaluation of controlled-release polar lipid microparticles. *Int.J.Pharm.* 244, 151-161.

Sinclair G.W., Peppas N.A., 1984. Analysis of non-fickian transport in polymers using simplified exponential expressions. *Journal of Membrane Science* 17 (3), 329-331.

Varshosaz J., Keihanfar M., 2001. Development and evaluation of sustained-release propranolol wax microspheres. *J.Microencapsul.* 18 (3), 277-284.

Washington C., 1990. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *Int.J.Pharm.* 58 (1), 1-12.

Wichert B., Rohdewald P., 1993. Low molecular weight PLA: a suitable polymer for pulmonary administered microparticles? *J.Microencapsul.* 10 (2), 195-207.

Chapitre XIII:

Formulation de poudres pour inhalation à base de microparticules lipidiques solides contenant l'acétonide de salbutamol

XIII.1. Introduction

Un des objectifs du travail est de mettre au point une poudre pour inhalation à partir de laquelle le principe actif serait libéré de façon prolongée. Or, vu que par lyophilisation il est possible d'isoler sous forme sèche les MLS chargées en AS, différentes formulations de poudres pour inhalation à base de MLS-AS seront mises au point et étudiées.

Comme exposé à la page 33, l'avantage principal des formes sèches est d'offrir une plus grande stabilité en comparaison avec les autres formes destinées à l'inhalation (solutions et suspensions).

Ce chapitre traitera donc principalement de l'optimisation des formulations de poudres pour inhalation à base de MLS contenant l'AS. Pour ce faire, différentes formulations ont été réalisées et comparées entre elles par l'évaluation *in vitro* de la fraction respirable. Ces mesures de fractions respirables permettront de déterminer et de quantifier un éventuel effet de la formulation sur la déposition pulmonaire et de dégager une formulation optimale.

La dose efficace en AS dans le traitement de la crise d'asthme aiguë ainsi que dans la prophylaxie des épisodes asthmatiques notamment nocturnes n'étant pas connue, le dosage de référence choisi pour l'AS sera

du même ordre de grandeur que celui du salbutamol dans les inhalateurs à poudre sèche (IPS). Comme il n'existe sur le marché belge aucun IPS à base de salbutamol, les dosages de références ont donc été obtenus d'après la composition de spécialités françaises (ex. : Asmasal[®] clickhaler, Buventol[®] easyhaler, Ventodisks[®], Ventilastin[®] Novolizer). Chaque dose unitaire de ces spécialités contient 100 ou 200 µg de salbutamol.

Comme décrit à la page 34, les poudres micronisées sont généralement cohésives (Byron, 2006), ce qui complique le remplissage des dispositifs ainsi que la redispersion de la poudre lors de l'inhalation. C'est la raison pour laquelle, les poudres étudiées seront formulées par utilisation d'excipients porteurs (Staniforth, 1987). L'excipient porteur consiste en un excipient de grande taille particulière (30 à 100 µm) qui offre une surface d'adhésion au principe actif micronisé.

Le premier excipient porteur qui sera étudié est le lactose. C'est l'excipient porteur le plus couramment utilisé. Le lactose présente les avantages d'être relativement bon marché et d'être bien connu d'un point de vue toxicologique (Steckel et al., 2004).

Le cas particulier de l'administration des MLS sous forme de poudre pour inhalation (combiné à des excipients porteurs et micronisés) n'a jusqu'à présent jamais été abordé dans la littérature. En effet, à l'heure actuelle, toutes les poudres pour inhalation disponibles sur le marché ou ayant fait l'objet d'une étude de formulation, contiennent un principe actif sous forme micronisée. Aucune étude ne décrit la formulation de poudres pour inhalation à base d'un principe actif contenu au sein de particules lipidiques « micronisées ». Il est donc envisageable que l'affinité des excipients porteurs traditionnellement utilisés (lactose, mannitol, glucose...) envers les constituants lipidiques des MLS ne soit pas adéquate pour assurer à la fois une adhésion suffisante des MLS tout en permettant leur détachement lors de l'inhalation. C'est la raison pour laquelle des MLS de grande taille seront également testées comme excipient porteur.

On se souvient qu'afin d'éviter une adhésion trop importante entre le principe actif et l'excipient porteur, il convient d'ajouter un excipient micronisé (généralement appelé excipient compétiteur). Pour rappel, deux

théories s'opposent quant à l'importance ou non de l'ordre d'ajout des excipients porteur et micronisé (Hersey, 1975; Lucas et al., 1998) (Voir pages 34 à 39). Dans le cadre de notre recherche, la préférence sera donnée à la théorie la plus communément admise qui est celle de la saturation par l'excipient micronisé des sites à haute énergie de fixation de l'excipient porteur (Ganderton, 1992; Hersey, 1975; Malcolmson et al., 1998; Zeng et al., 1999). Ainsi, dans les formulations contenant un excipient compétiteur, celui-ci sera mélangé à l'excipient porteur avant d'y ajouter le principe actif.

Différents excipients compétiteurs seront testés. Comme suggéré par Zeng, des excipients micronisés de la même nature que l'excipient porteur seront utilisés, à savoir du lactose micronisé (lorsque l'excipient porteur est le lactose) ainsi que des MLS non chargées en AS (dans le cas où des MLS de grande taille seront utilisées comme excipient porteur) (Zeng et al., 1998). Le stéarate de magnésium sera également testé comme excipient compétiteur (Ganderton, 1992).

XIII.2. Matériel

Les MLS contenant l'AS qui seront utilisées pour les essais de formulation de poudre pour inhalation sont celles chargées à 5% en AS, fabriquées selon les paramètres décrits page 188. Leur taille a été déterminée par diffractométrie laser (Mastersizer 2000[®], Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni) préalablement aux essais de formulation.

Les excipients porteurs testés sont du lactose INHALAC 230 Meggle ($D_{(v;0,5)} = 50 \mu\text{m}$) (Wasserburg, Allemagne) ainsi que des MLS de grande taille. Ces dernières ont été obtenues en émulsionnant sous agitation manuelle 5g de Compritol[®] 888 ATO fondu dans 95g d'eau contenant 0,5% de Lutrol[®] F68 et préalablement chauffée à la même température que l'excipient lipidique. La suspension obtenue après refroidissement a ensuite été lyophilisée à l'aide d'un appareil de type Heto[®] DW8 de Heto-Holten (Allerød, Danemark). Les MLS obtenues ont ensuite été triées sur tamis

oscillant afin d'isoler celles de plus de 63 μm (valeur choisie selon les seuils de coupure des tamis disponibles). Les MLS recueillies sur le tamis seront utilisées comme excipient porteur dans les essais de formulation.

Les excipients compétiteurs sont le lactose micronisé SORBALAC 400 Meggle ($D_{(v;0,5)} = 2,5 \mu\text{m}$) (Wasserburg, Allemagne), le stéarate de magnésium (Bufa Pharmaceutical Products, Belgique) ainsi que des MLS non chargées en AS et fabriquées selon les conditions optimales de fabrication détaillées à la page 123.

XIII.3. Méthodes

XIII.3.1 Formulation des poudres pour inhalation

Les différentes formulations de poudres pour inhalation testées ont été réalisées manuellement selon la méthode de dilution géométrique. La masse totale de poudre est de 5 grammes par condition.

Les poudres pour inhalation à tester sont formulées de façon à contenir 10% de MLS à 5% en AS. Pour chacune des formulations, trente gélules en gélatine ivoire n°3, ont été remplies manuellement avec 60 mg de poudre, c.-à-d. 6 mg de MLS à 5% en AS ($\pm 300 \mu\text{g AS/gélule}$), ce qui équivaut à plus ou moins deux tiers du volume de la gélule.

La composition des poudres formulées et testées est détaillée au tableau XIII-1. Notons que la déposition de la poudre constituée exclusivement de MLS à 5% en AS sera également étudiée (Poudre n°1-Tableau XIII-1).

Afin de connaître la quantité exacte d'AS dans les prises d'essais, l'AS sera au préalable dosé dans les lots de MLS chargées théoriquement à 5% en AS, par la technique d'extraction et de dosage détaillée page 198.

Tableau XIII-1 : Composition des poudres pour inhalation à base de MLS à 5% d'AS

N° poudre	Composition	% (m/m)	Abréviation utilisée
1	MLS 5% AS	100	M100
2	MLS 5% AS Lactose	10 90	L90
3	MLS 5% AS Lactose Lactose micronisé	10 89 1	L89LM1
4	MLS 5% AS Lactose Lactose micronisé	10 85 5	L85LM5
5	MLS 5% AS Lactose Lactose micronisé	10 80 10	L80LM10
6	MLS 5% AS Lactose MLS vierges	10 89 1	L89M1
7	MLS 5% AS Lactose MLS vierges	10 85 5	L85M5
8	MLS 5% AS Lactose MLS vierges	10 80 10	L80M10
9	MLS 5% AS Lactose Stéarate de Mg	10 89 1	L89S1
10	MLS 5% AS Lactose Stéarate de Mg	10 85 5	L85S5
11	MLS 5% AS Lactose Stéarate de Mg	10 80 10	L80S10
12	MLS 5% AS MLS grande taille	10 90	G90
13	MLS 5% AS MLS grande taille MLS vierges	10 89 1	G89M1
14	MLS 5% AS MLS grande taille MLS vierges	10 85 5	G85M5
15	MLS 5% AS MLS grande taille MLS vierges	10 80 10	G80M10

XIII.3.2 Evaluation in vitro de la déposition des poudres pour inhalation

L'uniformité de la dose délivrée, la dose en particules fines et la fraction respirable ont été déterminées grâce aux appareils suivants:

- o un impacteur à cascade en verre (« Twin Impinger ») (Voir schéma page 41)
- o un récupérateur de la dose pour inhalateur à poudre sèche
- o une pompe à vide de type « heavy duty pump » (0-120 litres/minute)
- o un manomètre (0-10 KPa)
- o un régulateur de flux destiné à éliminer toute variation du flux durant la mesure

Tous ces appareils proviennent de chez Copley Instruments (Nottingham, Royaume-Uni) et sont conformes aux prescriptions de la Pharmacopée Européenne (Pharmacopée Européenne, 2005).

Au préalable, le débit d'air traversant l'appareil sera mesuré à l'aide d'un manomètre et réglé à 60 ± 5 litres par minutes comme spécifié dans la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition au chapitre 2.9.18 « Evaluation aérodynamique des particules fines ».

Le solvant utilisé pour recueillir le principe actif au niveau des deux étages de l'impacteur doit permettre la solubilisation de celui-ci. Or, vu que l'AS est administré dans des MLS, le solvant choisi est le chloroforme car il solubilise à la fois les MLS et l'AS. L'AS sera finalement dosé sous forme de salbutamol par la méthode CLHP de la Pharmacopée Européenne après une extraction CHCl_3 - HCl 0,1N (Voir page 198).

Le dispositif pour inhalation avec lequel les poudres ont été administrées dans l'étude de déposition est un appareil mono-dose rechargeable nommé Cyclohaler® (Figure XIII-1A). La gélule est placée dans une encoche de forme adéquate (Figure XIII-1B). Par pression sur deux boutons poussoirs situés de part et d'autre du dispositif, la gélule est percée aux deux pôles au moyen de deux paires de quatre aiguilles (Figure XIII-1C). Lors de l'inhalation, la gélule passe dans la chambre de rotation

et se met à tourner à cause des turbulences induites par l'aspiration. Ce mouvement de rotation provoque la libération de la poudre contenue dans la gélule (Figure XIII-2).

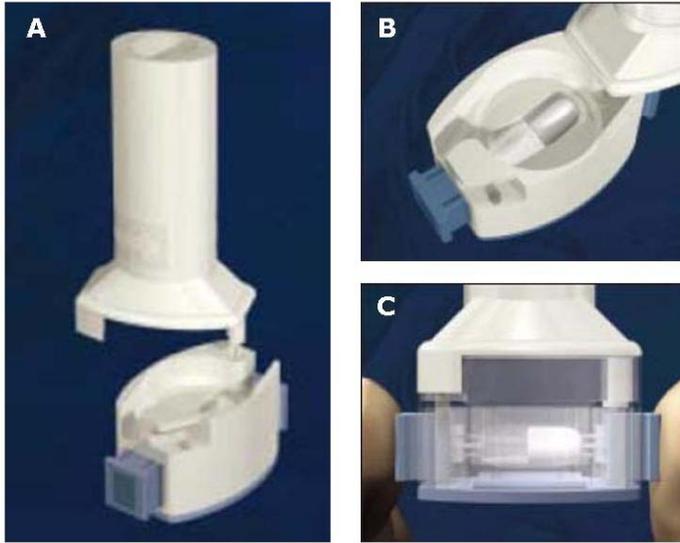


Figure XIII-1 : (A) Cyclohaler®, (B) Positionnement de la gélule dans le Cyclohaler®, (C) Perforation de la gélule par les aiguilles du Cyclohaler®

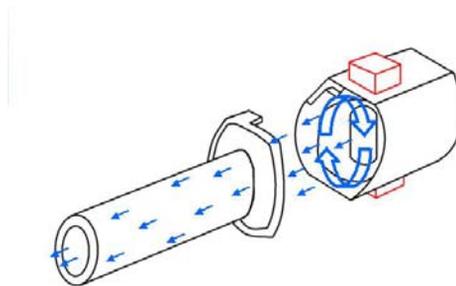


Figure XIII-2: Illustration du fonctionnement d'un Cyclohaler® (Bertholet, 2006)

XIII.3.2.1 Détermination de l'uniformité de la dose délivrée

L'essai d'uniformité de la dose délivrée ou émise pour chaque formulation a été effectué comme suggéré par la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition. Pour cela, un tube collecteur (« Dose sampling unit apparatus »- DUSA) est connecté d'une part à la pompe et adapté d'autre part au Cyclohaler[®]. Ce dernier est chargé puis la pompe est mise en marche de manière à produire un débit de 60 ± 5 litres d'air par minute pendant 5 secondes (ce qui correspond à une inspiration de ± 5 litres d'air) au travers de l'inhalateur. Une fois l'aspiration terminée, le tube collecteur est démonté et la poudre qui s'est déposée est récupérée à l'aide de chloroforme, qui sera amené à un volume final de 50 ml. Après une extraction préalable à l'aide d'HCl 0,1 N, l'AS contenu dans les MLS qui auront été délivrées sera dosé sous forme de salbutamol par la méthode CLHP de la Pharmacopée Européenne. L'opération sera répétée 10 fois pour chaque mélange.

XIII.3.2.2 La détermination de la dose en particules fines et de la fraction respirable

La dose en particules fines (DPF) et la fraction respirable (FR) des différents mélanges ont été déterminées au moyen de l'impacteur à cascade en verre (« Twin Impinger ») décrit dans la Pharmacopée Européenne. Respectivement 7 ml et 30 ml de chloroforme sont introduits dans les chambres de dépôts supérieure et inférieure de l'impacteur. Le Cyclohaler[®] est ensuite connecté à l'entrée de la gorge de l'impacteur au moyen d'un adaptateur étanche. La gélule est percée par pression sur les boutons poussoirs du Cyclohaler[®] puis la pompe est mise en marche afin de libérer la poudre contenue dans la gélule. L'opération est répétée 5 fois.

Le contenu des deux étages de l'impacteur est ensuite récupéré dans 2 ballons jaugés distincts. L'AS sera dosé sous forme de salbutamol par la méthode CLHP de la Pharmacopée Européenne après une extraction CHCl_3 -

HCl 0,1N (Voir page 198). Pour chaque formulation, la mesure a été effectuée à trois reprises.

La dose en particules fines (DPF) est définie par la quantité de principe actif (AS) retrouvée à l'étage inférieur de l'impacteur, par dose unitaire (ici : gélule) administrée.

La fraction respirable (FR) est une notion plus universelle qui permet de comparer, les unes par rapport aux autres, des formulations dont les doses unitaires en principe actif sont différentes. La fraction respirable est obtenue par la formule suivante (Harjunen et al., 2003; Larhrib et al., 1999):

$$FR = \frac{DPF}{DR} \times 100$$

Où DR correspond la dose totale recueillie aux deux étages de l'impacteur ainsi que dans l'adaptateur et dans le dispositif pour inhalation.

XIII.4. Résultats et discussion

La distribution granulométrique des MLS chargées à 5% en AS qui seront utilisées dans les formulations de poudres pour inhalation est présentée au tableau XIII-2.

Tableau XIII-2 : Taille des MLS 5% AS exprimée en $D_{(v;0,5)}$ et en pourcentage de particules ayant un diamètre entre 0,5 et 6 μm (n=3)

	$D_{(v;0,5)}$ (μm) \pm écart-type	MLS de diamètre entre 0,5 et 6 μm (%) \pm écart-type
MLS 5% AS	5,76 \pm 0,07	48,86 \pm 0,56

XIII.4.1 Essai d'uniformité de la dose délivrée

Selon la Pharmacopée Européenne, la préparation satisfait à l'essai d'uniformité de la dose délivrée si, sur les 10 résultats obtenus, 9 sont compris entre 75 et 125% et tous sont entre 65 et 135% de la valeur moyenne des doses délivrées.

Les résultats des essais d'uniformité de la dose délivrée pour les 15 formulations testées sont repris aux tableaux XIII-3 (Formulations 1 à 8) et XIII-4 (Formulations 9 à 15).

Tableau XIII-3: Uniformité de la dose délivrée (formulations 1-8)

M100		L90		L89LM1		L85LM5	
AS récup. (µg)	% par rapport moyenne						
1774,30	100,48	259,14	108,35	198,95	95,67	212,21	96,76
1722,65	97,56	230,01	96,17	214,82	103,29	203,83	92,94
1785,79	101,13	234,12	97,89	220,15	105,86	223,20	101,77
1841,13	104,27	247,40	103,44	198,94	95,66	222,85	101,61
1703,06	96,45	222,50	93,03	210,18	101,06	234,56	106,95
1726,52	97,77	224,01	93,66	228,41	109,83	236,58	107,87
1812,00	102,62	258,43	108,05	191,52	92,09	200,57	91,45
1758,45	99,58	229,76	96,06	207,43	99,74	224,88	102,53
1794,11	101,60	236,79	99,00	197,89	95,16	215,48	98,25
1740,30	98,55	249,64	104,37	211,37	101,64	219,00	99,86
Moyenne		Moyenne		Moyenne		Moyenne	
1765,82		239,18		207,96		219,32	
Écart-type		Écart-type		Écart-type		Écart-type	
2,47		5,68		5,47		5,36	

L80LM10		L89M1		L85M5		L80M10	
AS récup. (µg)	% par rapport moyenne						
191,61	90,62	223,38	111,72	199,38	105,74	200,44	97,56
223,06	105,50	163,57	81,81	198,95	105,50	205,44	99,99
220,80	104,43	204,25	102,15	194,55	103,17	195,32	95,07
213,75	101,10	197,41	98,73	196,50	104,20	233,83	113,81
208,64	98,68	211,24	105,65	155,28	82,34	191,49	93,20
187,24	88,55	195,88	97,96	179,23	95,04	204,13	99,35
224,85	106,35	200,58	100,32	189,32	100,40	190,26	92,60
213,88	101,15	221,88	110,97	199,75	105,93	212,86	103,60
217,67	102,95	196,78	98,41	182,54	96,80	220,11	107,13
212,88	100,68	184,52	92,28	190,21	100,87	200,70	97,68
Moyenne		Moyenne		Moyenne		Moyenne	
211,44		199,95		188,57		205,46	
Écart-type		Écart-type		Écart-type		Écart-type	
5,99		8,78		7,25		6,60	

Tableau XIII-4: Uniformité de la dose délivrée (formulations 9 -15)

L89S1		L85S5		L80S10		G90	
AS récup. (µg)	% par rapport moyenne						
215,69	101,55	246,51	113,30	237,52	103,34	210,43	99,06
217,86	102,57	187,78	86,31	236,24	102,78	238,21	112,13
214,01	100,76	248,47	114,20	223,71	97,33	204,08	96,07
216,21	101,80	205,02	94,23	216,15	94,04	197,95	93,18
198,51	93,46	200,77	92,28	238,99	103,98	210,35	99,02
215,41	101,42	221,59	101,85	218,41	95,03	228,48	107,55
200,83	94,56	238,41	109,58	239,12	104,04	196,23	92,37
218,55	102,90	197,21	90,64	231,48	100,71	210,75	99,20
214,87	101,17	210,46	96,73	218,41	95,03	219,37	103,26
211,99	99,81	219,46	100,87	238,41	103,73	208,54	98,17
Moyenne		Moyenne		Moyenne		Moyenne	
212,39		217,57		229,84		212,44	
Écart-type		Écart-type		Écart-type		Écart-type	
3,28		9,74		4,18		6,15	

G89M1		G85M5		G80M10	
AS récup. (µg)	% par rapport moyenne	AS récup. (µg)	% par rapport moyenne	AS récup. (µg)	% par rapport moyenne
197,34	101,62	211,99	110,06	199,66	101,52
178,68	92,01	190,44	98,87	197,74	100,54
198,32	102,12	182,09	94,53	174,86	88,91
199,39	102,67	200,10	103,88	209,94	106,75
198,78	102,36	176,78	91,78	203,20	103,32
171,46	88,29	197,04	102,29	172,24	87,58
200,41	103,20	181,33	94,14	198,86	101,11
198,24	102,08	194,88	101,17	202,53	102,98
202,88	104,47	201,32	104,51	200,79	102,09
196,50	101,19	190,23	98,76	206,90	105,20
Moyenne		Moyenne		Moyenne	
194,20		192,62		196,67	
Écart-type		Écart-type		Écart-type	
5,34		5,56		6,48	

Pour toutes les formulations testées, on observe que les doses d'AS récupérées dans l'impacteur sont conformes aux exigences de la Pharmacopée Européenne.

XIII.4.2 Détermination de la dose en particules fines et de la fraction respirable

Avant de calculer la dose en particules fines et la fraction respirable, il convient de déterminer si l'essai réalisé est valide au vu des exigences de la Pharmacopée Européenne. Pour cela, la quantité d'AS recueillie aux deux étages de l'impacteur doit être comprise entre 75 et 125% de la valeur moyenne obtenue dans l'essai d'uniformité de la dose délivrée. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XIII-5.

Tableau XIII-5: Conformité des essais au « Twin Impinger » par rapport à la dose moyenne délivrée

Poudre	Moyenne dose délivrée (µg) (n=10)	Moyenne d'AS recueilli dans l'impacteur (µg) (n=3)	Pourcentage (%)
M100	1765,82	1871,23	105,97
L90	239,18	227,03	94,92
L89LM1	207,96	215,30	103,53
L85LM5	219,32	225,12	102,65
L80LM10	211,44	218,93	103,54
L89M1	199,95	218,75	109,40
L85M5	188,57	214,37	113,68
L80M10	205,46	232,47	113,15
L89S1	212,39	215,72	101,57
L85S5	217,57	239,84	110,24
L80S10	229,84	242,49	105,50
G90	212,44	222,78	104,87
G89M1	194,20	2229,13	117,99
G85M5	192,62	224,76	116,69
G80M10	196,67	233,26	118,61

Au vu de ces valeurs, les essais réalisés sont conformes aux exigences de la Pharmacopée Européenne.

Partie expérimentale

Les doses en particules fines ainsi que les fractions respirables correspondantes ont ensuite pu être déterminées pour les différentes poudres testées (Tableau XIII-6).

Tableau XIII-6 : DPF et FR obtenues pour les différentes poudres testées (n=3)

Poudre	Dose particules fines (μg) \pm écart-type (n=3)	Fraction respirable (%) \pm écart-type (n=3)
M100	448,38 \pm 38,70	23,94 \pm 1,53
L90	26,67 \pm 4,45	11,69 \pm 1,09
L89LM1	29,65 \pm 2,46	13,76 \pm 0,71
L85LM5	30,11 \pm 9,24	13,30 \pm 3,59
L80LM10	28,56 \pm 4,47	13,00 \pm 1,27
L89M1	31,91 \pm 3,45	14,64 \pm 2,17
L85M5	27,90 \pm 5,77	12,93 \pm 1,50
L80M10	30,27 \pm 2,87	13,02 \pm 1,20
L89S1	23,61 \pm 1,48	10,94 \pm 0,58
L85S5	34,29 \pm 6,68	14,24 \pm 2,32
L80S10	26,21 \pm 2,46	10,81 \pm 1,11
G90	12,19 \pm 3,43	5,44 \pm 1,34
G89M1	19,33 \pm 0,76	8,44 \pm 0,36
G85M5	13,01 \pm 2,13	5,80 \pm 1,02
G80M10	26,72 \pm 1,61	11,00 \pm 0,86

Les fractions respirables obtenues pour chaque formulation sont représentées sous forme d'histogramme à la figure XIII-3.

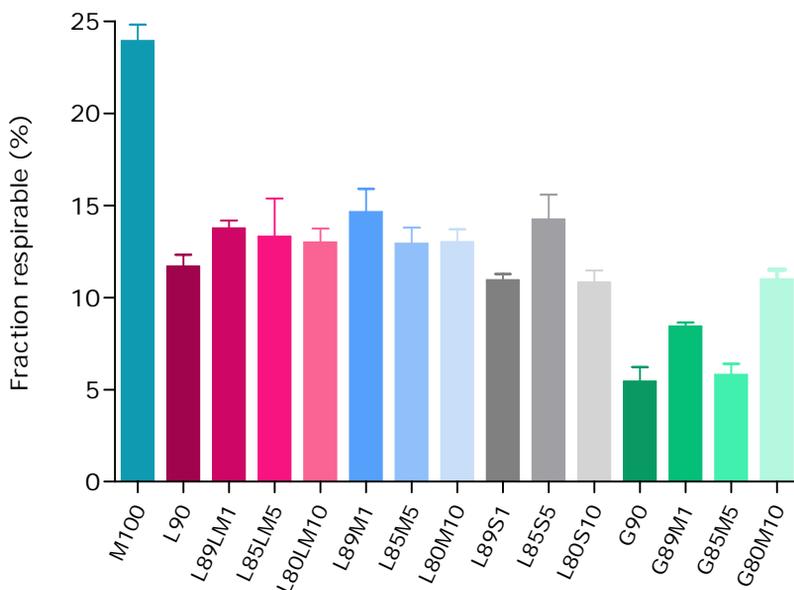


Figure XIII-3 : Histogramme des fractions respirables obtenues pour les différentes compositions de poudre testées (n=3)

On observe que la meilleure fraction respirable (de l'ordre de 25%) est obtenue avec les MLS seules à 5% en AS. Toutes les autres formulations qui utilisent un excipient porteur voire un excipient compétiteur présentent des fractions respirables inférieures à 15%. Il est difficile parmi ces formulations binaires ou ternaires de dégager une formulation optimale. Seules les formulations utilisant comme excipient porteur des microparticules lipidiques de grande taille ($> 63 \mu\text{m}$) peuvent être exclues, eu égard à leurs fractions respirables relativement faibles.

Au vu des valeurs de fractions respirables, il serait tentant d'utiliser seules les MLS à 5% en AS plutôt qu'au sein d'un mélange binaire ou ternaire. Cependant, le rôle de l'excipient porteur est d'améliorer les propriétés d'écoulement des poudres micronisées afin de faciliter le remplissage des dispositifs et la redispersion des poudres après inhalation (Byron, 2006).

En pratique, il a été observé qu'en dépit de leur taille particulière, les poudres de MLS semblent s'écouler relativement bien. C'est la raison pour laquelle avant d'exclure la possibilité de les utiliser telles quelles en tant que poudre pour inhalation, il convient d'évaluer leurs propriétés d'écoulement.

La friction interparticulaire et de là, l'écoulement d'une poudre peuvent être caractérisés indirectement par l'évaluation des propriétés de tassement.

L'aptitude au tassement de la poudre de MLS a été évaluée par la mesure des masses volumiques apparentes (vrac et tassée) telle que décrite dans la Pharmacopée Européenne. Ne disposant pas de 100g de poudre de MLS, nous avons, comme le recommande la Pharmacopée Européenne, utilisé une prise d'essai dont le volume apparent vrac est supérieur à 50 ml. L'appareil de mesure des volumes vrac et tassé est un dispositif de tassement utilisant un cylindre en verre gradué.

La mesure des volumes apparents vrac et tassé a permis d'estimer indirectement l'écoulement de la poudre de MLS par le calcul de l'aptitude au tassement (A_T) ainsi que de l'indice de compressibilité (également appelé indice de Carr, I_C) d'après les formules suivantes (Pharmacopée Européenne, 2005; Staniforth, 2006):

$$A_T \text{ (ml)} = V_{10} - V_{500}$$

Où V_{10} = Volume apparent de la poudre après 10 chutes (ml)

V_{500} = Volume apparent de la poudre après 500 chutes (ml)

$$I_C \text{ (\%)} = \frac{\rho_t - \rho_b}{\rho_t} \times 100$$

Où ρ_t = densité après tassement (1250 chutes)

ρ_b = densité vrac (avant tassement)

Plus les valeurs d'aptitude au tassement et d'indice de Carr sont faibles, meilleur sera l'écoulement. Généralement on considère que

l'écoulement est bon lorsque l'indice de Carr est inférieur à 25 (Staniforth, 2006).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XIII-7.

Tableau XIII-7 : Aptitude au tassement et indice de Carr pour une poudre de MLS à 5% en AS (n=4)

	MLS 5% AS
Aptitude au tassement A_t (ml)	9,07 ± 1,40
Indice de Carr I_c (%)	14,15 ± 2,58

Au vu de la valeur moyenne de l' I_c , l'écoulement des poudres de MLS peut être considéré comme bon.

XIII.5. Conclusion

Quatorze formulations binaires ou ternaires à base de MLS contenant 5% d'AS ont été réalisées. Les fractions respirables de ces poudres ainsi que des MLS à 5% en AS ont été déterminées *in vitro* par des mesures de déposition utilisant l'impacteur à cascade en verre. Les différentes formulations binaires et ternaires ont montré des fractions respirables de maximum 15%. L'étude réalisée n'a pas permis de dégager une formulation optimale parmi celles testées. Seule les MLS contenant l'AS et administrées seules ont donné une fraction respirable proche de 25%.

Cette observation a conduit à mesurer l'écoulement des MLS 5% AS. Selon l'échelle du paramètre « indice de Carr » qui a été utilisée pour caractériser l'écoulement de la poudre, il apparaît que cet écoulement peut être qualifié de bon.

Les MLS 5% AS pourraient donc à priori être utilisées telles quelles dans les dispositifs pour inhalation (IPS). Toutefois, si en pratique, il s'avérait que d'un point de vue technologique l'écoulement des MLS est irrégulier, il pourrait être nécessaire de recourir à des formulations utilisant un excipient porteur et éventuellement un excipient micronisé. Notons encore qu'au vu de nombreuses études réalisées sur les poudres pour

Partie expérimentale

inhalation, des fractions respirables comprises entre 10 et 15% sont relativement fréquentes (Feddah et al., 2000; Pauwels et al., 1997). En fonction des doses efficaces des principes actifs administrés, ces fractions respirables seront ou non considérées comme acceptables.

XIII.6. Références bibliographiques

Bertholet P., 2006. Intérêt des cyclodextrines dans le développement galénique de formes pulmonaires à base de RO 28-2653, un inhibiteur des métalloprotéases matricielles. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, Belgique.

Byron P.R., 2006. Some future perspectives for unit dose inhalation aerosols. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 12, 993-1015.

Feddah M.R., Brown K.F., Gipps E.M., Davies N.M., 2000. In-vitro characterisation of metered dose inhaler versus dry powder inhaler glucocorticoid products: influence of inspiratory flow rates. *J. Pharm. Pharm. Sci* 3 (3), 318-324.

Ganderton D., 1992. The generation of respirable clouds from coarse powder aggregates. *J. Biopharm. Sci* 3, 101-105.

Harjunen P., Lankinen T., Salonen H., Lehto V.P., Jarvinen K., 2003. Effects of carriers and storage of formulation on the lung deposition of a hydrophobic and hydrophilic drug from a DPI. *Int. J. Pharm.* 263 (1-2), 151-163.

Hersey G., 1975. Ordered mixing: a new concept in powder practice. *Powder Technology* 11, 41-44.

Larhrib H., Zeng X.M., Martin G.P., Marriott C., Pritchard J., 1999. The use of different grades of lactose as a carrier for aerosolised salbutamol sulphate. *Int. J. Pharm.* 191 (1), 1-14.

Lucas P., Anderson K., Staniforth J.N., 1998. Protein deposition from dry powder inhalers: fine particle multiplets as performance modifiers. *Pharm. Res.* 15 (4), 562-569.

Malcolmson R.J., Embleton J.K., 1998. Dry powder formulations for pulmonary delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1 (9), 394-398.

Pauwels R., Newman S., Borgstrom L., 1997. Airway deposition and airway effects of antiasthma drugs delivered from metered-dose inhalers. *Eur. Respir. J.* 10 (9), 2127-2138.

Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition, 2005. Conseil de l'Europe. Strasbourg.

Staniforth J.N., 1987. British Pharmaceutical Conference Science Award lecture 1986. Order out of chaos. *J.Pharm.Pharmacol.* 39 (5), 329-334.

Staniforth J.N., 2006. Particle science and powder technology. In: *Pharmaceutics: The science of dosage form design*, chap.14, Aulton M.E. (Ed), 197-210.

Steckel H., Brandes H.G., 2004. A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery. *Int.J.Pharm.* 278 (1), 187-195.

Zeng X.M., Martin G.P., Tee S.K., Ghoush A.A., Marriott C., 1999. Effects of particle size and adding sequence of fine lactose on the deposition of salbutamol sulphate from a dry powder formulation. *Int.J.Pharm.* 182 (2), 133-144.

Zeng X.M., Martin G.P., Tee S.K., Marriott C., 1998. The role of fine particle lactose on the dispersion and deaggregation of salbutamol sulphate in an air stream in vitro. *Int.J.Pharm.* 176 (1), 99-110.

CONCLUSIONS

Chapitre XIV:

Conclusions générales et perspectives

Le but de ce travail de recherche consiste en la mise au point d'une forme destinée à l'administration pulmonaire qui permettrait de libérer de façon prolongée la molécule qui y est incorporée. Les microparticules lipidiques solides (MLS) ont été dès le départ la forme galénique privilégiée pour ce travail de recherche.

Au terme de celui-ci, des MLS contenant de l'acétonide de salbutamol (AS) ont été fabriquées de façon à obtenir une taille adéquate pour l'administration par inhalation. Des essais *in vitro* ont démontré que les MLS libéraient de manière prolongée l'AS qui y est incorporé.

Préalablement à l'inclusion d'une molécule dans les MLS, des formulations de MLS vierges ont été développées. Les paramètres de production des MLS ont été étudiés par la méthodologie de la planification expérimentale de façon à optimiser leur taille en vue d'une administration par inhalation.

Ces MLS vierges ont été testées *in vivo* chez le rat afin de vérifier leur tolérance au niveau du tractus respiratoire. Conformément à notre attente, les MLS se sont montrées biocompatibles ; en effet, des lipides proches des lipides physiologiques et des concentrations relativement faibles en tensioactifs sont utilisés pour leur production.

Conclusions

L'AS, le dérivé plus lipophile du salbutamol, synthétisé afin de favoriser l'incorporation dans les MLS, a ensuite été étudié : des méthodes de dosage ont été mises au point et validées. Les propriétés physico-chimiques de l'AS ont été caractérisées. Ainsi, la détermination expérimentale du coefficient de partage de l'AS a mis en évidence son caractère relativement lipophile comparativement au salbutamol. L'étude de stabilité a montré que l'AS se dégradait en salbutamol lors de l'exposition à des pH acides mais était stable dans les conditions opératoires habituelles.

Ensuite une évaluation de l'activité pharmacologique de l'AS a été effectuée à la fois *ex vivo* par des mesures de bronchodilatation sur organes isolés chez le porc, le cobaye et le chat ainsi qu'*in vitro* par des mesures d'affinité de l'AS envers les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques. Les essais de binding *in vitro* ont montré que l'AS présente une affinité supérieure à celle du salbutamol à la fois pour les récepteurs β_1 et β_2 et ce, avec une sélectivité comparable. Les résultats obtenus sur organes isolés n'ont pas montré d'effet bronchodilatateur chez le cobaye chez qui les récepteurs adrénergiques impliqués dans la bronchodilatation sont pourtant bien de type β_2 . Deux hypothèses ont donc été formulées : la première est que l'AS se comporterait en antagoniste des récepteurs β_2 -adrénergiques, la seconde est que l'AS exercerait une activité mixte β_1 et β_2 -mimétique. Aucune conclusion définitive n'a pu être tirée quant à l'activité pharmacologique de l'AS, mais, l'AS fut cependant utilisé tout au long du travail comme molécule modèle dans la mise au point de formes à libération prolongée destinées à l'administration par inhalation.

Des MLS contenant l'AS ont ensuite été formulées et les paramètres de production ont été étudiés par utilisation des plans d'expérience dans le but d'optimiser le pourcentage de particules possédant un diamètre convenant à l'administration pulmonaire. La densité vraie de ces MLS-AS a ensuite été déterminée afin de pouvoir évaluer le diamètre aérodynamique. La microscopie électronique a montré que, lorsque la

charge en AS augmente, des cristaux d'AS non incorporés dans les MLS apparaissent. Ceci a été confirmé par diffraction des rayons-X. Une méthode d'extraction liquide-liquide a été mise au point en vue de permettre la détermination de la charge réelle des MLS en AS, et les rendements d'extraction ont été validés.

Des essais de libération *in vitro* de l'AS ont permis de montrer que, contrairement aux mélanges physiques constitués d'AS et de MLS vierges, les MLS contenant l'AS permettent de prolonger la libération de celui-ci. Cette étude a également montré que la libération était d'autant plus prolongée que la charge initiale en AS est faible. Les meilleurs résultats parmi les MLS testées ont été obtenus avec celles chargées à 5% en AS. Il conviendra par la suite de faire un compromis entre une libération suffisamment prolongée et une charge suffisante. Ce sont donc les MLS à 5% en AS qui seront utilisées pour la formulation de poudres pour inhalation.

Des essais de libération utilisant des membranes de dialyse ont également été réalisés afin de mettre en évidence une éventuelle influence de la présence de tissus pulmonaires porcins et spécialement de leurs enzymes sur le profil de libération de l'AS à partir des MLS. Cette étude n'a mis en évidence aucune différence significative entre la libération de l'AS en milieu propre et en présence de tissus pulmonaires. Ces résultats tendent à considérer les MLS mises au point comme des véhicules prometteurs susceptibles de prolonger la libération d'un principe actif.

Enfin, des poudres pour inhalation à base de MLS-AS et utilisant des excipients porteurs et compétiteurs de différentes natures et en différentes concentrations relatives ont été formulées. Les fractions respirables de ces poudres ont été évaluées par des mesures de déposition *in vitro*. Les fractions respirables obtenues pour les formulations testées sont inférieures à 15%, à l'exception des MLS 5% AS administrées seules qui donnent une fraction respirable de presque 25%. Suite à ces résultats,

Conclusions

les propriétés d'écoulement des MLS-AS ont été évaluées et ont été jugées acceptables dans l'optique d'une utilisation comme poudre pour inhalation ne contenant aucun autre constituant.

Ce travail ouvre la voie à d'autres recherches sur les MLS, celles-ci restant à l'heure actuelle relativement peu étudiées tant pour l'administration par inhalation que pour d'autres voies d'administration, en comparaison notamment à d'autres systèmes microparticulaires tels que les liposomes et les microsphères polymériques.

Notons néanmoins qu'étant donné leurs nombreux avantages en termes de coûts de production, de stabilité et de biocompatibilité, l'intérêt vis-à-vis des MLS est croissant.

En ce qui concerne plus particulièrement les perspectives de notre travail, il conviendrait soit d'investiguer plus en profondeur l'activité pharmacologique de l'AS afin de mettre en évidence une éventuelle action β_2 -mimétique. Gardons également à l'esprit que, selon le modèle décrit dans ce travail, quantités d'autres molécules étudiées pour l'administration par inhalation tant à visée locale que systémique (protéines, macromolécules,...) pourront être incorporées dans des MLS afin d'être administrées sous cette forme par inhalation et d'être libérées de façon prolongée au niveau de leur sites d'action. L'incorporation d'une nouvelle molécule dans les MLS nécessitera cependant une réévaluation des paramètres de production afin d'optimiser la taille des particules en vue d'une administration par inhalation, car les propriétés physico-chimiques de la molécule incorporée sont susceptibles de modifier sensiblement la taille des particules.

RESUMES

Résumé

Le développement de formes à libération prolongée destinées à l'administration pulmonaire est un domaine qui a, jusqu'à présent, été relativement peu étudié mais pour lequel il y a actuellement un intérêt croissant.

Le but de notre travail est de développer une forme destinée à l'administration par inhalation qui libérerait de façon prolongée un agent bronchodilatateur. Dans le cadre de ce travail, les microparticules lipidiques solides (MLS) ont été choisies comme véhicule en vue de l'obtention d'une libération prolongée. Les MLS présentent en effet de nombreux avantages en termes de coûts de production, de stabilité et de biocompatibilité comparativement à d'autres systèmes microparticulaires.

Le salbutamol, principe actif β_2 -mimétique choisi initialement pour cette étude, n'étant pas suffisamment lipophile pour s'incorporer de façon efficace dans les MLS, un dérivé plus lipophile du salbutamol, l'acétonide de salbutamol (AS) a été synthétisé. Les caractéristiques physico-chimiques de l'AS ont été déterminées, sa stabilité a été évaluée et des méthodes de dosage ont été mises au point.

Des MLS vierges (non chargées en AS) ont tout d'abord été produites après optimisation des paramètres de fabrication en vue d'obtenir une taille adéquate pour l'administration par inhalation. Des études de tolérance au niveau pulmonaire effectuées *in vivo* sur des rats ont montré la biocompatibilité de ces MLS.

L'activité pharmacologique de l'AS a été évaluée à la fois par des essais *ex vivo* de bronchodilatation sur organes isolés ainsi que par des essais d'affinité (binding) envers les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques. Ces études n'ont malheureusement pas permis de conclure avec certitude quant à l'éventuel effet β_2 -mimétique de l'AS. Cependant, en raison de son caractère lipophile, l'AS sera utilisé comme molécule modèle tout au long du processus de développement.

L'AS a donc été incorporé dans les MLS et les paramètres de production ont été étudiés et fixés par la méthodologie des plans d'expérience en vue d'optimiser le pourcentage de particules possédant un diamètre géométrique convenant à l'administration par inhalation. La concentration en AS n'affectant pas de façon significative la taille des MLS, celles-ci pourront être produites en utilisant la concentration en AS désirée.

La caractérisation de ces MLS par microscopie électronique a montré que, lorsque la charge théorique initiale augmente, des cristaux d'AS sont observés à l'extérieur des MLS.

Des essais de libération menés *in vitro* dans un premier temps puis *ex vivo* (en présence de fragments de poumons de porcs) ont permis de montrer une prolongation de la libération de l'AS à partir des MLS comparativement à la libération à partir de mélanges physiques de MLS vierges et d'AS. Ces résultats montrent la capacité des MLS possédant une taille pour administration pulmonaire, à libérer de façon prolongée la molécule qui y est incorporée. Cette libération est d'autant plus prolongée que la charge en AS diminue. La présence d'enzymes pulmonaires n'a cependant pas modifié la cinétique de libération.

Des poudres pour inhalation à base de MLS à 5% en AS ont été formulées en utilisant différents excipients porteurs et compétiteurs en différentes concentrations relatives. Les fractions respirables mesurées *in*

vitro sont, dans le meilleur des cas, égales à 15%. Cependant, les MLS à 5% en AS administrées seules ont une fraction respirable proche de 25%. Leurs propriétés d'écoulement s'avérant acceptables, il peut être envisagé d'administrer les MLS telles quelles en tant que poudre pour inhalation.

Summary

The sustained release of drugs for pulmonary delivery is a research field which has been so far rather unexploited but which is currently becoming increasingly attractive.

The aim of this research work is to develop a pulmonary delivery system which will be able to sustain the release of a bronchodilator agent. Therefore, solid lipid microparticles (SLMs) were chosen in order to provide a sustained release to its incorporated substance. Indeed, this kind of drug carrier offers many advantages. In comparison with other microparticulate dosage forms, SLMs production costs are relatively low, they are physiologically compatible and their physical stability is well established.

Salbutamol, a well-known short-acting β_2 -adrenergic receptor agonist, was initially chosen for this study but this molecule proved to be not lipophilic enough to be efficiently incorporated into SLMs. That's the reason why salbutamol acetonide (SA) was synthesized from salbutamol in order to get a more lipophilic molecule and thereby to increase the incorporation into SLMs. Then, the physico-chemical properties of SA were characterized, its stability was studied and chromatographic assays were developed.

Drug free SLMs were produced using manufacturing parameters which were optimized in order to get particles with a suitable range of size for pulmonary administration. Tolerance studies were then carried out *in vivo* on rats to check SLMs biocompatibility in the respiratory tractus.

Ex vivo tests using isolated organs were carried out in order to investigate the bronchodilating activity of SA. The obtained results were completed with a binding study to evaluate the affinity between SA on the one hand and β_1 and β_2 -adrenergic receptors on the other hand. Unfortunately those studies didn't allow us to conclude about the possible β_2 -mimetic activity of SA. Owing to its lipophilic character, SA will be used all along this research work as a model molecule for the development of SLMs as sustained release system for pulmonary delivery.

SA was then incorporated into SLMs: the production parameters were studied using the methodology of experimental design in order to optimize the percentage of particles with a suitable diameter for pulmonary administration. It has been noticed that SA concentration does not affect significantly the particle size. So SLMs can be produced using the pre-established production parameters whatever the desired SA concentration.

The characterization of the obtained SLMs-SA by scanning electron microscopy showed especially that SA crystals appear outside of the particles when the theoretical drug loading increases.

Drug release studies were carried out both *in vitro* and *ex vivo* i.e. using fragments of porcine pulmonary tissues. These studies showed that SA release from SLMs is sustained in comparison with SA release from physical mixtures of drug free SLMs and SA. The obtained results tend to prove that produced SLMs are suitable carriers in order to get a sustained release of the incorporated substance. It has also been noticed that the release rate increases when the drug loading increases. Concerning the *ex vivo* studies, it may be concluded that the presence of pulmonary enzymes does not modify SA release profiles.

Inhalation powders containing SLMs with 5% SA were finally developed using different carrier excipients and ternary agents at different relative concentrations. Respirable fractions were determined *in vitro* and proved

Summary

to be at best equal to 15%. However, SLMs 5% SA have also been administered alone without any additional excipients. In this case, the obtained respirable fraction is close to 25%. Seeing that the flowability of SLMs 5% SA appeared to be acceptable, they could be administered just as they are as inhalation powder.

ANNEXES

Annexe 1 : Certificat d'analyse du Compritol® 888 ATO

00062233



CERTIFICAT D'ANALYSE

PRODUIT : COMPRITOL 888 ATO

CODE PRODUIT : 3123/04

NUMERO DE LOT : 28302

DATE DE FABRICATION ... : 2/09/02

DEFINITION CHIMIQUE :

- Selon Pharmacopée Européenne 4ème Edition : "Glycérol (Dibéhénate de) atomisé.
- Selon Pharmacopée Américaine USP25/NF20 : "Glyceryl Behenate" atomisé.

TEST	SPECIFICATION	RESULTAT
ASPECT	Poudre fine	Conforme
ODEUR	Faible	Conforme
COULEUR (Echelle Gardner)	< 5,0	0,5
POINT DE GOUTTE (METTLER)	69,0 à 74,0 °C	73,3
INDICE D'ACIDE	< 4,00 mgKOH/g	1,48
INDICE DE SAPONIFICATION	145 à 165 mgKOH/g	151
INDICE D'IODE	< 3,0 gI2/100g	0,3
INDICE DE PEROXYDE	< 6,0 meqO2/kg	Conforme
TENEUR EN EAU	< 1,0 %	Conforme
TENEUR EN GLYCEROL LIBRE	< 1,0 %	0,67
TENEUR EN 1 MONOGLYCERIDES	12,0 à 18,0 %	15,7
MONOGLYCERIDES TOTAUX	13,0 à 21,0 %	17,44
DIGLYCERIDES TOTAUX	40,0 à 60,0 %	53,3
TRIGLYCERIDES TOTAUX	21,0 à 35,0 %	27,58
ACIDE PALMITIQUE (C16)	< 3,0 %	0,2
ACIDE STEARIQUE (C18)	< 5,0 %	2,8
ACIDE ARACHIDIQUE (C20)	< 10,0 %	5,5
ACIDE BEHENIQUE (C22)	> 83,0 %	89,0
ACIDE ERUCIQUE (C22:1)	< 3,0 %	0,1
ACIDE LIGNOCERIQUE (C24:0)	< 3,0 %	2,1
CHROMATOGRAPHIE COUCHE MINCE (Méthode USP/NF)	Conforme au produit de référence lot 26332	Conforme
TENEUR EN CENDRES TOTALES	< 0,10 %	Conforme
TENEUR EN NICKEL	< 1 ppm	Conforme
METAUX LOURDS	< 10 ppm	Conforme
SOLVANTS ORGANIQUES VOLATILES (USP/NF - Method <467>)	Conforme; production en l'absence de solvant.	Conforme
PHARM. EUR. 4ème Ed., NF20, GRAS, JSFA	Conforme aux monographies	Conforme

Nous certifions que le lot est conforme aux spécifications en vigueur.

Ce document est édité informatiquement et ne nécessite pas de signature.

16/09/02

GATTEFOSSÉ s.a.

Département Assurance Qualité
36, chemin de Genas - BP 603 - 69804 SAINT-PRIEST Cedex FRANCE - Tél.: +33 4 72 22 98 00 - Télécopie : +33 4 78 90 45 67
S.A. au Cap. de 4 650 000 Euros - R.C.S. Lyon B 389 586 900 - N° Identité CEE FR 49 389 586 900

Annexe 2 : Certificat d'analyse du Lutrol® F68

From: BASF	To: H99949922220-100F C	19-MAY-2000-04:32 Doc: 99/ F.001 of 004			
BASF Aktiengesellschaft		BASF			
		CC 0864			
BASF Aktiengesellschaft · 67056 Ludwigshafen		QUALITÄTSPRUEF-ZERTIFIKAT			
Betreff/Subject : 2000051901026					
BASF CHEMTRADE GMBH					
POSTFACH 60		19.05.2000			
61593 BURGBERNHHEIM		ZAX/M320			
		Dr. Leyendecker			
		0621-60-45308			
		ZERTIFIKATS-NR 1026			
		SEITE 1 VON 4			
ABNAHMEPRUEFZEUGNIS 3.1 B NACH EN 10204					
Lutrol® F 68	ARTIKEL-NR	50015170			
102kg Fibertrommel	PRODUKT-NR	010293 01			
IHRE BESTELLUNG 19.05.2000	KOLLI-NR	74 T 8633			
800959	ABL-/LOT-NR	41-0498			
54.510	ABL-MENGE	400 KEE			
	TOTAL	400 KEE			
Wasser / Water	0.15 g/100g				
(Karl- Fischer- Titration)					
Sulfataesche / Sulphated Ash	0.2 g/100g				
Schwermetalle / Heavy Metals	max. 20 mg/kg				
Molekulargewicht (aus der OH-Zahl)	9048 g/mol				
Average Molecular weight (from OH-Value)					
Propylenoxid / Propylene Oxide (CGC)	(1 mg/kg)				
Polyoxyethylen-Gehalt / Weight percent oxyethylene	80.5 g/100g				
Ungesättigtheit / Unsaturation (Hg-acetat-Meth.)	0.020 meq/g				
pH-Wert / pH-value	7.1				
100g/l in Wasser / in water					
Ph. Eur.					
Aussehen der Lösung / Appearance of solut	Entspricht / conforms				
100g/l in water					
Ph. Eur.					
ph-Wert/ pH-Value	6.8				
25 g/l in Wasser/ in water					
1,4-Dioxan / 1,4-Dioxane (CGC)	(2 mg/kg)				
Ethylenoxid / Ethylene Oxide (CGC)	(1 mg/kg)				
<table border="0"> <tr> <td> Telefon (0621) 6000 (Vermittlung) Telefax (0621) 600-4 26 26 (Zentrale) Telex 46 6800 basf d (Vermittlung) E-Mail: info.service@basf-ag.de Internet: http://www.basf.de </td> <td> Bestellerbindung: Leihbesitzbank 67056 Ludwigshafen, Grödenstr. 54 507 300 (BLZ 5405 000 00) Sitz der Gesellschaft: 67056 Ludwigshafen, Deutschland Registergericht: Amtsgericht Ludwigshafen, Firmenregisternummer: HRA 3009 </td> <td> Aufsichtsratsvorsitzender: Bernhard Leubinger Vorstand: Jürgen Strohle, Vorsitzender, Max Dutschke, stellv. Vorsitzender, Holmut Becke, Jörn Fockmann, Jürgen Hambrecht, Stefan Maronowski, Peter Oakley, Volker Treutler, Eggert Voshersau </td> </tr> </table>			Telefon (0621) 6000 (Vermittlung) Telefax (0621) 600-4 26 26 (Zentrale) Telex 46 6800 basf d (Vermittlung) E-Mail: info.service@basf-ag.de Internet: http://www.basf.de	Bestellerbindung: Leihbesitzbank 67056 Ludwigshafen, Grödenstr. 54 507 300 (BLZ 5405 000 00) Sitz der Gesellschaft: 67056 Ludwigshafen, Deutschland Registergericht: Amtsgericht Ludwigshafen, Firmenregisternummer: HRA 3009	Aufsichtsratsvorsitzender: Bernhard Leubinger Vorstand: Jürgen Strohle, Vorsitzender, Max Dutschke, stellv. Vorsitzender, Holmut Becke, Jörn Fockmann, Jürgen Hambrecht, Stefan Maronowski, Peter Oakley, Volker Treutler, Eggert Voshersau
Telefon (0621) 6000 (Vermittlung) Telefax (0621) 600-4 26 26 (Zentrale) Telex 46 6800 basf d (Vermittlung) E-Mail: info.service@basf-ag.de Internet: http://www.basf.de	Bestellerbindung: Leihbesitzbank 67056 Ludwigshafen, Grödenstr. 54 507 300 (BLZ 5405 000 00) Sitz der Gesellschaft: 67056 Ludwigshafen, Deutschland Registergericht: Amtsgericht Ludwigshafen, Firmenregisternummer: HRA 3009	Aufsichtsratsvorsitzender: Bernhard Leubinger Vorstand: Jürgen Strohle, Vorsitzender, Max Dutschke, stellv. Vorsitzender, Holmut Becke, Jörn Fockmann, Jürgen Hambrecht, Stefan Maronowski, Peter Oakley, Volker Treutler, Eggert Voshersau			

Annexe 3 : Détails de l'analyse statistique de l'étude in vitro de la libération de l'AS à partir des MLS

Temps t = 5 minutes

	Measurement							
	N	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
Melange_phy_5_95	3	8.36	3.86	4.96	4.96	7.56	12.56	12.56
Melange_phy_20_80	2	9.37	0.68	8.89	8.89	9.37	9.85	9.85
AS_seul	7	21.67	5.49	14.24	14.89	22.09	26.62	28.42
MLS_5_AS	7	5.71	0.64	4.75	5.09	5.59	6.26	6.51
MLS_10_AS	6	4.66	0.60	3.97	4.07	4.61	5.23	5.44
MLS_15_AS	7	8.09	1.38	6.04	7.20	7.62	9.38	10.06
MLS_20_AS	7	14.17	0.73	13.45	13.54	13.85	14.69	15.40

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	6	1388.691600	231.448600	32.23	<.0001

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

	concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
AS_seul	- MLS_20_AS	7.509	2.074	12.943	***
AS_seul	- Melange_phy_20_80	12.304	4.153	20.455	***
AS_seul	- Melange_phy_5_95	13.314	6.299	20.330	***
AS_seul	- MLS_15_AS	13.589	8.154	19.023	***
AS_seul	- MLS_5_AS	15.969	10.534	21.403	***
AS_seul	- MLS_10_AS	17.019	11.363	22.675	***
MLS_20_AS	- AS_seul	-7.509	-12.943	-2.074	***
MLS_20_AS	- Melange_phy_20_80	4.796	-3.355	12.947	
MLS_20_AS	- Melange_phy_5_95	5.806	-1.210	12.821	
MLS_20_AS	- MLS_15_AS	6.080	0.646	11.514	***
MLS_20_AS	- MLS_5_AS	8.460	3.026	13.894	***
MLS_20_AS	- MLS_10_AS	9.511	3.855	15.167	***
Melange_phy_20_80	- AS_seul	-12.304	-20.455	-4.153	***
Melange_phy_20_80	- MLS_20_AS	-4.796	-12.947	3.355	
Melange_phy_20_80	- Melange_phy_5_95	1.010	-8.271	10.291	
Melange_phy_20_80	- MLS_15_AS	1.284	-6.867	9.435	
Melange_phy_20_80	- MLS_5_AS	3.664	-4.487	11.815	
Melange_phy_20_80	- MLS_10_AS	4.715	-3.586	13.016	
Melange_phy_5_95	- AS_seul	-13.314	-20.330	-6.299	***
Melange_phy_5_95	- MLS_20_AS	-5.806	-12.821	1.210	
Melange_phy_5_95	- Melange_phy_20_80	-1.010	-10.291	8.271	

Annexes

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits	
Melange_phy_5_95 - MLS_15_AS	0.274	-6.741 7.290	
Melange_phy_5_95 - MLS_5_AS	2.654	-4.361 9.670	
Melange_phy_5_95 - MLS_10_AS	3.705	-3.484 10.894	
MLS_15_AS - AS_seul	-13.589	-19.023 -8.154	***
MLS_15_AS - MLS_20_AS	-6.080	-11.514 -0.646	***
MLS_15_AS - Melange_phy_20_80	-1.284	-9.435 6.867	
MLS_15_AS - Melange_phy_5_95	-0.274	-7.290 6.741	
MLS_15_AS - MLS_5_AS	2.380	-3.054 7.814	
MLS_15_AS - MLS_10_AS	3.431	-2.225 9.087	
MLS_5_AS - AS_seul	-15.969	-21.403 -10.534	***
MLS_5_AS - MLS_20_AS	-8.460	-13.894 -3.026	***
MLS_5_AS - Melange_phy_20_80	-3.664	-11.815 4.487	
MLS_5_AS - Melange_phy_5_95	-2.654	-9.670 4.361	
MLS_5_AS - MLS_15_AS	-2.380	-7.814 3.054	
MLS_5_AS - MLS_10_AS	1.051	-4.605 6.707	
MLS_10_AS - AS_seul	-17.019	-22.675 -11.363	***
MLS_10_AS - MLS_20_AS	-9.511	-15.167 -3.855	***
MLS_10_AS - Melange_phy_20_80	-4.715	-13.016 3.586	
MLS_10_AS - Melange_phy_5_95	-3.705	-10.894 3.484	
MLS_10_AS - MLS_15_AS	-3.431	-9.087 2.225	
MLS_10_AS - MLS_5_AS	-1.051	-6.707 4.605	

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	33.9084
DF	6
Pr > Chi-Square	<.0001

Temps t = 30 minutes

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
Melange_phy_5_95	3	40.44	2.61	37.55	37.55	41.14	42.63	42.63
Melange_phy_20_80	2	46.93	1.19	46.09	46.09	46.93	47.77	47.77
AS_seul	7	64.99	13.09	42.91	53.79	68.61	75.55	81.52
MLS_5_AS	7	11.72	1.48	9.28	10.52	11.93	12.89	13.43
MLS_10_AS	6	13.60	2.36	11.19	11.78	12.77	16.47	16.62
MLS_15_AS	7	21.94	5.81	16.69	17.46	19.43	25.31	32.58
MLS_20_AS	7	35.48	2.50	30.92	34.64	35.49	37.22	39.03

Annexes

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	6	13977.62215	2329.60369	56.32	<.0001

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

	concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
AS_seul	- Melange_phy_20_80	18.060	-1.504	37.624	
AS_seul	- Melange_phy_5_95	24.550	7.712	41.388	***
AS_seul	- MLS_20_AS	29.511	16.469	42.554	***
AS_seul	- MLS_15_AS	43.054	30.012	56.097	***
AS_seul	- MLS_10_AS	51.390	37.815	64.965	***
AS_seul	- MLS_5_AS	53.269	40.226	66.311	***
Melange_phy_20_80	- AS_seul	-18.060	-37.624	1.504	
Melange_phy_20_80	- Melange_phy_5_95	6.490	-15.785	28.765	
Melange_phy_20_80	- MLS_20_AS	11.451	-8.113	31.015	
Melange_phy_20_80	- MLS_15_AS	24.994	5.430	44.558	***
Melange_phy_20_80	- MLS_10_AS	33.330	13.407	53.253	***
Melange_phy_20_80	- MLS_5_AS	35.209	15.645	54.773	***
Melange_phy_5_95	- AS_seul	-24.550	-41.388	-7.712	***
Melange_phy_5_95	- Melange_phy_20_80	-6.490	-28.765	15.785	
Melange_phy_5_95	- MLS_20_AS	4.961	-11.877	21.799	
Melange_phy_5_95	- MLS_15_AS	18.504	1.666	35.342	***
Melange_phy_5_95	- MLS_10_AS	26.840	9.586	44.094	***
Melange_phy_5_95	- MLS_5_AS	28.719	11.881	45.557	***
MLS_20_AS	- AS_seul	-29.511	-42.554	-16.469	***
MLS_20_AS	- Melange_phy_20_80	-11.451	-31.015	8.113	
MLS_20_AS	- Melange_phy_5_95	-4.961	-21.799	11.877	
MLS_20_AS	- MLS_15_AS	13.543	0.500	26.586	***
MLS_20_AS	- MLS_10_AS	21.879	8.303	35.454	***
MLS_20_AS	- MLS_5_AS	23.757	10.714	36.800	***
MLS_15_AS	- AS_seul	-43.054	-56.097	-30.012	***
MLS_15_AS	- Melange_phy_20_80	-24.994	-44.558	-5.430	***
MLS_15_AS	- Melange_phy_5_95	-18.504	-35.342	-1.666	***
MLS_15_AS	- MLS_20_AS	-13.543	-26.586	-0.500	***
MLS_15_AS	- MLS_10_AS	8.336	-5.240	21.911	
MLS_15_AS	- MLS_5_AS	10.214	-2.828	23.257	
MLS_10_AS	- AS_seul	-51.390	-64.965	-37.815	***
MLS_10_AS	- Melange_phy_20_80	-33.330	-53.253	-13.407	***
MLS_10_AS	- Melange_phy_5_95	-26.840	-44.094	-9.586	***
MLS_10_AS	- MLS_20_AS	-21.879	-35.454	-8.303	***
MLS_10_AS	- MLS_15_AS	-8.336	-21.911	5.240	
MLS_10_AS	- MLS_5_AS	1.879	-11.697	15.454	

Annexes

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

	concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits	
MLS_5_AS	- AS_seul	-53.269	-66.311 -40.226	***
MLS_5_AS	- Melange_phy_20_80	-35.209	-54.773 -15.645	***
MLS_5_AS	- Melange_phy_5_95	-28.719	-45.557 -11.881	***
MLS_5_AS	- MLS_20_AS	-23.757	-36.800 -10.714	***
MLS_5_AS	- MLS_15_AS	-10.214	-23.257 2.828	
MLS_5_AS	- MLS_10_AS	-1.879	-15.454 11.697	

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	35.8106
DF	6
Pr > Chi-Square	<.0001

Temps t = 60 minutes

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
Melange_phy_5_95	3	70.67	10.16	63.08	63.08	66.71	82.21	82.21
Melange_phy_20_80	2	72.28	6.65	67.58	67.58	72.28	76.98	76.98
AS_seul	7	86.61	8.68	70.51	81.72	87.76	95.19	95.98
MLS_5_AS	7	16.83	2.15	13.27	15.48	16.87	18.89	19.24
MLS_10_AS	6	19.40	3.38	16.18	16.81	18.09	23.26	23.99
MLS_15_AS	7	33.38	9.92	24.03	24.65	31.30	37.94	51.82
MLS_20_AS	7	46.97	4.02	40.63	44.52	45.93	51.32	52.10

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	6	26041.07192	4340.17865	94.15	<.0001

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

	concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits	
AS_seul	- Melange_phy_20_80	14.326	-6.328 34.979	
AS_seul	- Melange_phy_5_95	15.939	-1.836 33.715	
AS_seul	- MLS_20_AS	39.633	25.864 53.402	***
AS_seul	- MLS_15_AS	53.230	39.461 66.999	***
AS_seul	- MLS_10_AS	67.204	52.873 81.535	***
AS_seul	- MLS_5_AS	69.776	56.007 83.545	***
Melange_phy_20_80	- AS_seul	-14.326	-34.979 6.328	
Melange_phy_20_80	- Melange_phy_5_95	1.613	-21.901 25.128	
Melange_phy_20_80	- MLS_20_AS	25.307	4.654 45.960	***

Annexes

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
Melange_phy_20_80 - MLS_15_AS	38.904	18.251	59.558	***
Melange_phy_20_80 - MLS_10_AS	52.878	31.846	73.911	***
Melange_phy_20_80 - MLS_5_AS	55.450	34.797	76.103	***
Melange_phy_5_95 - AS_seul	-15.939	-33.715	1.836	
Melange_phy_5_95 - Melange_phy_20_80	-1.613	-25.128	21.901	
Melange_phy_5_95 - MLS_20_AS	23.694	5.918	41.469	***
Melange_phy_5_95 - MLS_15_AS	37.291	19.515	55.066	***
Melange_phy_5_95 - MLS_10_AS	51.265	33.051	69.479	***
Melange_phy_5_95 - MLS_5_AS	53.837	36.061	71.612	***
MLS_20_AS - AS_seul	-39.633	-53.402	-25.864	***
MLS_20_AS - Melange_phy_20_80	-25.307	-45.960	-4.654	***
MLS_20_AS - Melange_phy_5_95	-23.694	-41.469	-5.918	***
MLS_20_AS - MLS_15_AS	13.597	-0.172	27.366	
MLS_20_AS - MLS_10_AS	27.571	13.240	41.902	***
MLS_20_AS - MLS_5_AS	30.143	16.374	43.912	***
MLS_15_AS - AS_seul	-53.230	-66.999	-39.461	***
MLS_15_AS - Melange_phy_20_80	-38.904	-59.558	-18.251	***
MLS_15_AS - Melange_phy_5_95	-37.291	-55.066	-19.515	***
MLS_15_AS - MLS_20_AS	-13.597	-27.366	0.172	
MLS_15_AS - MLS_10_AS	13.974	-0.357	28.305	
MLS_15_AS - MLS_5_AS	16.546	2.777	30.315	***
MLS_10_AS - AS_seul	-67.204	-81.535	-52.873	***
MLS_10_AS - Melange_phy_20_80	-52.878	-73.911	-31.846	***
MLS_10_AS - Melange_phy_5_95	-51.265	-69.479	-33.051	***
MLS_10_AS - MLS_20_AS	-27.571	-41.902	-13.240	***
MLS_10_AS - MLS_15_AS	-13.974	-28.305	0.357	
MLS_10_AS - MLS_5_AS	2.572	-11.759	16.903	
MLS_5_AS - AS_seul	-69.776	-83.545	-56.007	***
MLS_5_AS - Melange_phy_20_80	-55.450	-76.103	-34.797	***
MLS_5_AS - Melange_phy_5_95	-53.837	-71.612	-36.061	***
MLS_5_AS - MLS_20_AS	-30.143	-43.912	-16.374	***
MLS_5_AS - MLS_15_AS	-16.546	-30.315	-2.777	***
MLS_5_AS - MLS_10_AS	-2.572	-16.903	11.759	

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	35.2132
DF	6
Pr > Chi-Square	<.0001

Temps t = 2 heures

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
Melange_phy_5_95	3	91.99	3.30	88.92	88.92	91.58	95.48	95.48
Melange_phy_20_80	2	93.57	5.92	89.39	89.39	93.57	97.76	97.76
AS_seul	7	100.65	0.85	99.42	100.21	100.33	101.58	101.87
MLS_5_AS	7	24.72	3.22	19.11	22.78	24.64	27.51	28.29
MLS_10_AS	6	29.97	4.50	25.83	26.02	28.60	33.70	37.09
MLS_15_AS	7	48.16	11.58	35.56	35.96	48.74	57.07	65.38
MLS_20_AS	7	59.99	6.50	49.89	54.12	61.81	66.28	67.37

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	6	31896.73567	5316.12261	132.64	<.0001

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

	concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits	
AS_seul	- Melange_phy_20_80	7.078	-12.180 26.336	
AS_seul	- Melange_phy_5_95	8.658	-7.917 25.233	
AS_seul	- MLS_20_AS	40.659	27.820 53.497	***
AS_seul	- MLS_15_AS	52.487	39.649 65.326	***
AS_seul	- MLS_10_AS	70.680	57.317 84.043	***
AS_seul	- MLS_5_AS	75.931	63.093 88.770	***
Melange_phy_20_80	- AS_seul	-7.078	-26.336 12.180	
Melange_phy_20_80	- Melange_phy_5_95	1.580	-20.346 23.506	
Melange_phy_20_80	- MLS_20_AS	33.581	14.323 52.839	***
Melange_phy_20_80	- MLS_15_AS	45.409	26.151 64.667	***
Melange_phy_20_80	- MLS_10_AS	63.602	43.990 83.213	***
Melange_phy_20_80	- MLS_5_AS	68.854	49.596 88.111	***
Melange_phy_5_95	- AS_seul	-8.658	-25.233 7.917	
Melange_phy_5_95	- Melange_phy_20_80	-1.580	-23.506 20.346	
Melange_phy_5_95	- MLS_20_AS	32.000	15.426 48.575	***
Melange_phy_5_95	- MLS_15_AS	43.829	27.254 60.404	***
Melange_phy_5_95	- MLS_10_AS	62.022	45.038 79.006	***
Melange_phy_5_95	- MLS_5_AS	67.273	50.699 83.848	***
MLS_20_AS	- AS_seul	-40.659	-53.497 -27.820	***

Annexes

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

	concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
MLS_20_AS	- Melange_phy_20_80	-33.581	-52.839	-14.323	***
MLS_20_AS	- Melange_phy_5_95	-32.000	-48.575	-15.426	***
MLS_20_AS	- MLS_15_AS	11.829	-1.010	24.667	
MLS_20_AS	- MLS_10_AS	30.021	16.658	43.384	***
MLS_20_AS	- MLS_5_AS	35.273	22.434	48.111	***
MLS_15_AS	- AS_seul	-52.487	-65.326	-39.649	***
MLS_15_AS	- Melange_phy_20_80	-45.409	-64.667	-26.151	***
MLS_15_AS	- Melange_phy_5_95	-43.829	-60.404	-27.254	***
MLS_15_AS	- MLS_20_AS	-11.829	-24.667	1.010	
MLS_15_AS	- MLS_10_AS	18.193	4.830	31.555	***
MLS_15_AS	- MLS_5_AS	23.444	10.606	36.283	***
MLS_10_AS	- AS_seul	-70.680	-84.043	-57.317	***
MLS_10_AS	- Melange_phy_20_80	-63.602	-83.213	-43.990	***
MLS_10_AS	- Melange_phy_5_95	-62.022	-79.006	-45.038	***
MLS_10_AS	- MLS_20_AS	-30.021	-43.384	-16.658	***
MLS_10_AS	- MLS_15_AS	-18.193	-31.555	-4.830	***
MLS_10_AS	- MLS_5_AS	5.252	-8.111	18.615	
MLS_5_AS	- AS_seul	-75.931	-88.770	-63.093	***
MLS_5_AS	- Melange_phy_20_80	-68.854	-88.111	-49.596	***
MLS_5_AS	- Melange_phy_5_95	-67.273	-83.848	-50.699	***
MLS_5_AS	- MLS_20_AS	-35.273	-48.111	-22.434	***
MLS_5_AS	- MLS_15_AS	-23.444	-36.283	-10.606	***
MLS_5_AS	- MLS_10_AS	-5.252	-18.615	8.111	

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	35.3670
DF	6
Pr > Chi-Square	<.0001

Temps t = 4 heures

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
Melange_phy_5_95	3	99.70	0.87	98.70	98.70	100.16	100.26	100.26
Melange_phy_20_80	2	100.63	0.75	100.10	100.10	100.63	101.16	101.16
AS_seul	7	101.99	1.40	100.47	100.49	101.91	103.58	103.71
MLS_5_AS	7	45.74	8.05	34.11	36.20	48.17	50.93	55.92
MLS_10_AS	6	59.06	11.78	45.68	46.98	58.44	70.04	74.78
MLS_15_AS	7	70.76	8.14	62.22	63.07	69.93	79.94	81.25
MLS_20_AS	7	76.59	5.19	65.81	74.13	78.31	79.94	80.33

Annexes

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	6	15905.29028	2650.88171	51.24	<.0001

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
AS_seul - Melange_phy_20_80	1.360	-20.520	23.239	
AS_seul - Melange_phy_5_95	2.283	-16.547	21.114	
AS_seul - MLS_20_AS	25.394	10.808	39.980	***
AS_seul - MLS_15_AS	31.230	16.644	45.816	***
AS_seul - MLS_10_AS	42.929	27.747	58.111	***
AS_seul - MLS_5_AS	56.251	41.665	70.838	***
Melange_phy_20_80 - AS_seul	-1.360	-23.239	20.520	
Melange_phy_20_80 - Melange_phy_5_95	0.924	-23.987	25.834	
Melange_phy_20_80 - MLS_20_AS	24.035	2.155	45.914	***
Melange_phy_20_80 - MLS_15_AS	29.870	7.991	51.750	***
Melange_phy_20_80 - MLS_10_AS	41.569	19.288	63.850	***
Melange_phy_20_80 - MLS_5_AS	54.892	33.013	76.771	***
Melange_phy_5_95 - AS_seul	-2.283	-21.114	16.547	
Melange_phy_5_95 - Melange_phy_20_80	-0.924	-25.834	23.987	
Melange_phy_5_95 - MLS_20_AS	23.111	4.280	41.941	***
Melange_phy_5_95 - MLS_15_AS	28.947	10.116	47.777	***
Melange_phy_5_95 - MLS_10_AS	40.645	21.350	59.941	***
Melange_phy_5_95 - MLS_5_AS	53.968	35.137	72.799	***
MLS_20_AS - AS_seul	-25.394	-39.980	-10.808	***
MLS_20_AS - Melange_phy_20_80	-24.035	-45.914	-2.155	***
MLS_20_AS - Melange_phy_5_95	-23.111	-41.941	-4.280	***
MLS_20_AS - MLS_15_AS	5.836	-8.750	20.422	
MLS_20_AS - MLS_10_AS	17.535	2.353	32.716	***
MLS_20_AS - MLS_5_AS	30.857	16.271	45.443	***
MLS_15_AS - AS_seul	-31.230	-45.816	-16.644	***
MLS_15_AS - Melange_phy_20_80	-29.870	-51.750	-7.991	***
MLS_15_AS - Melange_phy_5_95	-28.947	-47.777	-10.116	***
MLS_15_AS - MLS_20_AS	-5.836	-20.422	8.750	
MLS_15_AS - MLS_10_AS	11.699	-3.483	26.881	
MLS_15_AS - MLS_5_AS	25.021	10.435	39.608	***
MLS_10_AS - AS_seul	-42.929	-58.111	-27.747	***
MLS_10_AS - Melange_phy_20_80	-41.569	-63.850	-19.288	***
MLS_10_AS - Melange_phy_5_95	-40.645	-59.941	-21.350	***
MLS_10_AS - MLS_20_AS	-17.535	-32.716	-2.353	***
MLS_10_AS - MLS_15_AS	-11.699	-26.881	3.483	

Annexes

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

	concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
MLS_10_AS	- MLS_5_AS	13.323	-1.859	28.504	
MLS_5_AS	- AS_seul	-56.251	-70.838	-41.665	***
MLS_5_AS	- Melange_phy_20_80	-54.892	-76.771	-33.013	***
MLS_5_AS	- Melange_phy_5_95	-53.968	-72.799	-35.137	***
MLS_5_AS	- MLS_20_AS	-30.857	-45.443	-16.271	***
MLS_5_AS	- MLS_15_AS	-25.021	-39.608	-10.435	***
MLS_5_AS	- MLS_10_AS	-13.323	-28.504	1.859	

Kruskal-Wallis Test

Chi-Square	33.3548
DF	6
Pr > Chi-Square	<.0001

Temps t = 6 heures

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
Melange_phy_5_95	3	99.28	0.83	98.32	98.32	99.74	99.77	99.77
Melange_phy_20_80	2	100.24	0.75	99.71	99.71	100.24	100.77	100.77
AS_seul	7	101.01	1.38	99.67	99.68	100.65	102.83	102.99
MLS_5_AS	7	64.71	9.47	51.10	52.13	70.78	70.91	73.72
MLS_10_AS	6	74.87	5.94	66.71	67.84	77.88	78.91	79.97
MLS_15_AS	7	79.51	3.77	75.00	75.61	80.57	82.85	83.73
MLS_20_AS	7	80.38	2.07	75.75	80.49	81.18	81.41	81.67

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	6	6529.368230	1088.228038	41.49	<.0001

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

	concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
AS_seul	- Melange_phy_20_80	0.769	-14.810	16.347	
AS_seul	- Melange_phy_5_95	1.732	-11.676	15.140	
AS_seul	- MLS_20_AS	20.631	10.246	31.017	***
AS_seul	- MLS_15_AS	21.494	11.109	31.880	***
AS_seul	- MLS_10_AS	26.144	15.334	36.953	***
AS_seul	- MLS_5_AS	36.301	25.916	46.687	***
Melange_phy_20_80	- AS_seul	-0.769	-16.347	14.810	
Melange_phy_20_80	- Melange_phy_5_95	0.963	-16.773	18.700	
Melange_phy_20_80	- MLS_20_AS	19.863	4.284	35.441	***

Annexes

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits	
Melange_phy_20_80 - MLS_15_AS	20.726	5.147	36.304 ***
Melange_phy_20_80 - MLS_10_AS	25.375	9.511	41.239 ***
Melange_phy_20_80 - MLS_5_AS	35.533	19.954	51.111 ***
Melange_phy_5_95 - AS_seul	-1.732	-15.140	11.676
Melange_phy_5_95 - Melange_phy_20_80	-0.963	-18.700	16.773
Melange_phy_5_95 - MLS_20_AS	18.900	5.492	32.307 ***
Melange_phy_5_95 - MLS_15_AS	19.762	6.355	33.170 ***
Melange_phy_5_95 - MLS_10_AS	24.412	10.673	38.151 ***
Melange_phy_5_95 - MLS_5_AS	34.570	21.162	47.977 ***
MLS_20_AS - AS_seul	-20.631	-31.017	-10.246 ***
MLS_20_AS - Melange_phy_20_80	-19.863	-35.441	-4.284 ***
MLS_20_AS - Melange_phy_5_95	-18.900	-32.307	-5.492 ***
MLS_20_AS - MLS_15_AS	0.863	-9.523	11.248
MLS_20_AS - MLS_10_AS	5.512	-5.298	16.322
MLS_20_AS - MLS_5_AS	15.670	5.284	26.056 ***
MLS_15_AS - AS_seul	-21.494	-31.880	-11.109 ***
MLS_15_AS - Melange_phy_20_80	-20.726	-36.304	-5.147 ***
MLS_15_AS - Melange_phy_5_95	-19.762	-33.170	-6.355 ***
MLS_15_AS - MLS_20_AS	-0.863	-11.248	9.523
MLS_15_AS - MLS_10_AS	4.649	-6.160	15.459
MLS_15_AS - MLS_5_AS	14.807	4.422	25.193 ***
MLS_10_AS - AS_seul	-26.144	-36.953	-15.334 ***
MLS_10_AS - Melange_phy_20_80	-25.375	-41.239	-9.511 ***
MLS_10_AS - Melange_phy_5_95	-24.412	-38.151	-10.673 ***
MLS_10_AS - MLS_20_AS	-5.512	-16.322	5.298
MLS_10_AS - MLS_15_AS	-4.649	-15.459	6.160
MLS_10_AS - MLS_5_AS	10.158	-0.652	20.968
MLS_5_AS - AS_seul	-36.301	-46.687	-25.916 ***
MLS_5_AS - Melange_phy_20_80	-35.533	-51.111	-19.954 ***
MLS_5_AS - Melange_phy_5_95	-34.570	-47.977	-21.162 ***
MLS_5_AS - MLS_20_AS	-15.670	-26.056	-5.284 ***
MLS_5_AS - MLS_15_AS	-14.807	-25.193	-4.422 ***
MLS_5_AS - MLS_10_AS	-10.158	-20.968	0.652

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	32.0821
DF	6
Pr > Chi-Square	<.0001

Temps t = 8 heures

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
Melange_phy_5_95	0
Melange_phy_20_80	0
AS_seul	0
MLS_5_AS	7	76.05	8.30	64.01	64.73	80.26	80.60	85.04
MLS_10_AS	6	78.53	1.57	76.15	77.87	78.60	79.03	80.93
MLS_15_AS	7	82.65	1.83	79.57	80.63	83.26	83.98	84.56
MLS_20_AS	7	81.38	0.94	80.22	80.72	81.49	81.76	83.08

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	3	182.2067082	60.7355694	3.09	0.0468

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

concentration Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits	
MLS_15_AS - MLS_20_AS	1.271	-5.866	8.408
MLS_15_AS - MLS_10_AS	4.122	-3.307	11.550
MLS_15_AS - MLS_5_AS	6.601	-0.536	13.738
MLS_20_AS - MLS_15_AS	-1.271	-8.408	5.866
MLS_20_AS - MLS_10_AS	2.850	-4.578	10.279
MLS_20_AS - MLS_5_AS	5.330	-1.807	12.467
MLS_10_AS - MLS_15_AS	-4.122	-11.550	3.307
MLS_10_AS - MLS_20_AS	-2.850	-10.279	4.578
MLS_10_AS - MLS_5_AS	2.480	-4.949	9.908
MLS_5_AS - MLS_15_AS	-6.601	-13.738	0.536
MLS_5_AS - MLS_20_AS	-5.330	-12.467	1.807
MLS_5_AS - MLS_10_AS	-2.480	-9.908	4.949

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	11.1897
DF	3
Pr > Chi-Square	0.0107

Annexe 4 : Détails de l'analyse statistique de l'étude *ex vivo* (dialyse) de la libération de l'AS à partir des MLS

Temps t = 15 minutes

	Measurement							
	N	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
AS_seul	3	16.40	2.05	15.15	15.15	15.29	18.76	18.76
AS_seul_exvivo	3	17.96	2.26	16.04	16.04	17.40	20.45	20.45
MLS_5_AS	0
MLS_5_AS_exvivo	0
MLS_20_AS	0
MLS_20_AS_exvivo	0

AS seul vs AS seul ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	3.66914400	3.66914400	0.79	0.4241

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	8.0000
Two-Sided Pr > Z	0.3827

Temps t = 30 minutes

	Measurement							
	N	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
AS_seul	3	29.44	2.72	27.69	27.69	28.06	32.58	32.58
AS_seul_exvivo	3	30.40	1.59	28.63	28.63	30.86	31.72	31.72
MLS_5_AS	0
MLS_5_AS_exvivo	0
MLS_20_AS	0
MLS_20_AS_exvivo	0

AS seul vs AS seul ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	1.38240000	1.38240000	0.28	0.6261

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	9.0000
Two-Sided Pr > Z	0.6625

Temps t = 45 minutes

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
AS_seul	3	42.96	2.59	40.27	40.27	43.18	45.43	45.43
AS_seul_exvivo	3	42.23	1.62	40.44	40.44	42.63	43.61	43.61
MLS_5_AS	3	22.17	0.82	21.58	21.58	21.83	23.11	23.11
MLS_5_AS_exvivo	3	17.29	2.61	14.48	14.48	17.76	19.64	19.64
MLS_20_AS	3	23.39	6.83	19.08	19.08	19.82	31.27	31.27
MLS_20_AS_exvivo	3	16.79	13.88	3.45	3.45	15.76	31.16	31.16

AS seul vs AS seul ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	0.80666667	0.80666667	0.17	0.6988

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	11.0000
Two-Sided Pr > Z	1.0000

MLS 5 AS vs MLS 5 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	35.72160000	35.72160000	9.53	0.0367

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	15.0000
Two-Sided Pr > Z	0.0809

MLS 20 AS vs MLS 20 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	65.34000000	65.34000000	0.55	0.5011

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	13.0000
Two-Sided Pr > Z	0.3827

Temps t = 60 minutes

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
AS_seul	3	53.81	2.38	51.09	51.09	54.83	55.52	55.52

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
AS_seul_exvivo	3	51.98	1.57	50.40	50.40	52.01	53.54	53.54
MLS_5_AS	3	28.02	1.34	26.58	26.58	28.24	29.24	29.24
MLS_5_AS_exvivo	3	25.40	3.03	21.94	21.94	26.63	27.62	27.62
MLS_20_AS	3	41.34	8.36	32.59	32.59	42.18	49.25	49.25
MLS_20_AS_exvivo	3	32.68	11.16	23.62	23.62	29.28	45.14	45.14

AS seul vs AS seul ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	5.02335000	5.02335000	1.23	0.3290

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	13.0000
Two-Sided Pr > Z	0.3827

MLS 5 AS vs MLS 5 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	10.32281667	10.32281667	1.87	0.2428

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	13.0000
Two-Sided Pr > Z	0.3827

MLS 20 AS vs MLS 20 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	112.4934000	112.4934000	1.16	0.3425

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	13.0000
Two-Sided Pr > Z	0.3827

Temps t = 90 minutes

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
AS_seul	3	70.15	3.36	66.31	66.31	71.57	72.56	72.56
AS_seul_exvivo	3	65.89	1.89	64.68	64.68	64.93	68.07	68.07
MLS_5_AS	3	36.47	6.26	29.69	29.69	37.71	42.02	42.02
MLS_5_AS_exvivo	3	32.55	4.00	28.11	28.11	33.67	35.86	35.86

	Measurement							
	N	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
MLS_20_AS	3	43.50	12.07	33.93	33.93	39.52	57.06	57.06
MLS_20_AS_exvivo	3	41.90	9.21	34.28	34.28	39.30	52.13	52.13

AS seul vs AS seul ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	27.13626667	27.13626667	3.65	0.1285

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	14.0000
Two-Sided Pr > Z	0.1904

MLS 5 AS vs MLS 5 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	23.12806667	23.12806667	0.84	0.4114

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	13.0000
Two-Sided Pr > Z	0.3827

MLS 20 AS vs MLS 20 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	3.84000000	3.84000000	0.03	0.8640

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	11.0000
Two-Sided Pr > Z	1.0000

Temps t = 2 heures

	Measurement							
	N	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
AS_seul	3	81.80	3.20	78.51	78.51	81.99	84.90	84.90
AS_seul_exvivo	3	75.98	2.38	74.55	74.55	74.66	78.73	78.73
MLS_5_AS	3	41.27	8.03	32.00	32.00	45.73	46.09	46.09
MLS_5_AS_exvivo	3	37.85	4.51	32.97	32.97	38.72	41.87	41.87
MLS_20_AS	3	51.13	12.32	42.01	42.01	46.24	65.14	65.14
MLS_20_AS_exvivo	3	49.66	6.94	43.76	43.76	47.92	57.30	57.30

AS seul vs AS seul ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	50.80860000	50.80860000	6.39	0.0649

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	14.0000
Two-Sided Pr > Z	0.1904

MLS 5 AS vs MLS 5 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	17.54460000	17.54460000	0.41	0.5553

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	12.0000
Two-Sided Pr > Z	0.6625

MLS 20 AS vs MLS 20 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	3.24135000	3.24135000	0.03	0.8658

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	10.0000
Two-Sided Pr > Z	1.0000

Temps t = 3 heures

	Measurement							
	N	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
AS_seul	3	96.42	3.78	92.75	92.75	96.21	100.31	100.31
AS_seul_exvivo	3	89.48	2.92	87.72	87.72	87.88	92.85	92.85
MLS_5_AS	3	49.38	8.21	40.01	40.01	52.87	55.27	55.27
MLS_5_AS_exvivo	3	49.35	4.98	44.60	44.60	48.92	54.54	54.54
MLS_20_AS	3	60.26	10.54	53.94	53.94	54.41	72.43	72.43
MLS_20_AS_exvivo	3	58.70	4.97	53.70	53.70	58.77	63.64	63.64

AS seul vs AS seul ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	72.24540000	72.24540000	6.33	0.0657

Annexes

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	14.0000
Two-Sided Pr > Z	0.1904

MLS 5 AS vs MLS 5 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	0.00135000	0.00135000	0.00	0.9959

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	11.0000
Two-Sided Pr > Z	1.0000

MLS 20 AS vs MLS 20 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	3.63481667	3.63481667	0.05	0.8284

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	11.0000
Two-Sided Pr > Z	1.0000

Temps t = 4 heures

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
AS_seul	3	102.76	1.74	101.37	101.37	102.21	104.71	104.71
AS_seul_exvivo	3	97.46	1.76	96.16	96.16	96.76	99.47	99.47
MLS_5_AS	3	56.57	14.76	40.37	40.37	60.07	69.26	69.26
MLS_5_AS_exvivo	3	54.14	4.33	49.85	49.85	54.06	58.50	58.50
MLS_20_AS	3	66.51	8.41	60.03	60.03	63.48	76.01	76.01
MLS_20_AS_exvivo	3	64.10	3.41	60.41	60.41	64.76	67.13	67.13

AS seul vs AS seul ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	42.13500000	42.13500000	13.75	0.0207

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	15.0000
Two-Sided Pr > Z	0.0809

MLS 5 AS vs MLS 5 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	8.85735000	8.85735000	0.07	0.7979

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	12.0000
Two-Sided Pr > Z	0.6625

MLS 20 AS vs MLS 20 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	8.68806667	8.68806667	0.21	0.6698

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	10.0000
Two-Sided Pr > Z	1.0000

Temps t = 6 heures

	Measurement							
	N	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
AS_seul	3	105.99	2.22	104.35	104.35	105.10	108.52	108.52
AS_seul_exvivo	3	101.77	1.86	99.63	99.63	102.73	102.96	102.96
MLS_5_AS	3	65.32	16.18	50.85	50.85	62.32	82.79	82.79
MLS_5_AS_exvivo	3	65.35	4.19	61.51	61.51	64.72	69.81	69.81
MLS_20_AS	3	73.47	5.97	68.50	68.50	71.82	80.10	80.10
MLS_20_AS_exvivo	3	70.43	2.55	67.49	67.49	71.83	71.98	71.98

AS seul vs AS seul ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	26.67041667	26.67041667	6.35	0.0654

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	15.0000
Two-Sided Pr > Z	0.0809

MLS 5 AS vs MLS 5 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	0.00106667	0.00106667	0.00	0.9979

Annexes

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	10.0000
Two-Sided Pr > Z	1.0000

MLS 20 AS vs MLS 20 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	13.86240000	13.86240000	0.66	0.4631

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	11.0000
Two-Sided Pr > Z	1.0000

Temps t = 8 heures

	N	Measurement						
		Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
AS_seul	0
AS_seul_exvivo	0
MLS_5_AS	3	72.23	14.05	60.80	60.80	67.98	87.92	87.92
MLS_5_AS_exvivo	2	71.72	0.56	71.32	71.32	71.72	72.11	72.11
MLS_20_AS	3	78.51	3.38	75.76	75.76	77.50	82.28	82.28
MLS_20_AS_exvivo	3	76.42	0.67	75.65	75.65	76.76	76.86	76.86

MLS 5 AS vs MLS 5 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	0.32240333	0.32240333	0.00	0.9637

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	7.0000
Two-Sided Pr > Z	0.7728

MLS 20 AS vs MLS 20 AS ex vivo

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
concentration	1	6.55215000	6.55215000	1.11	0.3523

Wilcoxon Two-Sample Test	
Statistic	13.0000
Two-Sided Pr > Z	0.3827

PUBLICATIONS

Expert Opinion

1. Introduction
2. Solid lipid microparticle preparation techniques
3. Solid lipid microparticles characterisation
4. *In vitro* drug release study
5. Administration routes, *in vivo* drug release and biocompatibility studies
6. *In vivo* fate
7. Expert opinion and conclusion

Ashley Publications
www.ashley-pub.com



Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterisation, drug release and applications

Séverine Jaspard¹, Géraldine Piel, Luc Delattre & Brigitte Evrard

¹University of Liège, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Tour 4, étage 2, Avenue de l'hôpital 1, 4000 Liège, Belgium

This review details the properties of solid lipid microparticles (SLMs): a promising drug carrier system that has been until now rather unexploited. First, the advantages of SLMs compared with other drug carrier systems are listed. Then an overview of SLM manufacturing compounds and techniques is presented. A detailed discussion of the characteristics of SLMs follows, and includes the determination of particle size distribution, the determination of SLM morphology, the solid-state analysis, the determination of SLM drug loading and the factors influencing it. The *in vitro* drug release studies that have been carried out so far and the parameters affecting them are also described. Some preliminary *in vivo* aspects (*in vivo* drug release studies, biocompatibility studies and *in vivo* fate) are also considered.

Keywords: administration routes, characterisation, drug loading, drug release, preparation, solid lipid microparticles

Expert Opin. Drug Deliv. (2005) 2(1):75-87

1. Introduction

There is increasing need to develop suitable drug carrier systems in order to control, localise and improve drug delivery. Many different drug carriers can be used depending on the administration route, the chosen drug properties and the intended drug release profile. The carriers that have been the most often studied in the controlled release of the incorporated substances are:

- liposomes
- polymeric nano- and microparticles
- cyclodextrins
- solid lipid nanoparticles (SLNs)

Liposomes are spherical particles composed of one or more concentric phospholipid bilayers alternating with aqueous partition. This kind of structure makes it possible to incorporate lipophilic drugs into lipid bilayers as well as hydrophilic drugs into the aqueous compartment. Liposomes are one of the most investigated drug carrier systems. Drug release from liposomes, stability and pharmacokinetic profiles depend on liposome composition, size and surface charge, and drug solubility. Liposome formulations of many different drugs show a significant increase in therapeutic activity compared with nonliposomal formulations. Liposomes are biocompatible and biodegradable, but also have some disadvantages including low stability, low encapsulation efficiency, high cost and difficulties for scaling up production [1-5].

Polymeric nano- and microparticles are general terms that include nano- and microspheres (consisting of a polymeric matrix) as well as nano- and microcapsules (reservoir systems composed of a solid or liquid core which can contain either dispersed or dissolved drugs and which is surrounded by a thin polymer layer).

Table 1. Lipid excipients used in solid lipid microparticles.

Category	Description	References
Fatty alcohol	Cetyl alcohol	[20]
	Stearyl alcohol	[21,22]
Fatty acid	Stearic acid (C18 fatty acid)	[20,22,23]
Fatty acid esters of glycerol	Glyceryl monostearate	[20,22,24]
	Glyceryl monobehenate	[24]
	Glyceryl behenate	[20,23,25-28]
	Glyceryl palmitostearate	[28-30]
	Glyceryl ditristearate	[20,28]
	Glyceryl tripalmitate	[1,10,28,31-33]
Fatty acid esters of polyglycerol	Glyceryl tristearate	[28,34]
	Tetraglycerol pentastearate	[22]
	Tetraglycerol monostearate	[22]
Hydrogenated fatty acid ester	Hydrogenated hardened castor oil	[23]
Polar wax	Complex mixture containing, e.g., esters of acids and hydroxyacids	[20,22,23,29,30,35]
Others	Saturated polyglycolised glycerides	[26,29,30,36]
	Beeswax	[29,30,37,38]
	Paraffin wax	[24]
	Cholesterol	[24,39]
	Phospholipids	[39]
	Microcrystalline wax	[21]

Hydrophilic and lipophilic drugs can be incorporated or entrapped into polymeric nano- and microparticles with relatively high efficiency. These kinds of drug carrier systems have proved to be more physicochemically stable than liposomes both *in vivo* and during storage. Their main disadvantages are that preparation methods generally require organic solvents and that large-scale production is rather difficult. Moreover it is crucial to choose suitable polymers that have proved to be nontoxic, biodegradable and nonimmunogenic [2,5,6-9]. Synthetic polymer matrix materials have also been suspected to lead to detrimental effects on peptides and proteins incorporated during the manufacturing process [10].

Cyclodextrins have also been studied as a potential drug carrier system that could modulate drug release rate. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides composed of six (α -cyclodextrin), seven (β -cyclodextrin), eight (γ -cyclodextrin) or

more glucopyranose units. They are known for being able to include apolar molecules inside their hydrophobic cavities and provide these guest molecules with better stability, higher water solubility and increased bioavailability and/or decrease undesirable side effects. However, so far, no study has established the ability of cyclodextrins to induce a controlled release of the included drug *in vivo* [2,11-13].

SLNs were developed in the early 1990s and have since been considered to be promising drug carrier systems, especially with a view to giving the incorporated active substance a sustained-release profile. Compared with liquid lipid formulations, such as fat nanoemulsions, drug mobility is indeed lower in solid lipids than in liquid oils. SLNs are in the sub-micron size range (50–1000 nm) and are composed of a lipidic matrix that is in the solid state at room temperature. They seem to provide an alternative drug carrier system to liposomes and polymeric nanoparticles. SLNs indeed combine several of those carriers advantages while avoiding some of their disadvantages. The lipids used are similar to physiological lipids, so toxicity is reduced. SLNs are physicochemically stable and can be produced relatively easily on a large industrial scale. In addition, raw materials and production costs are relatively low. Their most important limitation is that the drugs that have to be incorporated into SLNs must be lipophilic enough so as to ensure high entrapment efficiency (EE). So far, SLNs have been studied for parenteral and oral administration, and topical application [1,14-19].

This review describes solid lipid microparticles (SLMs), production methods, characterising methods, the ability of SLMs to be used as drug carrier systems, and applications of SLMs. The composition of SLMs is equivalent to SLNs, but in the micrometre size range. Given the similar compositions of SLNs and SLMs, SLMs may also be considered as physiologically compatible, physicochemically stable and allowing a large-scale production. The difference between SLNs and SLMs lies in their respective size ranges, meaning that their application domains and administration routes can be different. Nevertheless, SLMs as well as SLNs, in their respective application fields, can both be considered as promising drug delivery systems. However, so far, SLMs have remained rather untapped.

2. Solid lipid microparticle preparation techniques

2.1 Materials

Commonly used materials for SLM manufacturing are:

- Lipids, including fatty alcohols, fatty acids, fatty acid esters of glycerol (mono-, di- and/or triglycerides), waxes, cholesterol etc. A summary of regularly used materials is presented in Table 1.
- Surfactants: many different surfactants can be used, as presented in Table 2.
- Water

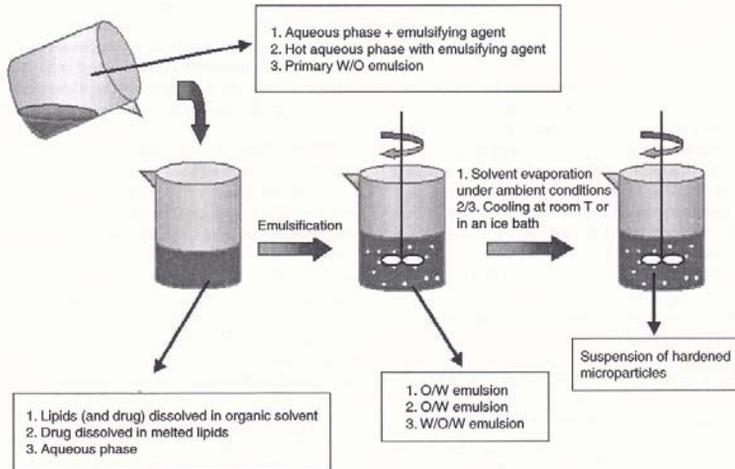


Figure 1. Schematic representation of solid lipid microparticles production by: (1) solvent evaporation method; (2) O/W melt dispersion technique; and (3) W/O/W double emulsion technique. Modified from CORTESI R, ESPOSITO E, LUCA G *et al.*: Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials* (2002) **23**(11): 2283-2294 [42].

Table 2. Emulsifiers used for solid lipid microparticles manufacturing.

Description	References
Poloxamer 188	[25,27,30]
Poloxamer 407	[20]
Polysorbate 40	[1]
Polysorbate 80	[26,37]
Sorbitane monopalmitate	[1]
Sodium dodecyl sulphate	[1,25,29,30]
Polyvinyl alcohol	[10,25,29]
Soya lecithin	[1,21]
Egg phosphatidyl choline	[34]

2.2 Preparation techniques

Studies have shown that simply mixing the ingredients is not sufficient to ensure controlled-release SLMs formulation [40,41]. Drug release cannot be prolonged, based on a solid matrix where drug and lipids are just physically mixed. The

production technique must allow the drug to dissolve or to disperse into lipids.

2.2.1 Solvent evaporation method

A similar method is widely used for the preparation of polymer microparticles. The classical solvent evaporation method regularly used is described in Figure 1. Lipids are first dissolved in an organic solvent (most often chlorinated solvents) and are then emulsified in an aqueous phase containing an emulsifying agent. The resulting O/W emulsion is finally stirred for several hours under ambient conditions in order to allow the solvent evaporation [42]. A modified solvent evaporation method has also been widely described [10,31,33]. In this technique the lipids are also first dissolved in an organic solvent. By mixing, the drug is then incorporated into the organic phase either as a solid (S/O/W) which has been first grinded in a mortar in the presence of liquid nitrogen, or dissolved in an aqueous solution (W/O/W). The obtained preparation is then emulsified into an aqueous surfactant solution. The emulsion is poured into an ice-cooled aqueous phase and stirred. Obtained

microparticles are filtered, rinsed with water and dried in a desiccator.

2.2.2 O/W melt dispersion technique (for lipophilic drugs)

[10,27,29,31,34,37,38,42]

This is also called hot melt microencapsulation technique (which can be carried out by normal or phase inversion technique). The drug is dissolved in the melted lipid (the melting temperature depending on the lipid used). The hot mixture is emulsified into an aqueous surfactant solution that is heated above the lipid melting point. The O/W emulsion can then be poured into a larger volume of ice-cooled aqueous phase [10,29,31]. The emulsion, which is obtained by mixing with a high shear device (e.g., Ultra-Turrax® [IKA], or Silverson mixer), is finally allowed to cool either at room temperature or in an ice bath (Figure 1).

Hardened microparticles are filtered, rinsed with water and dried in a vacuum desiccator.

2.2.3 W/O melt dispersion technique (for hydrophilic drugs)

[21]

This method is a variant of the O/W melt dispersion technique, but it is used for water-soluble drugs. This process does not use water in order to avoid excessive drug solubility into the external aqueous phase and thereby low drug loading in microparticles. First, the drug is dispersed into the melted lipid together with the surfactant. A hot nonaqueous continuous phase (e.g., silicone oil) is poured into the molten lipid phase. The obtained dispersion is then rapidly cooled through cold oil addition and immersion in an ice bath. Solidified microparticles are separated from oil by centrifugation and are finally washed and dried.

2.2.4 W/O/W multiple emulsion technique for water-soluble drugs

A heated aqueous drug solution is emulsified into the melted lipid. The obtained primary W/O emulsion is put into an external aqueous phase and stirred so as to get a W/O/W emulsion. The latter is then cooled either in an ice bath [30] or at room temperature under stirring [42] (Figure 1). Hardened microparticles are filtered, rinsed with water and finally dried in a vacuum desiccator.

2.2.5 High-pressure homogenisation

The homogeniser can reduce particle size to the micro- or even the nanometre range of size depending on composition and process parameters.

2.2.5.1 Hot homogenisation

A pre-emulsion is obtained by mixing a hot aqueous surfactant solution with the drug-loaded lipid melt, using a high shear device. The high-pressure homogeniser is preheated at a temperature above the lipid melting point [25,26,43]. The pre-emulsion is put through the homogeniser once or several times. Formulations are then allowed to cool at room temperature.

2.2.5.2 Cold homogenisation

[26,43]
The drug is dissolved into the melted lipid. After solidification, the mixture is milled in liquid nitrogen or dry ice with the help of a mortar mill. Grinded particles are then dispersed into an aqueous surfactant solution heated at 5–10°C below the lipid melting point. Particles can be disrupted by putting them through the homogeniser once or several times.

2.2.6 Microchannel emulsification technique

[44,45]
This technique is considered to be a novel method used to prepare monodisperse O/W and W/O emulsions without high mechanical stress and at lower energy input compared with conventional emulsification processes.

A silicon microchannel (MC) plate, which is fabricated by micromachining technology, is used, and droplets are produced by forcing the dispersed phase into the continuous phase through the MCs. The droplet size is precisely regulated by the structure of the MCs. This manufacturing technique yields monodispersed droplets. A SLM suspension is obtained after cooling the emulsion at room temperature.

2.2.7 Cryogenic micronisation

Lipid matrices, obtained either by melt dispersion (the drug is added to the molten lipid under magnetic stirring, the melting temperature depending on the lipid used) or solvent stripping (the drug and lipid are dissolved into a solvent mixture under stirring, e.g., benzyl alcohol/ethanol [24]), are stored at -80°C and then micronised in a customised apparatus supplying liquid nitrogen during the process. Obtained powders are finally sieved in an automatic sieving apparatus. This technique can be used for particles of $\pm 5-5000 \mu\text{m}$ in diameter according to the chosen sieves.

2.2.8 Spray congealing (also called spray chilling)

[20-23,28,36,41,46]

Lipophilic material is heated to a temperature above its melting point. The drug is then dissolved into the melt. The hot mixture is atomised with a pneumatic nozzle into a vessel that is stored in a carbon dioxide ice bath. Obtained particles are finally vacuum dried at room temperature for several hours [20,28,41].

In the first variant of this technique, the melted mixture is atomised by ultrasound energy into small droplets that fall freely and solidify by cooling at room temperature [21,23,36].

Another variant of the spray chilling method, using a rotating disc, has also been described [22]. With this method the melted mixture is dropped onto a high-speed rotating disc. The rotation causes the molten mixture to spread and spray from the disc periphery onto a chilled surface from which microparticles are collected (Figure 2).

2.2.9 Spray drying

[28,39,46]

Lipids and the lipophilic drug are dissolved simultaneously into an organic solvent. The mixture is then spray dried in order to get solid lipid particles (Figure 3).

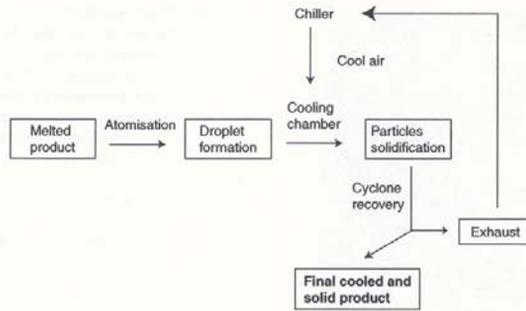


Figure 2. Schematic representation of the spray congealing process.

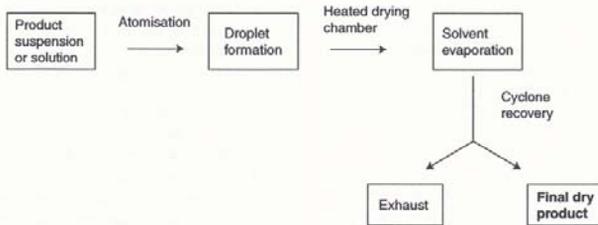


Figure 3. Schematic representation of the spray drying process.

3. Solid lipid microparticles characterisation

3.1 Determination of particle size distribution

3.1.1 Laser diffractometry

Laser diffractometry (LD) size analysis is based on the principle that particles of a given size diffract light through a given angle, which increases with decreasing particle size. Two different diffraction theories can be used (Mie and Fraunhofer) to determine the size distribution from the light intensity reaching the detectors. However, it is important to notice that the LD technique does not measure particle size in the strict sense, but rather calculates size from light scattering effects.

The laser diffraction technique has the advantage of covering a broad size range (from the nanometre to the lower millimetre range [15,47]) while being usable with wet as well as dry samples. This way, LD seems to be one of the most convenient techniques for SLM size determination: submicronic particles as well as aggregates can be identified in microparticles populations.

The results can be expressed in terms of standard percentiles $D(v, 0.9)$, $D(v, 0.5)$ (= mass median diameter) and $D(v, 0.1)$, which correspond to size values below which 90, 50 or 10% of sample particles lie. The span value is the measurement of size distribution width and is calculated as follows [24,48]:

$$\text{Span} = [D(v, 0.9) - D(v, 0.1)] / D(v, 0.5)$$

3.1.2 Electrical zone sensing method

The electrical zone sensing method, also called electroresistance particle counting method (with 'Coulter counter multi-sizer' or 'Elzones' instruments), is based on the principle that when a particle suspended in a conducting liquid gets through a small orifice, on either side of which are electrodes, a change in electric resistance occurs. A known suspension volume is actually drawn through an orifice, which is the only conducting path between two electrodes. The resistance between those electrodes is monitored. When a particle gets through the orifice, a pulse increase in resistance appears. The increase in resistance is proportional to the particle volume. As a result, the distribution of pulse magnitudes can be used as a measurement of particle volume distribution [48-50].

3.1.3 Scanning electron microscopy and optical microscopy [48,50]

Both techniques are used to determine particle size, particle shape and surface characteristics simultaneously. The main disadvantage of such techniques is that they can only examine

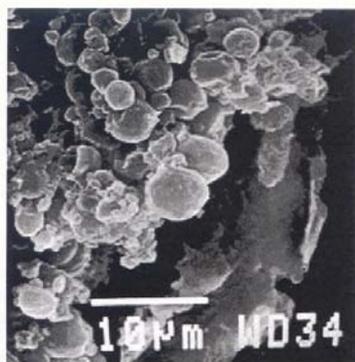


Figure 4. Scanning electron microscopy photomicrographs of solid lipid microparticles. Taken from SANNAN V, KIRSCHVINK N, GUSTIN P *et al.*: Preparation and *in vivo* toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration. *AAPS PharmSciTech* (2004) 5(2): Article 27 [27], with permission.

a rather small number of particles. Indeed, the number of particles that need to be counted (300 – 500) to obtain a good distribution estimate causes the method to be slow and tedious. In addition, the diameter is obtained from only two particle dimensions (i.e., length and breadth). No estimation of particle thickness is available.

We generally tend to consider that optical microscopy makes it possible to measure particles of 1 – 100 μm in size. Electron microscopy can measure particles of 0.01 – 1 μm .

Optical microscopy seems to be sufficient to determine SLM size if distribution is monodispersed. However, SLM populations often contain some submicronic particles that can only be detected by using scanning electron microscopy (Figure 4).

3.1.4 Sieving analysis

This method uses a series of standard sieves in a range of standard diameters. A given powder mass is placed on the first sieve (with the broadest mesh) in a mechanical shaker. The powder is shaken for a given period of time and the material that gets through one sieve and is retained on the next, finer sieve, is collected and weighed [50,51]. Sieving is a straightforward technique able to produce a separated size fraction for possible further studies. This technique should be avoided for particles < 40 μm , fragile particles, irregular particles such as elongated needles, particles sticking to the sieves or forming clumps, and particles electrostatically charged [48].

3.1.5 Image analysis system

The image analysis system is a new technology developed to determine and analyse particle size (0.7 – 2000 μm) and shape. This technology can be seen as a kind of automated microscope: combining the precision and sensitivity of an ordinary microscope with the statistical significance of the number of analysed particles – this being carried out either in real time [101] or within a few minutes [52]. Its ability to analyse particle shape provides users with high-quality, helpful information to characterise materials completely (emulsions, suspensions or powders) [52]. As a result, the image analysis system can be used in order to better understand material behaviour (e.g., powder flowability). Morphological parameters determined by the software include sieving diameter [101], mean diameter, convexity, roundness and elongation, among others.

This technology is bound to become increasingly popular, although the apparatus still remains rather expensive [48].

3.1.6 Determination of aerodynamic size distribution

[48,53,54]

Aerodynamic size analysis only concerns the inhalation field. The aerodynamic diameter of particles or droplets is actually the most important parameter influencing aerosol deposition. This parameter is defined as the diameter of a unit-density sphere with the same settling velocity, generally in air, as the particle. This includes particle shape, density and physical size, all of which influence the particle aerodynamic diameter [53]. The determination of aerodynamic size distribution is useful to determine the respirable fraction [54]. Such determination is generally carried out with a cascade impactor. The principle on which these impactors operate is based on the aerodynamic behaviour of aerosol particles. They use the principle of inertial separation to size particulate samples from the gas stream. The impactor usually has several stages for particle size determination, each of which gives a cut off point based on the particle aerodynamic diameter.

3.2 Determination of solid lipid microparticle morphology

The general morphology of SLMs is most often determined by microscopy (scanning electron microscopy or optical microscopy, see Section 3.1.3), but can also be studied by using new image analysis technology (see Section 3.1.5). The shape of SLMs can be significantly different from a spherical shape.

The surface characteristics of SLMs (smooth or rough, regular or not) can be visualised by microscopy. Their surface morphology has proved to vary depending on the excipients used [41].

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), also known as electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA), is a high-resolution technique for the elemental analysis of solid materials surfaces. Consequently, XPS can determine the atomic composition of the particles surface. XPS is based on the emission of electrons from materials in response to photon

irradiation, with sufficient energy to cause the core level electron ionisation. These electrons are emitted at energies characterising the atoms from which they are emitted. In view of the fact that photons have a low penetration energy, only electrons belonging to surface atoms or just underneath surface atoms (up to 100 Å) escape and are counted.

This technology is used to gather information on drug distribution in microparticles; in particular, to know if the drug is present on the surface of particles or really entrapped within them. Surprisingly, XPS is still rarely used in the microencapsulation field [21,31,55,56]. This technique can be used when the compound to be localised contains atoms that can emit electrons after photon irradiation and are not present in carrier materials (e.g., Cl, N).

3.3 Solid-state analysis of solid lipid microparticles

This characterisation step is necessary in order to detect possible modifications in the physicochemical properties of the drug incorporated into SLMs and of the lipophilic excipients. It has been proved that although particles were produced from crystalline raw materials, the presence of emulsifiers, the preparation method and the high-shear dispersion may account for changes in the crystallinity of matrix constituents compared with bulk materials. This may lead to liquid, amorphous or only partially crystallised metastable systems [57,58].

It has also been proved that with lipid drug delivery systems polymorphic transformations may occur during dosage form preparation and subsequent storage. Indeed, during the melt solidification, triglycerides and fatty acids in particular can crystallise into different polymorphic forms (i.e., the thermodynamically unstable α -form, the β' -form, the stable β -form) depending on lipid composition and cooling rates. Polymorphic transformations may cause changes in active and auxiliary substances solubilities and melting points. In particular, the conversion of one polymorph into another may change the physical properties of the substance [10,28,59].

Indeed, considering that the degree of lipid crystallinity and the possible modifications in the lipid's solid state are correlated with drug incorporation and release rates, and considering that the drug's solid-state form (amorphous or crystalline) in solid dispersions influences dissolution rates, it is important to pay special attention to these parameters [1,41].

The solid states of bulk materials, as well as solid states obtained from solid dosage forms (SLMs), are generally analysed by means of the following different techniques:

3.3.1 Differential scanning calorimetry

Differential scanning calorimetry (DSC) is one of the most widely used techniques to study solid state, and especially to determine compound purity, stability and polymorphism. This technique relies on the principle that solid-state modifications are characterised by different melting points and melting enthalpies [1]. DSC indeed measures transition temperatures (solidification and melting temperatures, glass

transition temperature, thermal degradation temperature) as well as transition enthalpies [60].

3.3.2 X-ray diffraction

X-ray diffraction is based on the principle that X-rays are diffracted by crystals, considering that their wavelengths have about the same magnitude as the distance between crystal atoms or molecules. This technique makes it possible to investigate a crystal structure [61] to assess the compound possible amorphisation, elucidate some polymorphic transformations and study interactions between active substances and microparticle excipients [36].

3.3.3 Hot stage microscopy

Hot stage microscopy (HSM) is an analytical technique that combines the best properties of microscopy and thermal analysis in order to carry out characterisation of the physical properties of the material as a function of temperature. Combined with high-resolution cameras and image manipulation software, this technique is often used to confirm the transitions observed with other techniques [62]. The solid states of bulk drugs (lipophilic excipients and active substances) as well as the solid state of obtained SLMs can be characterised by this technique. The main advantages of HSM are the possibility to identify which particles (characterised by their shapes and sizes) are first concerned by state transition, and the possibility to distinguish between the excipient's behaviour and the drug.

3.3.4 Fourier transform raman spectroscopy and infrared spectroscopy

Fourier transform raman spectroscopy and infrared spectroscopy are useful tools for investigating the structural properties of lipids [1]. These techniques have proved to be highly sensitive to structural differences in a molecule's functional groups that can take place during crystallisation or polymorphic transformations [63]. As a result, they can be used in the field of SLMs to study the solid-states of bulk materials or solid dosage forms, and in particular to detect interactions between active substances and lipophilic excipients in molten samples [20,41].

3.4 Drug loading determination

A few drugs or peptides with various lipophilicity degrees have been incorporated into SLMs; for example, carbamazepine [36], theophylline [22,23,29], fenbufen [23], hydrocortisone [29], ibuprofen [29], ketoprofen [29], indomethacin [29], pseudoephedrine HCl [30], fluorouracil [35,38], ftorafur [38], insulin [31,33], thymocartine [31], gonadotropin release hormone [24], DNA [32], pibredil [26,64], medroxyprogesteron acetate [28], estradiol 17- β cypionate [28], somatostatin [10], verapamil HCl [21] and felodipine [20,41].

The determination of drug loading (or drug incorporation) is an important tool to evaluate a potential drug carrier system. It is obviously desirable to produce microparticles with high drug content in order to decrease the amount of

microparticles to be administered, whatever the administration route.

Drug incorporation into microparticles can be expressed in terms of theoretical drug loading, real drug loading or entrapment efficacy:

- Theoretical drug loading is expressed in a percentage related to the lipidic phase (lipidic matrix + drug). Theoretical drug loading (%) = (drug weight x 100)/(drug weight + excipient weight).
- (Real) drug loading or drug content is expressed as a percentage related to the lipidic phase (lipidic matrix + drug). Drug loading (%) = (real amount of drug, assayed in SLM sample x 100)/total weight of SLM sample.
- Encapsulation efficiency (or entrapment efficacy or loading efficiency) (EE) is calculated as a percentage related to the total amount of drug initially used. EE (%) = (amount of drug incorporated x 100)/amount of drug initially used.

The drug loading and EE can be influenced by a large number of factors. The most often quoted parameters are the following:

- The drug solubility in melted lipids should be high enough to obtain a sufficient drug loading [29] and thereby a relatively higher EE.
- The chemical and physical state of the solid lipid matrix and of the drug to be incorporated have an influence on EE.
- The choice of the preparation method can also influence the EE of the drug into SLMs. For example, the melt dispersion technique generally gives higher encapsulation efficiency than does the solvent evaporation technique [10,31], whereas the cold homogenisation technique generally gives higher drug loading than hot homogenisation [26].
- The way the drug is initially dispersed into the lipid at the initial stage of the preparation (i.e., in the solid state or as a solution) can also be considered as a relevant factor influencing EE [10].
- Increasing SLM's particle size generally leads to a higher drug loading. This parameter has been studied by determining and comparing drug loadings of SLM in different size fractions of the sample [23,36]. It has also been noticed that some of the smallest particles are formed by pure excipients only (empty spheres) [23].
- The theoretical initial drug loading influences encapsulation efficiency, which generally decreases when the theoretical loading increases [10,31,33]. In this case, it is important to use relatively high theoretical drug loading in order to get sufficient drug content, but the theoretical drug loading must also be limited to avoid a decrease in encapsulation efficiency and a resulting waste of drug. Some research has reached contrasting conclusions which could be accounted for by poor water solubility of the drug, and therefore by a smaller relative drug loss with increasing theoretical loading [29].

- In some special cases, the external aqueous phase pH can influence SLM's drug loading; for example, if the drug is hydrophilic (e.g., when the drug is a peptide, such as insulin [31,33]), the external aqueous phase pH can be adjusted in order to decrease drug aqueous solubility and thereby enhance drug-loading efficiency.

Because of all these parameters can influence encapsulation efficiency, various formulations and processes have to be studied in order to maximise drug content in microparticles. Drug content optimisation can be achieved with the help of experimental design methodology, which makes it possible to study several parameters simultaneously on one or many chosen responses; for example, drug content [65,66]. It is also important to notice that drug loading might lead to some changes in SLM size distribution [35].

Drug loading and encapsulation efficiency are generally determined as follows. SLMs are first isolated from the aqueous phase. The aqueous SLM suspension is either filtered or centrifuged, or even ultrafiltered (for the smallest microparticles), to separate SLMs from the aqueous phase. Particles are then rinsed with water in order to eliminate the drug crystals that are not incorporated into SLMs. Finally, obtained particles are dried. SLMs are then either dissolved into an appropriate solvent or heated with a suitable aqueous solvent in which the drug is soluble and shaken in order to extract the drug in the solvent. The drug assay is carried out on the obtained solution: generally by means of a spectrophotometrical technique.

The preparation of SLMs by spray congealing or spray drying does not use water, which makes it possible to avoid the separation step between SLMs and the aqueous phase.

As described in Section 3.2 of this review, XPS analysis can give further information about the encapsulation of drug into SLMs. This technique is used to localise the drug inside the particle, and thereby to know whether the drug is present on the surface of the particles or really entrapped within them.

4. *In vitro* drug release study

As described in Section 1, SLMs are mainly used to ensure the incorporated drug release is controlled. Therefore, a drug release study has to be carried out on obtained SLMs.

Drug release profiles are determined by an *in vitro* dissolution test. This test is generally carried out according to the Pharmacopoeia (USP or European Pharmacopoeia) guidelines; for example, by using a basket or paddle stirring apparatus. The dissolution medium is chosen depending on the intended administration route. The sample can be put either into a cell with two chambers (one chamber contains the sample, the other chamber is the acceptor compartment) separated by a stainless steel sieve plate (with pores of a chosen diameter) [31,33], or into a dialysis tubing device [34]. In order to improve the wettability of microparticles, a surfactant is generally

added to the dissolution medium [22,38]. Drug release is finally assayed spectrophotometrically. In the special case of topical administration, the drug release study was completed with the help of the Franz diffusion cell technique [37].

It has also been noticed that a 24-h time interval is considered sufficient to study the sustained-release potential of drug carrier systems (i.e., SLMs) [24]. Release profiles can be further studied by determination of two statistical moments: i) the *in vitro* mean dissolution time (MDT_{*in vitro*}); and ii) the variance in dissolution time (VR_{*in vitro*}); and an associated statistical parameter, the concentration–time profile relative dispersion (RD). The way to calculate these parameters has been described by Passerini *et al.* [21]. The statistical moment approach has the advantage of allowing the dissolution curve to be separated into stages and, therefore, to check for modifications in the release mechanism during the dissolution test [21].

Drug release is expected to be affected by several parameters. First, the dissolution medium [26,41,67] and the dissolution method [68] must be both correctly chosen in order to get a correct prediction of the *in vivo* drug release from microparticles [24]. The choice of the dissolution medium and method can actually affect the *in vitro* drug release study results and, therefore, their correlation with the *in vivo* drug release study. The nature (hydrophobicity) of the excipient is considered to be the most important parameter influencing drug release. More hydrophobic materials are expected to reduce the drug release rate [22,24,41]. The choice of matrix materials influences the release process rate. Another way to change the matrix hydrophobicity is by adding a hydrophobic or hydrophilic excipient [20,22,41].

The drug's physicochemical characteristics (its water solubility) also play a part [23]. The release rate and the amount of drug released from SLMs increase with drug hydrophilicity. The preparation method of the SLMs can affect the drug's release rate by influencing the matrix wettability properties [24].

The particle size is also considered as a relevant parameter influencing drug release. Drug release from smaller particles is higher than release from larger ones because of the larger specific surface area of smaller microparticles [22,41].

A faster release is obtained with higher drug and/or adjuvant content (e.g., lactose) in SLMs because matrix diffusion is easier due to an increase in the number of pores created during the release process [22,30,35,41].

The drug release increases when the medium agitation rate in the dissolution apparatus increases [35].

Storage can induce polymorphic changes in SLMs and thereby modify the drug release rate [41].

Consequently, a suitable choice of SLM formulation (in terms of excipient nature, drug nature and drug loading) can bring about the intended *in vitro* release profiles (e.g., sustained release [24], enhanced release [36]).

If obtained SLMs are not rinsed after separation from the aqueous phase, the dissolution profile shows a rapid release from the external drug fraction towards the dissolution

medium, followed by a phase of decrease in the release rate [26,31,33].

At the end of the release study, some of the drug may remain enclosed in the particles [33], in particular if the drug is adsorbed into the lipid matrix material [31].

5. Administration routes, *in vivo* drug release and biocompatibility studies

Despite their high potential as promising drug carrier systems, SLMs have been rather unexploited. So far, only a few complete studies on SLMs have been published. Consequently, little data are currently available on SLM *in vivo* administration, drug release and biocompatibility.

Nevertheless, as assumed for SLNs [1], it could be anticipated that SLMs are well tolerated in living systems because they are made of physiological compounds. On the other hand, the toxicity of the surfactants has to be considered, although not more than other drug carrier systems. No problems should occur, provided an approved surfactant is chosen.

This section presents an overview of tested SLM administration routes and corresponding *in vivo* drug release and biocompatibility studies carried out so far.

5.1 Peroral administration

The peroral route is the most often cited SLM administration route in the literature [20–23,26,38,41]. It includes aqueous SLM dispersion, SLM tablets, pellets or capsules. However, data on *in vivo* drug release and biocompatibility studies are most often missing. Demirel [26] has nevertheless perorally administered SLM suspensions to rabbits; such suspensions were composed of Compritol® 888 ATO (Gattefosse) and Labrasol® (Gattefosse) as a lipidic matrix, Tween® 80 (ICI America) as a surfactant and piri-bedil as the active substance. The bioavailability of piri-bedil-SLMs was found to be higher than with pure piri-bedil.

Considering that SLM lipidic matrices are composed of physiological lipids and that most surfactants have already been used perorally, the authors cast no doubt on the biocompatibility SLMs after oral administration.

5.2 Parenteral administration

SLMs could also be parenterally administered apart from the intravenous route, owing to particle micronic size (in opposition to SLNs, which are often used for the intravenous administration). Some studies have been carried out on the *in vivo* drug release and biocompatibility of SLMs.

Reithmeier [10,31] has tested the biocompatibility of SLMs composed of a glyceryl tripalmitate (Dynasan® 116, Hüls AG) lipidic matrix and polyvinyl alcohol as a surfactant by implanting SLMs subcutaneously in mice. Polymeric microparticles composed of poly(D,L-lactide-co-glycolide), a well known approved polymer often used for parenteral applications, were also implanted and used as a reference. The study showed only a slight inflammation reaction in the implantation area, but

that was the case for both SLMs and polymeric microparticles. It has been concluded that studied SLMs showed comparable biocompatibility to polymeric microparticles that have been approved and used for parenteral administration.

Del Curto [24] has produced SLMs composed of glyceryl monobehenate (Compritro[®] E ATO, Gattefossé) and containing gonadotropin release hormone (antide) by co-melting process. After subcutaneous injection in rats, studied SLMs proved to give the incorporated active substance a sustained-release profile. Therefore, Antide-SLMs are potentially useful as a depot formulation when prolonged action is required.

5.3 Topical administration

SLM topical applications have been seldom used. However, Yener [37] has studied SLMs prepared with beeswax as matrix material, polysorbate 80 (Tween[®] 80) as a surfactant and containing a UV absorber (octyl methoxy cinnamate, OMC). Obtained SLMs were put into topical vehicles (oleaginous cream, carbopol gel and o/w emulsion). OMC release from SLMs and the OMC penetration rate and amount were tested through application on excised rat skin. Obtained results were those expected: a decrease in OMC release rate and amount (and therefore sustained action compared with free OMC action), and a decrease in the penetration rate and amount.

5.4 Pulmonary administration

SLMs can be considered as a promising drug carrier system for pulmonary administration even if they have been rather unexploited so far [65,66]. However, a preliminary *in vivo* tolerance study has been carried out with rats with SLMs composed of glyceryl behenate (Compritro 888 ATO) as a lipidic matrix and poloxamer 188 (Lutrol[®] F68, BASF) as a surfactant. SLM dispersions in phosphate buffer saline were administered intratracheally. Bronchoalveolar lavages were performed on the anaesthetised rats. Total and differential cell counts (i.e., inflammatory cells) were then done with the collected bronchoalveolar liquids. Results did not show significant differences between placebo groups and SLM-treated rats. It has been concluded that the studied SLMs seem to be well tolerated by the lower airways, but tolerance must still be assessed after repeated administrations [27].

6. *In vivo* fate

The *in vivo* fate of SLMs has not been studied thoroughly so far. However, in view of their similar composition, SLMs are expected to behave in the same way as SLNs *in vivo*. Consequently, the *in vivo* fate of SLMs should depend on administration routes and especially on enzymatic processes. Because SLM lipidic matrices are composed of physiological lipids, they should be exposed to metabolism *in vivo*. Lipases should then be the most involved enzymes in the degradation of SLMs. This kind of enzyme, which is present in various organs and tissues (notably in the gastrointestinal tract, at the subcutaneous or intramuscular injection sites), works by

splitting the ester linkage and thereby forming partial glycerides or glycerol and fatty acids. Olbrich notably proved that SLNs composed of glyceryltrimyristate glyceryltripalmitate, glyceryl tristearate and cetyl palmitate, are decomposed by enzymes such as lipases, and that such degradation is influenced by several parameters (i.e., surfactant composition and storage time) [10,69,70]. These conclusions could reasonably be extrapolated to SLMs, but should be confirmed by experimentation.

7. Expert opinion and conclusion

SLMs can reasonably be considered as a promising drug carrier system even if they have not been widely investigated. Actually, SLMs present several advantages: a physiological composition and thereby a supposed limited toxicity; a possibility of producing SLMs on a fairly large industrial scale; and the relative low cost of their raw materials and production processes. Some drawbacks must, however, be taken into account. For instance, the drug to be incorporated into SLMs must preferably be lipophilic enough in order to achieve a high entrapment efficiency. The latter is also affected by several other parameters such as the preparation method, the chemical and physical state of the drug and excipients, and the size of particles obtained. In practice it appears that one of the main difficulties in using SLMs is to optimise formulation parameters (excipients and drug nature, initial theoretical drug loading etc.) and production techniques in order to obtain SLMs that have simultaneously a high entrapment efficiency, a high drug loading, the intended size according to the desired administration route and presenting the desired drug release profile.

Most research articles present a complete characterisation of SLMs, including size and shape determinations, solid-state analysis and drug loading capacity studies, although such a characterisation requires several analytical methods and is generally slow and tedious.

The *in vitro* drug release studies that have been up to now carried out tend to prove the ability of SLMs to provide a controlled release of the incorporated substances. Nevertheless it must be taken into account that the dissolution medium and the dissolution method are both critical parameters, which must be suitably chosen in order to get a good correlation between the *in vitro* and *in vivo* drug release studies. The main difficulty in studying the rate of drug release from a carrier lies in mimicking as close as possible the expected *in vivo* conditions. Especially in the case of SLMs, the presence of enzymes such as lipases exerts an important influence on drug release, but this parameter is difficult to mimic in the *in vitro* dissolution tests. It is also interesting to notice that owing to the lipidic nature of SLMs the drug release studies require the use of surfactant in the dissolution medium in order to improve the microparticle's wettability. However, it is regrettable that the eventual influence of the addition of a surfactant on the *in vitro* drug release rates has up to now never been

studied. This is why the promising drug release results obtained by *in vitro* experimentation must be confirmed by *in vivo* studies.

Concerning their application fields and administration routes, SLMs have until now been most often studied for peroral administration. So far, only a few applications of subcutaneous, topical and pulmonary administrations have been considered and should thereby be further investigated.

To sum up, given their numerous advantages and interesting *in vitro* drug release results, SLMs can be considered as a

promising drug carrier system, which could be used by different administration routes (i.e., peroral, parenteral, topical and pulmonary routes). However, drug release results obtained by *in vitro* experimentation and suggesting an ability for SLMs to provide a controlled release to the incorporated substances must be confirmed by *in vivo* studies.

In the same way, the biocompatibility and *in vivo* fate of SLMs are in most research works disregarded, and should be considered and assessed even if the physiologically used materials tend to suggest that SLMs are biocompatible.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (**) to readers.

- MEHNERT W, MADER K: Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* (2001) 47:165-196.
- ZENG XM, MARTIN GP, MARRIOTT C: The controlled delivery of drugs to the lung. *Int. J. Pharm.* (1995):149-164.
- BARRATT GM: Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm. Sci. Technol Today* (2000) 3(5):163-171.
- SHARMA A, SHARMA US: Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int. J. Pharm.* (1997) 154(2):123-140.
- MANOSROI A, KONGKANERAMIT L, MANOSROI J: Stability and transdermal absorption of topical amphotericin B liposome formulations. *Int. J. Pharm.* (2004) 270(1-2):279-286.
- BRANNON-PEPPAS L: Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.* (1995) 116(1):1-9.
- RAVI KUMAR MNV: Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J. Pharm. Pharm. Sci.* (2000) 3(2):234-258.
- SOPPIMATH KS, AMINABHAVI TM, KULKARNI AR *et al.*: Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* (2001) 70(1-2):1-20.
- ALLEMAN E, GURNY R, DOELKER E: Drug-loaded nanoparticles – preparation methods and drug targeting issues. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1993) 39(5):173-191.
- REITHMEIER H, HERRMANN J, GOPFERICH A: Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin. *Int. J. Pharm.* (2001) 218:133-143.
- GUPTA PK, ADJEI AL: Modulated-release aerosol. In: *Inhalation delivery of therapeutic peptides and proteins. Lung biology in health and disease*. Gupta Pkadjei Al (Ed.), New York (2003):667-702.
- DEL VALLE EMM: Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* (2004) 39(9):1033-1046.
- DUCHENE D, WOUESSIDJEW E, PONCHEL G: Cyclodextrins and carrier systems. *J. Control. Release* (1999) 62(1-2):263-268.
- HU FQ, YUAN H, ZHANG HH *et al.*: Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int. J. Pharm.* (2002) 239:121-128.
- MULLER RH, MADER K, GOHLA S: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2000) 50:161-177.
- SCHWARZ C, MEHNERT W: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery; drug incorporation and physicochemical characterization. *J. Microencapsul.* (1999) 16(2):205-213.
- VENKATESWARLU V, MANJUNATH K: Preparation, characterization and *in vitro* release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *J. Control. Release* (2004) 95:627-638.
- ZUR MUHLEN A, SCHWARZ C, MEHNERT W: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1998) 45:149-155.
- HOU D, XIE C, HUANG K *et al.*: The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials* (2003) 24(10):1781-1785.
- SAVOLAINEN M, HERDER J, KHOO C *et al.*: Evaluation of polar lipid-hydrophilic polymer microparticles. *Int. J. Pharm.* (2003) 262(1-2):47-62.
- PASSERINI N, PERISSUTTI B, ALBERTINI B *et al.*: Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. *J. Control. Release* (2003) 88(2):263-275.
- AKIYAMA Y, YOSHIOKA M, HORIBE H *et al.*: Novel oral controlled-release microspheres using polyglycerol esters of fatty acids. *J. Control. Release* (1993) 26(1):1-10.
- RODRIGUEZ L, PASSERINI N, CAVALLARI C *et al.*: Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomizer for spray-congealing processes. *Int. J. Pharm.* (1999) 183(2):133-143.
- DEL CURTO MD, CHICCO D, D'ANTONIO M *et al.*: Lipid microparticles as sustained release system for a GnRH antagonist (Antide). *J. Control. Release* (2003) 89:297-310.
- FREDERIKSEN HK, KRISTENSEN HG, PEDERSEN M: Solid lipid microparticle formulations of the pyrethroid gamma-cyhalothrin – incompatibility of the lipid and the pyrethroid and biological properties of the formulations. *J. Control. Release* (2003) 86:243-252.
- DEMIREL M, YAZAN Y, MULLER RH *et al.*: Formulation and *in vitro-in vivo* evaluation of piribedil solid lipid micro- and nanoparticles. *J. Microencapsul.* (2001) 18(3):359-371.

Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterisation, drug release and applications

27. SANNA V, KIRSCHVINK N, GUSTIN P *et al.*: Preparation and *in vitro* toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration. *AAPS PharmSciTech* (2004) 5(2):Article 27.
28. ELDEM T, SPEISER P, HINCAL A: Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharm. Res.* (1991) 8(1):47-54.
29. BODMEIER R, WANG J, BHAGWATWAR H: Process and formulation variables in the preparation of wax microparticles by a melt dispersion technique. I. Oil-in-water technique for water-insoluble drugs. *J. Microencapsul.* (1992) 9(1):89-98.
30. BODMEIER R, WANG J, BHAGWATWAR H: Process and formulation variables in the preparation of wax microparticles by a melt dispersion technique. II. W/O/W multiple emulsion technique for water-soluble drugs. *J. Microencapsul.* (1992) 9(1):99-107.
31. REITHMEIER H, HERRMANN J, GOPFERICH A: Lipid microparticles as parenteral controlled release device for peptides. *J. Control. Release* (2001) 73:339-350.
- **Article of interest.**
32. ERNI C, SUARD C, FREITAS S *et al.*: Evaluation of cationic solid lipid microparticles as synthetic carriers for the targeted delivery of macromolecules to phagocytic antigen-presenting cells. *Biomaterials* (2004) 23:4667-4676.
33. REITHMEIER H, GOPFERICH A, HERRMANN J: Preparation and characterization of lipid microparticles containing insulin. *Proceedings of the 2nd World Meeting APGIAPV, Paris, France* (1998) 1079.
34. MASTERS DB, DOMB AJ: Liposphere local anesthetic timed-release for perineural site application. *Pharm. Res.* (1998) 15(7):1038-1045.
35. BENITA S, ZOUAI O, BENOIT JP: 5-Fluorouracil: carnauba wax microspheres for chemoembolization: An *in vitro* evaluation. *J. Pharm. Sci. US* (1986) 75(9):847-851.
36. PASSERINI N, PERISSUTI B, MONEGHINI M *et al.*: Characterization of carbamazepine-Gelucire 50/13 microparticles prepared by a spray-congealing process using ultrasounds. *J. Pharm. Sci-US* (2002) 91(3):699-707.
- **Article of interest.**
37. YENER G, INCEGUL T, YENER N: Importance of using solid lipid microspheres as carriers for UV filters on the example octyl methoxy cinnamate. *Int. J. Pharm.* (2003) 258:203-207.
38. GIANNOLA LI, DI STEFANO V, DE CARO V: White beeswax microspheres: a comparative *in vitro* evaluation of cumulative release of the anticancer agents fluorouracil and fluorafur. *Pharmazie* (1993) 48(2):123-126.
39. BRASSEUR S, AMIGHI K, MOES AJ: Evaluation of solid lipid microparticles for controlled delivery to the pulmonary tract. *Proceedings of the 9th Forum of Pharmaceutical Sciences, Spa, Belgium* (2000) 11.
40. MALAMATARIS S, PANAGOPOULOU A, HATZIPANTOU P: Controlled release from glycerol palmito-stearate matrices prepared by dry-heat granulation and compression at elevated temperature. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* (1991) 17:1765-1777.
41. SAVOLAINEN M, KHOO C, GLAD H *et al.*: Evaluation of controlled-release polar lipid microparticles. *Int. J. Pharm.* (2002) 244:151-161.
42. CORTESI R, ESPOSITO E, LUCA G *et al.*: Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials* (2002) 23(11):2283-2294.
43. MULLER RH, MEHNERT W, LUCKS JS *et al.*: Solid lipid nanoparticles (SLN) – an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (1995) 41(1):62-69.
44. SUGIURA S, NAKAJIMA M, TONG J *et al.*: Preparation of monodispersed solid lipid microspheres using a microchannel emulsification technique. *J. Colloid Interf. Sci.* (2000) 227:95-103.
45. KAWAKATSU T, TRAGARDH G, TRAGARDH C: Production of W/O/W emulsions and S/O/W pectin microcapsules by microchannel emulsification. *Colloid Surface A* (2001) 189:257-264.
46. KILLEEN MJ: Spray drying and spray congealing of pharmaceuticals. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. SWARBRICK J, BOYLAN JC (Ed.) (2000):207-221.
47. BEUSELINCK L, GOVERS G, POESEN J *et al.*: Grain-size analysis by laser diffractometry: comparison with the sieve-pipette method. *CATENA* (1998) 32(3-4):193-208.
48. WASHINGTON C: *Particle Size Analysis in Pharmaceuticals and Other Industries: Theory and Practice*. (1992) ELLIS HORWOOD.
49. WYNN EFW, HOUNSLOW MJ: Coincidence correction for electrical-zone (Coulter-counter) particle size analysers. *Powder Technology* (1997) 93(2):163-175.
50. MARTIN A: Micromeritics. In: *Physical Pharmacy*. Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore (2004):423-452.
51. *US Pharmacopeia National Formulary* (1995):1822-1823.
52. GOFFIN MEYVIS ANALYTICAL & MEDICAL SYSTEMS: *Workshop on Image Analysers from Malvern Instruments* (2004).
53. HICKEY AJ: Methods of aerosol particle size characterization. In: *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology, Drug and the pharmaceutical sciences*. HICKEY AJ (Ed.), Marcel Dekker, New York (2004):345-385.
54. *US Pharmacopeia National Formulary* (1995):1760-1767.
55. CARLI F, GARBASSI F: Characterization of drug loading in crospovidone by X-ray photoelectron spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* (1985) 74(9):963-967.
56. VOINOVICH D, MONEGHINI M, PERISSUTTI B *et al.*: Preparation in high-shear mixer of sustained-release pellets by melt pelletisation. *Int. J. Pharm.* (2000) 203(1-2):235-244.
57. WESTESEN K, BUNJES H, KOCH MHJ: Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release. *J. Control. Release* (1997) 48:223-236.
58. WESTESEN K, SIEKMANN B, KOCH MHJ: Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction. *Int. J. Pharm.* (1993) 93(1-3):189-199.
59. ELDEM T, SPEISER P, ALTORFER H: Polymorphic behavior of sprayed lipid micropellets and its evaluation by differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy. *Pharm. Res.* (1991) 8(2):178-184.
60. MARTIN A: Micromeritics. In: *Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*. Lea and Febiger, London (1993):423-449.
61. MARTIN A: Micromeritics. In: *Physical Pharmacy*. Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore (2004):30-36.
62. VITEZ IM, NEWMAN AW, DAVIDOVICH M *et al.*: The evolution of

- hot-stage microscopy to aid solid-state characterizations of pharmaceutical solids. *Thermochimica Acta* (1998) 324(1-2): 187-196.
63. KANEKO F, TASHIRO K, KOBAYASHI M: Polymorphic transformations during crystallization processes of fatty acids studied with FT-IR spectroscopy. *J. Cryst. Growth* (1999) 198-199(Part 2): 1352-1359.
 64. YAZAN Y, DEMIREL M, BUYUKKORUGLU B *et al.*: Solid lipid microparticle versus inclusion complex of piritidil. *Proceedings of the European Conference on Drug Delivery and Pharmaceutical Technology*, 10-12 May, 2004, Seville, Spain (2004).
 65. JASPART S, BODSON C, BERTHOLET P *et al.*: Solid lipid microparticles for administration by inhalation: optimisation of manufacturing parameters. *Proceedings of the European Conference on Drug Delivery and Pharmaceutical Technology*, 10-12 May, Seville, Spain (2004).
 66. JASPART S, KIRSCHVINK N, CHIAP P *et al.*: Solid lipid microparticles for administration by inhalation: optimisation of manufacturing parameters and preliminary tolerance study. *Proceedings 12th Forum of Pharmaceutical Sciences*, 6-7 May, Blankenberge, Belgium (2004).
 67. BLANCO-PRIETO MJ, BESSEGHIR K, ORSOLINI P *et al.*: Importance of the test medium for the release kinetics of a somatostatin analogue from poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Int. J. Pharm.* (1999) 184(2):243-250.
 68. WOO BH, KOSTANSKI JW, GEBREKIDAN S *et al.*: Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of 120-day poly(lactide) leuprolide microspheres. *J. Control. Release* (2001) 75(3):307-315.
 69. OLBRICH C, MULLER RH: Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures. *Int. J. Pharm.* (1999) 180(1):31-39.
 70. OLBRICH C, KAYSER O, MULLER RH: Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN)-effect of surfactants, storage time and crystallinity. *Int. J. Pharm.* (2002) 237(1-2):119-128.

Websites

101. OCCHIO: Imaging solutions in powder analysis: Alpa and Callisto. <http://www.occhio.be/>(2004)

Affiliation

Dr Séverine Jaspert¹, Dr Géraldine Piel,
 Dr Luc Delattre & Dr Brigitte Evraud
¹Author for correspondence
 University of Liège, Laboratory of Pharmaceutical
 Technology, Tour 4, étage 2,
 Avenue de l'hôpital 1, 4000 Liège, Belgium
 Tel: +32 4 3664306; Fax: +32 4 3664302;
 E-mail: sjaspert@ulg.ac.be

Research paper

Solid lipid microparticles as a sustained release system for pulmonary drug delivery

Séverine Jaspert^{a,*}, Pascal Bertholet^a, Géraldine Piel^a, Jean-Michel Dogné^b,
Luc Delattre^a, Brigitte Evrard^a

^a Laboratory of Pharmaceutical Technology, Department of Pharmacy, University of Liège, Belgium

^b Natural and Synthetic Drugs Research Centre, Department of Pharmacy, University of Liège, Belgium

Received 19 April 2006; accepted in revised form 12 July 2006

Available online 20 July 2006

Abstract

The controlled release of drugs for pulmonary delivery is a research field which has been so far rather unexploited but is currently becoming increasingly attractive. The introduction part of this research article first details the potential advantages of solid lipid microparticles (SLMs) as drug carrier compared to liposomes and polymeric microspheres. The aim of this work is to use SLMs to impart a sustained release profile to a model drug, salbutamol acetate (SA). SA was synthesized from salbutamol in order to increase the lipophilicity of this molecule and thereby to increase its incorporation efficiency into SLMs. SA-loaded SLMs were then produced by a hot emulsion technique followed by high-shear homogenisation and the manufacturing parameters were optimized using the experimental design methodology in order to reach a suitable particle size for pulmonary administration. Scanning electron micrographs showed that SLMs are spherical, have a smooth surface and that SA crystallises outside of the particles when the drug loading is higher than 20%. This was confirmed by X-ray diffraction. SA in vitro release study from SLMs showed that the release rate increased with SA loading but remained in every case lower than the dissolution rate of pure SA.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Solid lipid microparticles; Pulmonary drug delivery; Sustained release; Salbutamol acetate; Experimental design

1. Introduction

The pulmonary tract tends to be considered as a very promising and attractive route for the administration of active substances intended to treat local pulmonary (e.g., asthma, COBP, and microbial infections) as well as systemic diseases (e.g., diabetes). The pulmonary drug delivery presents many advantages compared to other administration routes. If a local effect is intended, the drug is concentrated at the action site, the amount of drug administered to patients is lower compared to the dose used with traditional administration routes (10–20% of the amount

administered by the oral route), systemic undesirable effects decrease and the first pass hepatic and renal effects are avoided. When a systemic effect is aimed, the interest of pulmonary administration is based on the large lung surface area available (140 m² for the human adult lung), which is, thanks to its thin absorption mucosal membrane (0.1–0.2 μm), in intimate contact with the circulatory system [1–4].

Currently there is an increasing amount of drugs for pulmonary administration on the market. However, up to now, sustained release formulations for pulmonary delivery have not been marketed yet in spite of the increasing interest in this research field. Only long acting β₂-mimetics and corticosteroids have been developed by pharmaceutical modulation. But it is worth controlling the drug release rate and thereby achieving a sustained release dosage form by employing suitable carriers possessing appropriate drug release characteristics [5].

* Corresponding author. Laboratory of Pharmaceutical Technology, Department of Pharmacy, University of Liège, B36, Tour 4, étage 2, Avenue de l'hôpital, 1, 4000 Liège, Belgium. Tel.: +32 4 366 43 06; fax: +32 4 366 43 02.

E-mail address: sjaspert@ulg.ac.be (S. Jaspert).

In this purpose the liposomes have been the most extensively investigated carriers [6–8,3,9]. They can be prepared with lung endogenous phospholipids as surfactants, with a wide range of size and are able to incorporate both hydrophilic and lipophilic drugs [10]. Liposomes proved to be able to impart a sustained release profile to the incorporated substances [6] but they also present some disadvantages, i.e., a high production cost, a relative instability during storage [11] and nebulisation [12] that can lead to their disruption and to the premature loss of entrapped substances. Therefore liposomal dry powder formulations are currently getting more attractive [6,13,14].

Polymeric microspheres have also been successfully tested *in vitro* [15,16] as well as *in vivo* as sustained release drug delivery system [6,17–19]. They are more physicochemically stable than liposomes, both *in vitro* and *in vivo*, allowing thus a slower release of encapsulated drugs [1,10]. Their main disadvantage is that their safety still remains uncertain. Armstrong et al. [20] showed that pulmonary administration of PLA microspheres to rabbits led to histological damages assessed in terms of pulmonary haemorrhage, eosinophilia and neutrophil infiltration. Inflammation can, however, be avoided using large porous particles [21].

In this paper we decided to focus on solid lipid microparticles (SLMs), a carrier that has not been extensively studied up to now, especially for pulmonary administration.

However, this kind of drug carrier presents many advantages. SLMs can be considered as physicochemically stable, allowing a large-scale production at a relative low production cost [22,23] and, seeing their composition, physiologically compatible [24]. Sanna et al. [25] evaluated *in vivo* SLMs acute toxicity after intratracheal administration in rats. No significant inflammatory airway response was observed at the studied concentrations.

The aim of this study was to produce SLMs containing a bronchodilator agent and providing a sustained release of this active substance and thus a long acting protection against asthma attacks. SLMs carriers allow high entrapment yield for hydrophobic drugs [22]. Indeed, as asserted by Courrier et al. [1] for SLNs (solid lipid nanoparticles), the factors determining the loading capacity of a drug in lipidic excipients are, i.e., the solubility of the drug in melted lipid and the miscibility of melted drug and melted lipid. It must, however, be noticed that Cook et al. [13] recently showed that it was possible to incorporate hydrophilic molecules in SLMs by using a two-step manufacturing process consisting of entrapping hydrophilic nanoparticles in an hydrophobic matrix microsphere.

At the beginning of our research work, we first chose to work with salbutamol, a well known β_2 -mimetic. But given that this molecule was relatively too hydrophilic to be efficiently incorporated into SLMs with usual production methods, we decided to synthesize a more hydrophobic derivative of salbutamol, i.e., salbutamol acetone (SA). The pharmacological effects of this molecule are currently still under investigation but we chose to use it as model

molecule to show the efficiency of SLMs as sustained release drug delivery system.

Since the produced SLMs are intended to be loaded with SA, a molecule that is currently studied for its potential β_2 -mimetic activity, SLMs must reach the smooth muscle β_2 -receptors of the smallest airways. It is generally considered that an optimal deep lung delivery is obtained with particles having an aerodynamic diameter between 0.5 and 5 μm . One of the main difficulties of this work was then to produce SLMs with a suitable particle size for pulmonary administration. Therefore we chose to use the methodology of experimental design in order to optimize the different manufacturing parameters. The produced SLMs are finally intended to be administered by inhalation as a dry powder.

So the aims of this paper are to produce SLMs, to optimize their size, to characterize the obtained SLMs, and especially to assess the *in vitro* efficiency of SLMs as sustained release delivery system.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Glyceryl behenate (Compritol[®] 888 ATO) was received as free sample from Gattefossé (France). This excipient is a mixture of 13–21% mono-, 40–60% di- and 21–35% of tri-esters of glycerol and behenic acid (C₂₂) while other fatty acids than behenic acid account for less than 20%. Poloxamer 188, a block copolymer of ethylene oxide and propylene oxide (Lutrol[®] F68) was purchased from BASF (Germany). Acetonitrile of HPLC grade was from Merck. Salbutamol acetone was synthesized by the the Natural and Synthetic Drugs Research Centre of the University of Liège. Salbutamol base used as reagent in the synthesis was obtained from Cambrex Profarmaco (Italy). All other solvents used in the synthesis and all other chemicals were of analytical grade.

2.2. Development of a high-performance liquid chromatography (HPLC) assay of SA

The used HPLC system consists of an L-7100 Merck-Hitachi pressure pump, an L-7200 Merck-Hitachi autosampler, an L-7350 Merck-Hitachi column oven, an L-7400 Merck-Hitachi UV/visible detector and a D-7000 Merck-Hitachi interface. The system is controlled by a computer running the "HPLC System Manager v 4.0" acquisition software developed by Merck-Hitachi. The assay method was inspired and adapted from the salbutamol HPLC assay described in the fifth edition of the European Pharmacopoeia [26].

Twenty microliter samples are injected on a Lichroart column (125 × 4 mm i.d.) prepared with a Lichrospher RP-Select B 5 μm phase (Merck[®]). The temperature is maintained at 30 °C. The mobile phase is composed of a 65/35 (v/v) mixture of a 0.018 M potassium dihydrogen-

phosphate buffer (pH 3.65) and acetonitrile. The flow rate is adjusted to 1.0 ml/min. All samples are assayed in duplicate at 220 nm with 6 min run time. This method was successfully validated and showed good linearity, reproducibility and accuracy from 0.5 to 20 µg/ml.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were both determined and found to be equal to 0.039 and 0.13 µg/ml, respectively.

2.3. Salbutamol acetonide synthesis

The synthesis of salbutamol acetonide was performed in the Natural and Synthetic Drugs Research Centre of the University of Liège as described by Cairra et al. [27]. The structure of SA is represented in Fig. 1.

2.4. Evaluation of SA lipophilicity

SA has been synthesized from salbutamol in order to get a more lipophilic molecule, which could be more efficiently incorporated into SLMs. So, first of all, computed logP values were determined using the software CS Chem draw[®] Pro version 4.5. The obtained logP values were 0.061 ± 0.5 and 1.82 ± 0.5 for salbutamol and SA, respectively. Those theoretical values seem to confirm that SA is more lipophilic than salbutamol. But in this research work it appeared to be more important to evaluate experimentally and to compare the partition coefficients of both salbutamol and SA between the lipidic excipient used for SLMs manufacturing, i.e., glyceryl behenate, and the aqueous phase. So 40 mg of SA or salbutamol was added to tubes containing 4 g glyceryl behenate and 4 g purified water. The tubes were kept for 30 min under stirring at 80 °C to ensure melting of glyceryl behenate and thus to mimic the operating process

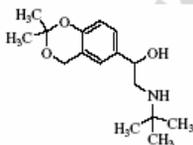


Fig. 1. Chemical structure of salbutamol acetonide.

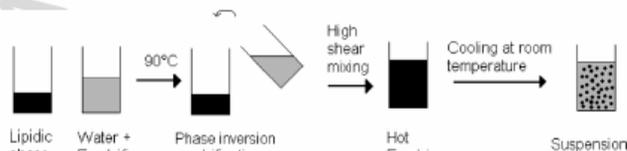


Fig. 2. Schematic representation of the manufacturing method of SLMs suspensions by hot emulsion technique followed by high-shear homogenization and cooling.

of SLMs fabrication (see Section 2.3). After cooling at room temperature, centrifugation was performed and SA or salbutamol was assayed in the aqueous phase by the HPLC method. Each test was realized in triplicate.

2.5. Preparation of SA-loaded solid lipid microparticles

SLMs loaded with SA were prepared by a hot emulsion technique followed by a high-shear homogenization using Ultra-Turrax[®] T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Germany). Glyceryl behenate and SA were brought together to 90 °C to allow the melting of glyceryl behenate and the dissolution of SA in the melted lipidic excipient. Poloxamer 188 and water were heated together at the same temperature. The hot aqueous phase is poured into the melted lipid under high-shear mixing using Ultra-Turrax[®] T25, but in view of Poloxamer 188 HLB value (which is equal to 29) and of the relative concentrations of lipidic and aqueous phases (see Section 2.6), an O/W emulsion is finally obtained by a phase-inversion process. It is preferable to pour the hot aqueous phase in the melted lipid rather than the contrary to avoid loss of lipidic excipient during the manufacturing. This process is illustrated in Fig. 2. The SLMs suspensions obtained after cooling at room temperature were then lyophilized using a Heto[®] drywinner freeze-dryer FDS-DW8 (Heto Holten, Denmark) in order to get water-free SLMs.

2.6. Optimization of SLMs size by experimental design

SLMs optimal size was studied with the help of the methodology of experimental design using the software MODDE[®] 6.0. First of all the critical manufacturing parameters and their lower and upper limits were determined. Two independent experimental designs were carried out, the first one using 2.5% of dispersed phase (SA + glyceryl behenate) and the second one using 5% of dispersed phase. The influence of SA concentration, of the surfactant concentration and of the mixing duration on SLMs size was studied within each experimental design. So the influence of SA concentration was tested from 5% to 25% (expressed as the weight percentage of the dispersed phase). The upper limit (25%) corresponds to the maximal concentration of SA that can be dissolved in melted glyceryl behenate. The influence of surfactant (Poloxamer 188)

Table 1
Limits of variation of the critical manufacturing parameters in both experimental designs containing either 2.5% or 5% of dispersed phase

Dispersed phase (%) ^a	Poloxamer 188 conc. (%) ^a		Mixing duration (min)		SA conc. (%) ^b	
	Lower limit	Upper limit	Lower limit	Upper limit	Lower limit	Upper limit
2.5	0.1	1	1	10	5	25
5	0.1	1	1	10	5	25

^a Percentage of the total suspension weight (w/w).

^b Percentage of the dispersed phase (w/w).

concentration was studied between 0.1% and 1% (expressed as the weight percentage of SLMs suspension). The 0.1% value corresponds to the minimal poloxamer 188 concentration which is necessary to obtain a stable emulsion and 1% corresponds to the value above which much foam appears. The influence of mixing duration was studied between 1 and 10 min. The studied parameters and their limits of variation are summarized in Table 1. The mixing speed was studied in the screening step. Thus for a surfactant concentration of 0.5%, a SA concentration of 10% and a mixing time of 5 min, mixing speeds of 8000–13,500 and 24,000 rpm were tested. The best results in terms of SLMs size were obtained with the lowest speed. This value (8000 rpm) has been chosen as a fixed parameter for the experimental designs.

A central composite face-centered (CCF) design, which is a cubic response surface methodology design, was used to optimize manufacturing parameters. The factor end-points define the vertices of the cube and the axial points are in the middle of all the cube faces.

2.7. SLMs characterization

2.7.1. Laser diffractometry

SLMs geometrical diameter was determined using the laser diffractometry principle of Mastersizer[®] 2000-Scirocco[®] 2000 (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom) which applies the Mie scattering measurement principle. 1.347 as real and 0.01 as imaginary refractive index were assumed for our particles. The geometrical diameter was expressed in terms of volume median diameter (D(v,0.5)). The percentage of particles (in terms of volume) whose diameter lies in a specific range of size was also determined.

2.7.2. Determination of SLMs true density and evaluation of SLMs aerodynamic diameter

For particles intended to be administered by inhalation, the geometric diameter is not enough to predict the deposition site. The aerodynamic diameter is actually the most important parameter influencing the particles deposition. This parameter is defined as the diameter of a unit-density sphere which has the same settling velocity in air as the particle. This notion takes particle shape, density and physical size into account, all of these parameters influencing the particle aerodynamic diameter. The theoretical aerodynamic diameter of parti-

cles can be calculated based on the following equation [28]:

$$d_{\text{aer}} = \sqrt{\frac{\rho}{\rho_1}} d,$$

where d is the mass-mean geometric diameter, ρ is the particle mass density and $\rho_1 = 1 \text{ g/cm}^3$.

The density ρ was evaluated in triplicate by weighing a known amount (m) of SLMs powder in a graduated cylinder, by melting them at 80 °C and by reading the final volume (V) after cooling at room temperature. The density ρ was assumed to be equal to: $m \text{ (g)}/V \text{ (ml)}$.

2.7.3. Scanning electron microscopy

Morphology and surface of dried SLMs were observed by scanning electron microscopy (SEM) (Jeol JSM-840A). The samples were coated with platinum under an argon atmosphere and were examined under an accelerating voltage of 20 kV.

2.7.4. Differential scanning calorimetry

DSC measurements were carried out in order to determine the melting points of glyceryl behenate and of SA, but also to study the solid state of SA in SLMs loaded with increasing percentages of SA. Thermograms of 10 mg samples were recorded with a Mettler-Toledo[®] DSC25-TD15 TA Controller system, between 35 and 190 °C at a speed of 10 °C/min under a 20 ml/min nitrogen flux. DSC system was controlled by the software STAR System v 6.1 SW.

2.7.5. X-ray diffraction

X-ray diffraction measurements were performed in order to clearly elucidate the solid state of SA in SLMs, using a X-ray diffractometer Siemens[®] DX500 (Cu K α source) working at a constant temperature of 25 °C.

2.8. Determination of the drug loading of SLMs powders

It appeared that it was really difficult to wash the obtained freeze-dried SLMs on a filter without either clogging the filter with the smallest particles or allowing the biggest ones to pass through the filter. None of the manifold tested filters allows SLMs filtration. So it has been decided to use the whole SLMs powder for further experiments. This powder contains mainly SA-loaded SLMs but also some possible SA crystals. In this case the drug load-

ing parameter just takes account of the possible loss of SA on the surface of the vessel during the cooling phase of the suspension manufacturing process.

A liquid-liquid extraction technique was developed and validated. A known amount of SLMs powder was weighed and dissolved in chloroform. Two consecutive extractions were carried out on the organic phase with a pH 1 hydrochloric acid diluted solution. At this pH SA is totally converted into salbutamol. In view of its relative hydrophilicity salbutamol went into the aqueous phase. Salbutamol was then assayed by the HPLC method described in the fifth edition of the European Pharmacopoeia [26]. The assayed salbutamol concentration was finally expressed in terms of SA concentration. The real drug loading in the powder was then calculated and compared to the theoretical drug loading. The entrapment efficiency (EE) of SA in SLMs powder was also determined [23] using the following equation:

$$EE(\%) = (\text{Real drug loading} / \text{Theoretical drug loading}) \times 100.$$

2.9. Determination of SA *in vitro* release from SLMs

The *in vitro* drug release was studied using the rotating basket method described in the 4th edition of the European Pharmacopoeia [26] (Sotax AT7 dissolution apparatus coupled with an autosampler Sotax C615). The drug release study was carried out at 150 rpm in PBS, pH 7.4, at 37 °C. Seven replicates of each test were performed. Powder samples were wrapped up in Whatman® glass fiber filters of GF/F grade, the whole being closed with cyanoacrylate glue to prevent SLMs escaping to the medium while allowing them to immerse. A relative high speed of rotation has been chosen in order to access discriminatory. We have demonstrated that the hydrodynamic conditions of the test play an important role in the dissolution rate of SA. Indeed, by increasing the rotating speed, SA dissolves faster. Thereby the release rate of SA from SLMs becomes less dependent on SA intrinsic dissolution. The aim of this study was not to mimic the pulmonary conditions but rather to compare SA release from SLMs with different drug loadings.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of SA lipophilicity

The experimental partition coefficients between melted glyceryl behenate and water were found to be 46.88 ± 0.87 and 4.40 ± 0.15 for SA and salbutamol, respectively. These results confirm that SA is more hydrophobic than salbutamol and that its affinity for melted glyceryl behenate is about ten times higher than salbutamol. Given that the incorporation efficiency into SLMs increases with drug solubility in lipidic excipients, it can be assessed

that SA incorporation into SLMs will certainly be higher than with salbutamol.

3.2. Optimization of SLMs size by experimental design

SLMs suspensions were realized following the experimental plan determined by the software. Dried SLMs obtained by freeze drying were measured by laser diffractometry. SLMs size was expressed in terms of percentage of particles (in volume) whose geometric diameter lies between 0.5 and 6 µm. This range of size has been chosen because it corresponds to the suitable size for pulmonary delivery taking the density and its influence on aerodynamic diameter into account. Indeed as explained previously, the optimal aerodynamic diameter for deep lung delivery is in the range of size 0.5–5 µm. Given that SLMs true density is lower than 1 (see Section 3.3.1) the corresponding geometric diameter limits have been defined at 0.5–6 µm.

The best results were obtained with the second experimental design which uses 5% of dispersed phase. Indeed the maximal percentages of particles having a median diameter between 0.5 and 6 µm are around 39.8% for the first experimental design and around 45% for the second one. Moreover the R^2 which expresses the percentage of variability that can be explained by the model is equal to 0.60 for the first experimental design using 2.5% of dispersed phase and is higher (0.94) for the second one using 5% of dispersed phase. The analysis of main effects has shown that SA concentration has no significant effect on the response in the studied limits and that poloxamer 188 concentration and mixing time exert a significant influence on the response. A quadratic effect of mixing time and an interaction between mixing time and poloxamer 188 concentration were also observed.

The optimal production parameters were thus calculated by the software and are summarized in Table 2. Since SA concentration does not influence the response and since drug loading is likely to influence drug release profiles it was decided to choose SLMs containing 5%, 10%, 15% and 20% SA for further studies. SLMs suspensions were produced in triplicate for each theoretical optimal manufacturing condition determined by the software. The obtained results were compared with the theoretical ones

Table 2
SLMs optimal manufacturing parameters determined by analysis of experimental designs and corresponding theoretical responses

Dispersed phase (%) ^a	Poloxamer 188 (%) ^a	Mixing duration (min)	SA (%) ^b	SLMs in range of size of size 0.5–6 µm (%)
5	0.1	10	11.5	45.31
5	0.1	10	5.5	45.00
5	0.1	10	20.2	44.73
5	0.1	10	16.5	44.53

^a Expressed as the weight percentage of the total suspension (w/w).

^b Expressed as the weight percentage of the dispersed phase (w/w).

Table 3
Comparison between theoretical and experimental percentages of SLMs whose geometric diameter lies between 0.5 and 6 μm

Dispersed phase (%) ^a	Poloxamer 188 (%) ^a	Mixing duration (min)	SA (%) ^b	SLMs in range of size 0.5–6 μm (%) \pm SD (n = 3)	Theoretical responses calculated by the software (%)
5	0.1	10	5	44.52 \pm 0.61	44.90
5	0.1	10	10	43.21 \pm 1.42	45.30
5	0.1	10	15	44.47 \pm 1.61	45.25
5	0.1	10	20	43.59 \pm 0.87	44.76

^a Expressed as the weight percentage of the total suspension (w/w).

^b Expressed as the weight percentage of the dispersed phase (w/w).

and are presented in Table 3. These results showed that the experimental responses are well correlated with the theoretical ones.

3.3. SLMs characterization

3.3.1. SLMs true density and evaluation of aerodynamic diameter

Experimental value of true density is 0.752 ± 0.013 ($n = 3$). As explained in the introduction part, the optimal aerodynamic diameter range of size is considered to be approximately 0.5–5 μm . So, by applying the equation quoted in Section 2.7.2 which takes account of the true density to determine the relation between geometric and

aerodynamic diameters, we decided to consider the range of size 0.5–6 μm as acceptable geometric diameter for pulmonary administration.

3.3.2. Scanning electron microscopy

Fig. 3 shows SEM images of SA crystals, of drug-free SLMs, and of SLMs containing 1% and 25% SA. The crystals of SA are needle-shaped. Scanning electron micrographs of SLMs revealed a spherical shape and a smooth surface. Needle-shaped crystals identified as SA crystals have been observed on the pictures of SLMs containing 25% SA but not on those containing 1% SA. The crystallisation of SA outside of the particles increases with the drug loading.

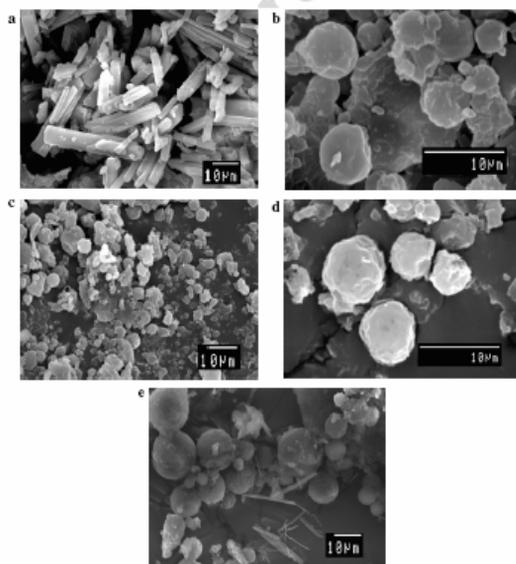


Fig. 3. Scanning electron micrographs of (a) Salbutamol Acetonide; (b) drug-free SLMs; (c) SLMs 1% SA: overall view (d) SLMs 1% SA: higher magnification; (e) SLMs 25% SA.

3.3.3. Differential scanning calorimetry

DSC profiles of glyceryl behenate, pure SA, drug-free SLMs and SLMs loaded with 1% and 20% SA, respectively, are represented in Fig. 4. Thermograms of glyceryl behenate showed a fusion peak at 74 °C while DSC trace of pure SA showed a single fusion peak at 97 °C. Thermograms of SLMs with 1% and 20% SA did not show any peak around 97 °C which could lead to the conclusion that SA does not exist at the crystalline state in SLMs. In order to confirm this hypothesis we compared thermograms of SLMs containing 1% and 20% SA with those of physical mixtures of glyceryl behenate and SA at different relative concentrations (see Fig. 5). DSC profiles of physical mixtures containing 70% glyceryl behenate and 30% SA showed no peak corresponding to SA melting point, but when the relative concentration of SA increased to 50% and 70%, a peak corresponding to SA melting appeared.

This can be explained by the fact that SA can dissolve during the heating phase in melted glyceryl behenate because the latter melts at a lower temperature than SA. SA fusion peak appeared in physical mixtures when SA reached the saturation concentration in melted glyceryl behenate. This phenomenon was previously described by Passerini et al. [29,30]. Vippagunta et al. [31] also showed that DSC analysis was unsuitable to give information about the solid state of a drug when it is soluble in the excipients. This observation allowed us to determine the maximum solubility of SA in melted glyceryl behenate by integration of SA fusion peaks appearing in the thermograms of the physical mixtures containing 50% and 70% SA. The maximum solubility of SA in hot glyceryl behenate at the operating conditions proved to be equal to 0.309 ± 0.023 mg SA/mg glyceryl behenate ($n = 6$). The same experiment was carried out with salbutamol in order to determine its solubility in

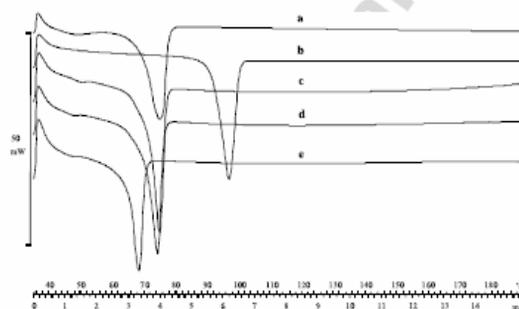


Fig. 4. DSC thermograms of (a) glyceryl behenate, (b) salbutamol acetone, (c) drug-free SLMs and SLMs loaded with (d) 1% and (e) 20% SA.

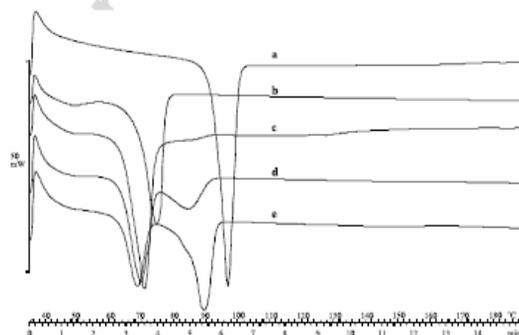


Fig. 5. DSC thermograms of (a) salbutamol acetone, (b) glyceryl behenate and of physical mixtures containing (c) glyceryl behenate/SA (70/30), (d) glyceryl behenate/SA (50/50) and (e) glyceryl behenate/SA (30/70).

melted glyceryl behenate and to show that this latter is lower than SA solubility. The obtained thermograms are represented in Fig. 6. The maximum solubility of salbutamol in melted glyceryl behenate was found to be equal to 0.104 ± 0.003 mg salbutamol in glyceryl behenate ($n = 6$). Indeed the thermograms of the physical mixtures glyceryl behenate/salbutamol represented in Fig. 6 show that the melting peak of salbutamol disappears when its relative concentration is close to 10%.

However, DSC did not allow us to conclude about SA solid state in SLMs containing 1% and 20% SA, seeing that, at these concentrations, SA dissolves in glyceryl behenate when this latter melts. Therefore another investigation technique (X-ray diffraction) was used to elucidate SA solid state in SLMs.

It was also observed that a decrease of the glyceryl behenate melting point occurs on the DSC curves of all the tested physical mixtures of glyceryl behenate and SA (30/70; 50/50 and 70/30) and of SLMs containing 20% SA. This phenomenon was not observed with physical mixtures containing salbutamol even at high concentrations. Venkateswarlu and Manjunath [32] also observed the same characteristics with SLNs and assumed them to be influenced by the presence of surfactant [33]. In fact, owing to its chemical structure, SA molecule possesses an amphiphilic character with a hydrophilic part and another part which is more hydrophobic and proved, at the opposite of salbutamol, to act as a surfactant at high concentrations. This hypothesis could explain the depression of the glyceryl behenate fusion peak in presence of relatively high SA concentrations.

3.3.4. X-ray diffraction

The X-ray diffraction patterns of poloxamer 188, glyceryl behenate, salbutamol acetonide, drug-free SLMs, SLMs

5% SA, physical mixture SA/drug-free SLMs 5/95, SLMs 20% SA, and physical mixture SA/drug-free SLMs 20/80 are represented in Fig. 7. The patterns of SLMs with 5% and 20% SA were compared with those of physical mixtures containing the same proportions of SA. The characteristic peak of SA located at $18.4^\circ 2\theta$ increases with increasing concentration of SA in physical mixtures. This peak was also observed with SLMs containing 20% SA but not with SLMs containing 5% SA. This confirms that SA is at least partially at the crystalline state in SLMs containing 20% SA, but appears to be mainly amorphous in SLMs containing 5% SA.

3.3.5. Drug loading determination

Drug loading values of SLMs powders containing theoretically 5%, 10%, 15% or 20% SA and obtained according to the production conditions determined by the experimental design were found to be $4.36\% \pm 0.02$, $8.83\% \pm 0.46$, $13.06\% \pm 0.26$ and $18.03\% \pm 0.60$, respectively ($n = 3$). The SA encapsulation efficiencies (EE) in SLMs powders were $87.30\% \pm 0.44$, $88.27\% \pm 4.65$, $87.08\% \pm 1.74$ and $89.26\% \pm 3.03$ ($n = 3$) for SLMs containing 5–10–15 and 20% SA, respectively.

3.3.6. Drug release in vitro study

The dissolution rate of pure salbutamol acetonide was compared to the release rate of salbutamol acetonide from SLMs containing either 5%, 10%, 15% or 20% SA. The release of SA from physical mixtures of drug-free SLMs and SA at two different relative concentrations (5/95 and 20/80) was also studied. The aim was to compare the release profiles of SA when this drug is incorporated into SLMs and when it is only physically mixed with SLMs. The obtained drug release profiles are depicted in Fig. 8. This figure shows that dissolution of pure SA is complete after 2 hours and that the

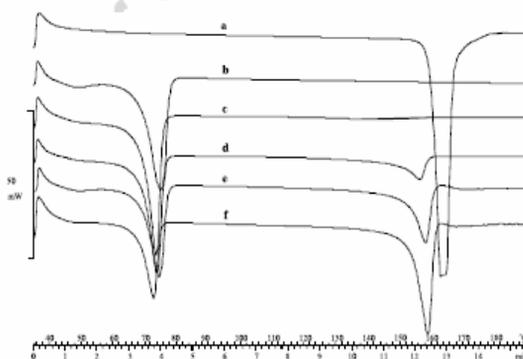


Fig. 6. DSC thermograms of (a) salbutamol, (b) glyceryl behenate and (c) physical mixtures containing (c) glyceryl behenate/salbutamol (90/10), (d) glyceryl behenate/salbutamol (80/20), (e) glyceryl behenate/salbutamol (70/30), (f) glyceryl behenate/salbutamol (50/50).

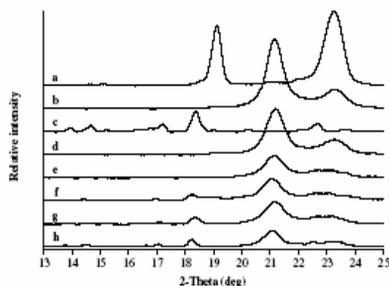


Fig. 7. X-ray diffraction patterns of (a) poloxamer 188, (b) glyceryl behenate, (c) salbutamol acetone, (d) drug-free SLMs, (e) SLMs 5% SA, (f) physical mixture SA/drug-free SLMs 5/95, (g) SLMs 20% SA and (h) physical mixture SA/drug-free SLMs 20/80.

release rate is the slowest for SLMs containing 5% SA. The drug release rate increases with drug loading but is in every case lower than the dissolution rate of pure SA. It was also observed that SA release rates from physical mixtures are higher than the release rates of the corresponding SA-loaded SLMs. The obtained curves were linearized in order to determine for each tested sample the times corresponding to 25%, 50% and 75% of SA release, i.e., $t(25)$, $t(50)$ and $t(75)$. We succeeded in fitting the curves by converting the variable time t in $\ln(t)$ (min) for the curve of SA dissolution and by converting for the other curves, respectively, the variable time t in $\ln(t)$ (min) and SA release in $\text{Logit}(M(t))$, i.e., $\ln\left(\frac{M(t)}{1-M(t)}\right)$ where $M(t)$ represents the SA fraction released at time t considering that M_{∞} is equal to 1. The linearized profiles are presented in Fig. 9 and the calculated $t(25)$, $t(50)$ and $t(75)$ values are summarized in Table 4.

These results tend to prove that a sustained release of SA can be obtained by incorporation of SA into SLMs but that physical mixtures of SA and drug-free SLMs are not able to confer a sustained release profile to SA.

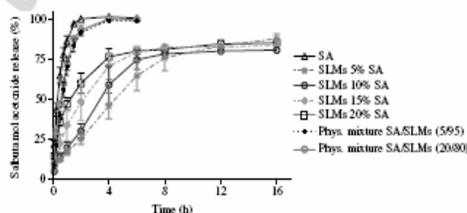


Fig. 8. SA dissolution profiles of pure SA compared with SA release profiles from SLMs containing 5–10–15 or 20% SA or from physical mixtures containing SA and drug-free SLMs (5/95 and 20/80) ($n = 7$).

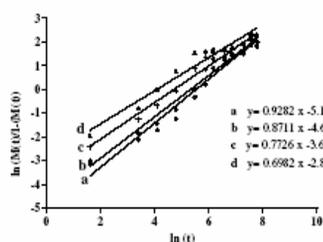


Fig. 9. Experimental and linearized release profiles of SA from (a) SLMs 5% SA (○), (b) SLMs 10% SA (●), (c) SLMs 15% SA (+) and (d) SLMs 20% SA (▲).

Table 4
Theoretical times (min) after which SA release is equal to 25% ($t(25)$), 50% ($t(50)$) or 75% ($t(75)$) SA

	SA	SLMs 5% SA	SLMs 10% SA	SLMs 15% SA	SLMs 20% SA
$t(25)$	6.2	78.1	59.1	27.3	12.4
$t(50)$	16.1	255.0	208.6	113.2	59.8
$t(75)$	40.8	832.8	736.5	469.2	288.7

4. Conclusions

Solid lipid microparticles were successfully prepared in a size range suitable for pulmonary administration using a rather simple production technique. The methodology of experimental design proved to be an interesting and useful tool for optimizing particle size. In practice it has also been shown that it is possible to produce SLMs containing 20% SA (or even 25%) but it has also been observed by SEM and by X-ray diffraction that a high drug loading led to SA crystallisation outside of the particles. The *in vitro* drug release studies showed that SA release is slower when the drug loading is lower but is in any case slower than the dissolution rate of pure SA. This observation allows us to assess that the drug release can be sustained by using SLMs

as drug carrier in comparison with pure drug. It can be concluded that, given their numerous advantages and their ability to impart in vitro sustained release properties to the incorporated active substance, SLMs can reasonably be considered as a promising drug carrier system that could notably be used for pulmonary administration. However, thorough in vivo drug release studies of pulmonary administered SLMs is up to now still missing in the literature. As previously specified SLMs are intended to be administered by inhalation as a powder. Further researches will then consist in formulating inhalation powders containing SLMs with suitable excipients and determining respirable fractions of the tested powders.

Acknowledgement

The authors would like to thank the Walloon Region (Belgium) for its financial support to this research work.

References

- [1] H.M. Courrier, N. Butz, T.F. Vandamme, Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19 (2002) 425–498.
- [2] D.A. Groneberg, C. Witt, U. Wagner, K.F. Chung, A. Fischer, Fundamentals of pulmonary drug delivery, *Respir. Med.* 97 (2003) 382–387.
- [3] E. Karathanasi, A.L. Ayyagari, R. Bhavane, R.V. Bellamkonda, A.V. Annappagada, Preparation of in vivo cleavable agglomerated liposomes suitable for modulated pulmonary drug delivery, *J. Control. Release* 103 (2005) 159–175.
- [4] N.R. Labiris, M.B. Dolovich, Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56 (2003) 588–599.
- [5] J.G. Hardy, T.S. Chadwick, Sustained release drug delivery to the lung: an option for the future, *Clin. Pharmacokinet.* 39 (2000) 1–4.
- [6] P.K. Gupta, A.L. Adjei, Modulated-release aerosol, in: P.K. Gupta, A.L. Adjei (Eds.), *Inhalation Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins*, Marcel Dekker, New York, 2003, pp. 667–702.
- [7] W.H. Finlay, J.P. Wong, Regional lung deposition of nebulized liposome-encapsulated ciprofloxacin, *Int. J. Pharm.* 167 (1998) 121–127.
- [8] R.J. González-Rothi, H. Schreier, Pulmonary delivery of liposome-encapsulated drugs in asthma therapy, *Clin. Immunother.* 4 (1995) 331–337.
- [9] H. Schreier, R.J. González-Rothi, A.A. Steenko, Pulmonary delivery of liposomes, *J. Control. Release* 24 (1993) 209–223.
- [10] X.M. Zeng, G.P. Martin, C. Marriott, The controlled delivery of drugs to the lung, *Int. J. Pharm.* 124 (1995) 149–164.
- [11] Y. Darwis, I.W. Kellaway, Nebulisation of rehydrated freeze-dried beclomethasone dipropionate liposomes, *Int. J. Pharm.* 215 (2001) 113–121.
- [12] I.W. Kellaway, S.J. Farr, Liposomes as drug delivery systems to the lung, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5 (1990) 149–161.
- [13] R.O. Cook, R.K. Panu, I.W. Kellaway, Novel sustained release microspheres for pulmonary drug delivery, *J. Control. Release* 104 (2005) 79–90.
- [14] K.M.G. Taylor, G. Taylor, I.W. Kellaway, J. Stevens, The stability of liposomes to nebulisation, *Int. J. Pharm.* 58 (1990) 57–61.
- [15] M.M. El-Basir, I.W. Kellaway, Poly(D,L-lactic acid) microspheres for pulmonary drug delivery: release kinetics and aerosolization studies, *Int. J. Pharm.* 175 (1998) 135–145.
- [16] B. Wichert, P. Rohdewald, Low molecular weight PLA: a suitable polymer for pulmonary administered microparticles? *J. Microencapsul.* 10 (1993) 195–207.
- [17] Y.L. Lai, R.C. Mehta, A.A. Thacker, S.D. Yoo, P.J. McNamara, P.P. DeLuca, Sustained bronchodilation with isoproterenol poly(glycolide-co-lactide) microspheres, *Pharm. Res.* 10 (1993) 119–125.
- [18] E.A. Poyner, H.O. Alpar, A.J. Almeida, M.D. Gamble, M.R.W. Brown, A comparative study on the pulmonary delivery of tobramycin encapsulated into liposomes and PLA microspheres following intravenous and endotracheal delivery, *J. Control. Release* 35 (1995) 41–48.
- [19] D.A. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben Jebra, M.L. Eskew, J. Mintes, D. Deaver, N. Lotan, R. Langer, Large porous particles for pulmonary drug delivery, *Science* 276 (1997) 1868–1871.
- [20] D.J. Armstrong, P.N. Elliott, J.L. Ford, D. Gadsdon, G.P. McCarthy, C. Rostrom, M.D. Worsley, Poly(D,L-lactic acid) microspheres incorporating histological dyes for intra-pulmonary histopathological investigations, *J. Pharm. Pharmacol.* 48 (1996) 258–262.
- [21] A. Ben Jebra, D. Chen, M.L. Eskew, R. Vanbever, R. Langer, D.A. Edwards, Large porous particles for sustained protection from carbachol-induced bronchoconstriction in guinea pigs, *Pharm. Res.* 16 (1999) 555–561.
- [22] R. Górtés, E. Esposito, G. Luca, C. Nastruzzi, Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds, *Biomaterials* 23 (2002) 2283–2294.
- [23] S. Jaspart, G. Piel, L. Delattre, B. Evrand, Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterisation, drug release and applications, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2 (2005) 75–87.
- [24] M. Trotta, R. Cavalli, M.E. Carloti, L. Battaglia, F. Debemardi, Solid lipid micro-particles carrying inulin formed by solvent-in-water emulsion-diffusion technique, *Int. J. Pharm.* 288 (2005) 281–288.
- [25] V. Sanna, N. Kirschvink, P. Gustin, E. Gavini, I. Roland, L. Delattre, B. Evrand, Preparation and in vivo toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration, *AAPS PharmSciTech* 5 (2003). Article 27.
- [26] European Pharmacopoeia, fifth ed., 2005.
- [27] M.R. Cairn, R. Hunter, L.R. Nasimbeni, A.T. Stevens, Resolution of albuterol acetamide, *Tetrahedron* 10 (1999) 2175–2189.
- [28] C. Bosquillon, C. Lombry, V. Preat, R. Vanbever, Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance, *J. Control. Release* 70 (2000) 329–339.
- [29] N. Passerini, B. Perissuti, M. Moneghini, D. Voinovich, B. Albertini, C. Cavallari, L. Rodriguez, Characterization of carbamazepine-Gelucire 50/13 microparticles prepared by a spray-congealing process using ultrasounds, *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 699–707.
- [30] N. Passerini, B. Perissuti, B. Albertini, D. Voinovich, M. Moneghini, L. Rodriguez, Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing, *J. Control. Release* 88 (2003) 263–275.
- [31] S.R. Vippagunta, K.A. Maul, S. Tallavajjala, D.J.W. Grant, Solid-state characterization of nifedipine solid dispersions, *Int. J. Pharm.* 236 (2002) 111–123.
- [32] V. Venkateswari, K. Manjunath, Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles, *J. Control. Release* 95 (2004) 627–638.
- [33] V. Jenning, A.F. Thunemann, S.H. Gohla, Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids, *Int. J. Pharm.* 199 (2000) 167–177.

