



HAL
open science

Phosphostim® 200 : stabilisation par lyophilisation

Florence Lhospice

► **To cite this version:**

Florence Lhospice. Phosphostim® 200 : stabilisation par lyophilisation. Sciences pharmaceutiques. 2005. dumas-01894972

HAL Id: dumas-01894972

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01894972>

Submitted on 15 Oct 2018

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

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

AVERTISSEMENT

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

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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

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

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

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



2^e exemplaire

Université Joseph Fourier
Faculté de Pharmacie de Grenoble

Année : 2005

N :

7002

PHOSPHOSTIM®200 :
Stabilisation par lyophilisation

Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie
Diplôme d'état

Florence Lhospice

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Le 21 janvier 2005

Devant le jury composé de :

Président du jury : Monsieur le Professeur Aziz Bakri, Directeur de thèse

Membres du jury

Monsieur le Professeur Louis Rey

Monsieur Jean-Luc Barnoux, Directeur de recherche

CONFIDENTIEL

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leur auteur.



Université Joseph Fourier
Faculté de Pharmacie de Grenoble

Année : 2005

N :

PHOSHOSTIM® 200 :
Stabilisation par lyophilisation

Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie
Diplôme d'état

Florence Lhospice

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Le 21 janvier 2005

Devant le jury composé de :

Président du jury : Monsieur le Professeur Aziz Bakri, Directeur de thèse

Membres du jury

Monsieur le Professeur Louis Rey

Monsieur Jean-Luc Barnoux, Directeur de recherche

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leur auteur.



Professeurs

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Domaine de la Merci 38 700 La Tronche

Doyen de la Faculté : M. le Professeur **P. DEMENGE**

Vice-Doyenne : Mme **A. VILLERET**

PROFESSEURS DE PHARMACIE

BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	(Emérite)
BURMEISTER	Wilhelm	Biophysique
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-Technique
DANEL	Vincent	Toxicologie
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Bio-Inorganique
DEMENGE	Pierre	Physiologie / Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie / Biotechnologie
FAVIER	Alain	Biochimie / Biotechnologie
GOULON	Chantal	Biophysique
GRILLOT	Renée	Parasitologie
LECLERC	Gérard	Chimie Organique
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique
RIBUOT	Christophe	Physiologie / Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacie Galénique

PROFESSEUR ASSOCIE (PAST)

CHAMPON	Bernard	Pharmacie Clinique
----------------	---------	--------------------

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique
BARTOLI	Marie-Hélène	Pharmacie Clinique et Biotechn.
BOUMENDJEL	Ahcène	Pharmacognosie
CARON	Cécile	Biologie Moléculaire
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie et génie de la formulation
DELETRAZ	Martine	Droit Pharmaceutique Economie
DEMEILLERS	Christine	Biochimie
DESIRE	Jérôme	Chimie Bioorganique
DIJOUX-FRANCA	Marie-Geneviève	Pharmacognosie
DUMORT-MEUNIER	Claire	Virologie
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique
FAURE	Patrice	Biochimie
FAURE-JOYEUX	Marie	Physiologie - Pharmacologie
FOUCAUD-GAMEN	Jacqueline	Immunologie
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie Galénique
GERMI	Raphaële	Bactériologie
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie - Pharmacologie
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique
GUIRAUD	Pascale	Biologie Cellulaire et Génétique
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie
KRIVOBOK	Serge	Botanique - Cryptogamie
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique / Chimie Thérapeutique
PINEL	Claudine	Parasitologie
RAVEL	Anne	Chimie Analytique
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique
RICHARD	Jean-Michel	
RIONDEL	Jacqueline	Physiologie - Pharmacologie
SEVE	Michel	Ens. Physique / Rech. Biochimie
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Bio-Inorganique
VILLEMMAIN	Danielle	Mathématiques / Informatique
VILLET	Annick	Chimie Analytique

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

ROUTABOUL	Christel	Chimie Générale
------------------	----------	-----------------

REMERCIEMENTS :

A Monsieur le Professeur Aziz Bakri

Je vous remercie pour votre disponibilité, votre savoir et votre confiance dans ce travail mais également tout au long de mes études. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Rey

Je suis particulièrement honorée de votre présence dans ce jury. Je vous remercie tout particulièrement pour votre aide et votre collaboration dans ce travail. Soyez assuré de mon estime et de ma plus profonde gratitude.

A Monsieur Jean Luc Barnoux

Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide, tes nombreux conseils, ton dynamisme mais également pour ta bonne humeur. Merci beaucoup.

A Monsieur Jérôme Tiollier

Je te remercie pour ta confiance ton aide et ton soutien mais aussi pour ton énergie débordante.

A INNATE PHARMA

Je tiens à remercier toute l'équipe d'INNATE PHARMA pour son soutien dans ce travail.

A Sébastien

A mes parents

A Hélène, Héloïse, Armelle et Fanny

Merci à vous...tout simplement.

Introduction

L'objectif premier d'étude de formulation est d'améliorer la stabilité d'une ou plusieurs molécules actives à une température donnée. Pour INNATE PHARMA ces essais se déroulent dans une **phase de conception**, si l'on considère comme décrit par le Pr. Hir que la vie d'un médicament est composé de deux phases : la conception et la fabrication. La première de ces phases aboutit à la définition d'une formulation pour essais cliniques tandis que la deuxième constitue la période post AMM [1].

Le choix du procédé de lyophilisation repose sur un ensemble connu de caractéristiques physico-chimiques propre à la molécule de Bromohydrine Pyrophosphate sel de sodium et répond conjointement à la mise en œuvre d'une forme galénique injectable par voie intraveineuse. La problématique de ce travail est donc de définir un cycle de lyophilisation adapté au principe actif combiné à un choix d'excipients raisonné qui permettent l'amélioration de la stabilité du dit principe actif et l'obtention d'une forme pharmaceutique acceptable pour la réalisation des essais clinique.

Par un travail préalable de synthèse bibliographique nous aborderons tout d'abord la description du procédé de lyophilisation en décrivant les trois principales étapes qui le constitue : la congélation, la sublimation ainsi que la désorption. Il restera alors à définir la notion de stabilité des lyophilisats et l'intérêt des excipients. Enfin nous établirons l'état des lieux des différents équipements mis à la disposition des scientifiques pour aider à la mise en œuvre du cycle.

Dans un second temps sera décrit l'ensemble des études réalisées dans le cas particulier de PHOSHOSTIM[®] 200. La description de ces études s'articulera selon deux parties distinctes motivées par des objectifs différents.

Enfin nous confronterons nos résultats aux données publiées à ce jour et conclurons sur l'ensemble des résultats obtenus.

Sommaire

INTRODUCTION.....	5
SOMMAIRE.....	7
LISTE DES FIGURES.....	9
PARTIE 1 : REVUE GENERALE SUR LA CONNAISSANCE ET LA MAITRISE DE LA LYOPHILISATION.....	12
PARTIE 1.1 : INTRODUCTION.....	12
<i>Partie 1.1.1 : La lyophilisation : De la sémantique à la pratique.....</i>	<i>12</i>
<i>Partie 1.1.2 : Historique.....</i>	<i>13</i>
<i>Partie 1.1.3 : Les domaines d'application.....</i>	<i>14</i>
PARTIE 1.2 : LE PRINCIPE DE LYOPHILISATION.....	14
<i>Partie 1.2.1 : La congélation.....</i>	<i>17</i>
Partie 1.2.1.1 : Cristallisation de l'eau.....	18
Partie 1.2.1.2 : Solidification du soluté.....	18
Partie 1.2.1.3 : Maîtrise des paramètres de congélation:.....	24
Partie 1.2.1.4 : Traitement thermique.....	25
<i>Partie 1.2.2 : La dessiccation primaire.....</i>	<i>27</i>
Partie 1.2.2.1 : Transfert de chaleur – transfert de masse.....	27
Partie 1.2.2.2 : Résistance du produit.....	31
Partie 1.2.2.3 : Résistance du bouchon.....	32
<i>Partie 1.2.3 : La dessiccation secondaire ou désorption.....</i>	<i>34</i>
PARTIE 1.3 : STABILITE DU LYOPHILISAT.....	35
PARTIE 1.4 : INTERET DES EXCIPIENTS.....	38
PARTIE 1.5 : EQUIPEMENTS ET METHODES PERMETTANT LA MISE EN ŒUVRE, LE SUIVI ET L'ÉVALUATION DU CYCLE DE LYOPHILISATION.....	40
<i>Partie 1.5.1 : L'analyse du comportement basse température des produits à lyophiliser.....</i>	<i>40</i>
Partie 1.5.1.1 : Analyse thermique différentielle (ATD) ou analyse microcalorimétrique différentielle (DSC).....	41
Partie 1.5.1.2 : Analyse microcalorimétrique différentielle modulée (MDSC).....	42
Partie 1.5.1.3 : Analyse de l'impédance électrique.....	43
Partie 1.5.1.4 : Analyse diélectrique.....	44
Partie 1.5.1.5 : Microscopie optique.....	45
<i>Partie 1.5.2 : L'analyse du produit sec.....</i>	<i>45</i>
Partie 1.5.2.1 : Mesure de l'humidité résiduelle.....	45
Partie 1.5.2.2 : Mesure BET.....	47
Partie 1.5.2.3 : Analyse isothermes de sorption de l'eau.....	49
<i>Partie 1.5.3 : Le suivi des paramètres pression et température en cours de lyophilisation.....</i>	<i>52</i>
Partie 1.5.3.1 : Suivi de la pression.....	52
Partie 1.5.3.2 : Suivi de la température.....	53
PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES, RESULTATS.....	54
PARTIE 2.1 : INTRODUCTION.....	54
PARTIE 2.2 : LES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUE DU BROMOHYDRINE PYROPHOSPHATE, SEL DE SODIUM.....	55
PARTIE 2.3 : LA FORMULATION PHOSPHOSTIM® 200 : PREMIERE ETAPE.....	59
<i>Partie 2.3.1 : Matériels et méthodes pour la mise en oeuvre du cycle de lyophilisation n°1.....</i>	<i>60</i>
Partie 2.3.1.1 : Les matières premières.....	60
Partie 2.3.1.2 : Les équipements.....	61
<i>Partie 2.3.2 : Résultats de l'étude du comportement basse température sur les solution de BrHPP seul et en mélange.....</i>	<i>62</i>
Partie 2.3.2.1 : Détermination de la température de cristallisation de l'eau.....	62
Partie 2.3.2.2 : Détermination de la température de solidification du :BrHPP seul et du mélange BrHPP + excipients.....	63
Partie 2.3.2.3 : Recherche de la température de perte de structure (T _{im}).....	64

<i>Partie 2.3.3 : Mise au point de la recette de lyophilisation n°1</i>	66
<i>Partie 2.3.4 : Analyse des lyophilisats</i>	70
<i>Partie 2.3.5 : Matériels et méthodes pour la transposition n°1 chez STERILYO</i>	72
Partie 2.3.5.1 : Les matières premières.....	72
Partie 2.3.5.2 : Les équipements.....	73
<i>Partie 2.3.6 : Cycles de lyophilisation 1 & 2</i>	74
<i>Partie 2.3.7 : Analyse des lyophilisats</i>	75
Partie 2.3.7.1 : Aspect visuel.....	75
Partie 2.3.7.2 : Dosage.....	77
Partie 2.3.7.3 : Teneur en eau.....	77
Partie 2.3.7.4 : Test de dissolution.....	78
Partie 2.3.7.5 : Etudes de stabilité.....	78
<i>Partie 2.3.8 : Matériels et méthodes pour la mise en œuvre du lot clinique</i>	80
<i>Partie 2.3.9 : Mise en œuvre du cycle de lyophilisation n°2 d'ARCHEMIS</i>	81
<i>Partie 2.3.10 : Analyse des lyophilisats obtenus avec le cycle n°2 d'ARCHEMIS</i>	83
<i>Partie 2.3.11 : Transposition du cycle de lyophilisation pour la fabrication du lot clinique chez STERILYO</i>	85
<i>Partie 2.3.12 : Analyse des lyophilisats obtenus avec le cycle n°2 de STERILYO</i>	86
PARTIE 2.4 : LA FORMULATION PHOSPHOSTIM® 200 : DEUXIEME ETAPE	87
<i>Partie 2.4.1 : Matériels et méthodes</i>	89
Partie 2.4.1.1 : Méthode.....	89
Partie 2.4.1.2 : Matériels.....	90
<i>Partie 2.4.2 : Résultats</i>	95
Partie 2.4.2.1 : Analyse comportement basse température.....	95
Partie 2.4.2.2 : Essais de recettes de lyophilisation.....	99
Partie 2.4.2.3 : Transposition d'échelle.....	112
Partie 2.4.2.4 : Essais complémentaires.....	123
PARTIE 3 : DISCUSSION	126
PARTIE 3.1 : LA CONGELATION	126
<i>Partie 3.1.1 : Comportement basse température du mélange solvant-soluté</i>	126
Partie 3.1.1.1 : Cristallisation de l'eau.....	127
Partie 3.1.1.2 : Solidification du soluté.....	130
Partie 3.1.1.3 : Traitement thermique.....	133
PARTIE 3.2 : LA DESSICCATION SECONDAIRE	136
<i>Partie 3.2.1 : Effets observées en transfert de chaleur– transfert de masse</i>	136
Partie 3.2.1.1 : Introduction contrôlée d'air.....	136
Partie 3.2.1.2 : Evolution du front de sublimation.....	138
PARTIE 3.3 : LA DESORPTION	140
PARTIE 3.4 : LA CARACTERISATION DU LYOPHILISAT	142
<i>Partie 3.4.1 : Dosage</i>	142
<i>Partie 3.4.2 : Analyse de l'humidité résiduelle</i>	143
<i>Partie 3.4.3 : Microscopie électronique</i>	148
PARTIE 3.5 : LES DONNEES DE STABILITE	148
<i>Partie 3.5.1 : Etudes cinétiques</i>	149
<i>Partie 3.5.2 : Etudes thermodynamiques</i>	151
CONCLUSION	154
BIBLIOGRAPHIE	160

Liste des figures

Figure 1 d'après Rey [7]. Evolution schématique du procédé de lyophilisation. La courbe de température et la courbe de teneur en eau sont indiquées en fonction du temps. Dans le diagramme de température : T_{CS} = température maximale de complète solidification ; T_{im} = température minimum de fusion commençante ; T'_{im} = température limite pour un procédé accéléré ; T_a = température maximum autorisée pour le produit sec. Dans le diagramme de teneur en eau : RMF = teneur en eau finale attendue.....	15
Figure 2 d'après Nail [8]. Schéma d'un lyophilisateur classique	17
Figure 3 : diagramme de phase glycine/eau d'après Nail <i>et al</i> [8]. Point a = coordonnées température et concentration de la solution de départ, point b = coordonnées température et concentration pour la cristallisation de l'eau sans surfusion, point c = coordonnées température et concentration pour la cristallisation de l'eau avec surfusion, point eutectique = coordonnées température et concentration pour la cristallisation du soluté.	20
Figure 4 : diagramme de phase saccharose/eau d'après Nail <i>et al</i> [8]. T_g' = température de transition vitreuse qui correspond à la concentration maximale de sucrose en solution, T_g = température de transition vitreuse sur produit sec, T_e = température eutectique	21
Figure 5 d'après L. Rey [1]. Description des changements d'états que peut revêtir un soluté amorphe. La chaleur spécifique est considéré comme un «marqueur».....	23
Figure 6 : Schéma d'évolution du front de sublimation en cours de dessiccation primaire	27
Figure 7 d'après L.Rey [15] : Evolution de l'impédance électrique d'un même mélange en cours de refroidissement et en cours de réchauffement.....	28
Figure 8 d'après Thurk <i>et al</i> [16] décrivant les différents transferts de chaleur impliqués dans la dessiccation	30
Figure 9 d'après Searles <i>et al</i> [9] : photographie de lyophilisats observés en microscopie électronique, coupe verticale (x50). Produit en A : température de nucléation basse, produit en F : température de nucléation élevée	32
Figure 10 d'après Willemer [17]. Influence de la forme des bouchons sur le procédé de lyophilisation. Le pourcentage de glace sublimée en 3 heures à la même température est de (en considérant le 100% avec flacons sans bouchons), le bouchon 1 : 77%, le bouchon 2 : 75%, le bouchon 3 : 66%. ...	33
Figure 11 d'après Nails [8], représentation des événements thermiques les plus courants observés par analyse thermique différentielle.	42
Figure 12 d'après Royall <i>et al.</i> [8, 30] : thermogrammes MDSC sur le saquinavir lyophilisé, montrant le signal réversible, l'irréversible et total du flux de chaleur	43
Figure 13 : Représentation schématique d'un équipement BET.....	48
Figure 14 d'après , Cinétiques d'adsorption obtenues par analyse DVS sur 10 mg de cellulose microcristalline.....	51
Figure 15 : Etude d'isothermes de sorption par DVS. Tracé bleu : isotherme d'adsorption, tracé rose : isotherme de désorption	57
Figure 16 : Analyse MDSC sur la formule BrHPP 10%+ mannitol 2.5% en cycle de congélation. Le pic exothermique correspond à la cristallisation de l'eau	63
Figure 17 : Résultats MDSC obtenus en cycle de réchauffement sur la solution BrHPP 10% seul. Le tracé le plus haut correspond à la composante irréversible du flux de chaleur, le tracé du milieu correspond à la totalité du flux de chaleur, le tracé du bas correspond à la composante réversible du flux de chaleur.	64
Figure 18 : Photographie de la formule « BrHPP 10%» obtenue en cryomicroscopie	65
Figure 19 : Cycle ARCHEMIS n°1	69
Figure 20 : BrHPP seul 10% Figure 21 : BrHPP 10% + lactose 2,5%	70
Figure 22 : BrHPP 10% + mannitol 2,5%.....	71
Figure 23 : Cycle n°1 et 2 mis en œuvre chez STERILYO	75
Figure 24 : BrHPP seul 10% (capsule verte), BrHPP 10% + mannitol 2.5% (capsule rouge) fabriqué par STERILYO.....	76
Figure 25 : BrHPP 10% + lactose 2.5%, fabriqué par STERILYO	76
Figure 26 : Cycle de lyophilisation n° 2 mis en œuvre par ARCHEMIS.....	82
Figure 27 : Photographie des lyophilisats obtenus avec le cycle n°2 d'ARCHEMIS.....	84
Figure 28 : Cycle de lyophilisation n°2 mis en œuvre par STERILYO	85
Figure 29 : Photographie des lyophilisats obtenus avec le cycle n°2 de STERILYO	86
Figure 30 : Représentation de l'analyse en pression de vapeur d'un lyophilisat d'après L. Rey [1]	93

Figure 31 : Mise en place de l'échantillon sec pour analyse thermique différentielle, réalisée par le Pr. Rey.....	94
Figure 32 : Tracés de l'analyse de l'impédance électrique (Z sin, Z cos) ; tracé de l'analyse thermique différentielle (ATD) pour la formule « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » en cycle de refroidissement. Le pic exothermique révélé en ATD correspond à la cristallisation de l'eau, la brusque montée d'impédance en Z sin correspond à la solidification du soluté.	97
Figure 33 : Tracés de l'analyse de l'impédance électrique (Z sin, Z cos) ; tracé de l'analyse thermique différentielle (ATD) pour la formule « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » en cycle de réchauffement. Le pic endothermique révélé en ATD correspond à la fusion l'eau, la brusque perte d'impédance en Z sin correspond à la perte de solidification du soluté.....	98
Figure 34 : Cycle de lyophilisation LT103 mis au point par le Pr. Rey	99
Figure 35 : Cycle de lyophilisation LT104 mis au point par le Pr. Rey	101
Figure 36 : Cycle de lyophilisation LT105 mis au point par le Pr. Rey	102
Figure 37 : Cycle de lyophilisation LT106 mis au point par le Pr. Rey	103
Figure 38 : cycle de lyophilisation LT108 mis au point par le Pr. Rey	105
Figure 39 : Suivi de l'impédance électrique de la formule « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » en cours de congélation sur le cycle LT108.....	106
Figure 40 : Photographie des lyophilisats obtenus avec le cycle LT108	107
Figure 41 : Analyse thermique différentielle en cours de réchauffement sur les lyophilisats obtenus avec le cycle LT108. La croix correspond à la température mesurée de transition vitreuse.....	109
Figure 42 : Analyse thermique différentielle en cycle de réchauffement sur le lyophilisat « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% + saccharose 2.5% + mannitol 2.5% » ; tracé en vert : 1 ^{ère} mesure, tracé en noir : deuxième mesure après refroidissement.....	110
Figure 43 : Analyse thermique différentielle en cycle de réchauffement sur lyophilisat « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » ; tracé en rouge : première mesure, tracé en bleu : deuxième mesure après refroidissement.....	111
Figure 44 : Cycle de lyophilisation LT113 mis en œuvre par le Pr. Rey, concernant les pressions : tracé en rose : sonde de pression baratron, en rouge : la consigne de pression, concernant la température : tracé en bleu : température des étagères, tracé en rouge : température du produit. <i>Remarque : le trait épais noir ne correspond pas au cycle LT113.</i>	112
Figure 45 : Analyse par microscopie électronique de la surface des échantillons « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » obtenus avec le cycle LT113, réalisée par MICROSCAN.....	114
Figure 46 : Analyse par microscopie électronique en coupe des échantillons « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » obtenus avec le cycle LT113, réalisée par MICROSCAN.	115
Figure 47 : Analyse par microscopie électronique de la zone articulaire des lyophilisats « BrHPP 12.5% + lactose 3.73 » obtenus avec le cycle LT113, réalisée par MICROSCAN.....	115
Figure 48 : Cycle de lyophilisation LT114 réalisé par le Pr. Rey	117
Figure 49 : Photographie des lyophilisats obtenus avec le cycle LT114, à gauche pastille bleu : BrHPP 12.5% + mannitol 10%, pastille transparente : BrHPP 12.5% + lactose 3.7%. A droite BrHPP 12.5 % + mannitol 10%	118
Figure 50 : Analyse par microscopie électronique de la surface des lyophilisats « BrHPP 12.5%+ lactose 3.7% » obtenus avec le cycle LT114, réalisée par MICROSCAN	119
Figure 51 : Analyse par microscopie électronique en coupe des lyophilisats « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » obtenus avec le cycle LT114, réalisé par MICROSCAN	120
Figure 52 : Analyse par microscopie électronique de la surface des lyophilisats « BrHPP 12.5% + mannitol 10% » obtenus avec le cycle LT114, réalisée par MICROSCAN	120
Figure 53 : Analyse par microscopie électronique en coupe des lyophilisats « BrHPP 12.5% + mannitol 10% » obtenus avec le cycle LT114, réalisée par MICROSCAN.....	121
Figure 54 : Analyse BET des lyophilisats « BrHPP 12.5% + lactose 2.5% + mannitol 7.5% » en adsorption	124
Figure 55 : Histogramme de la congélation du cycle de lyophilisation n°1 mis au point par ARCHEMIS. La cristallisation de l'eau marquée par la remontée en température des produits est autour de -12°C.	128
Figure 56 : Test lyophilisation avec contrôle de pression effectué par le Pr Rey. Les tracées bleu et rouge en haut de l'histogramme représente les valeurs des pressions données par la sonde Pirani (bleu) et la sonde Baratron (rouge). L'injection d'air en début de sublimation est marquée par l'augmentation de la pression. La pression en sublimation est de 0.1mbar, la température des étagères (tracé vert) est de -20°C.	137

Figure 57 : Test de lyophilisation basse pression effectué par le Pr Rey. La pression est mesurée par la sonde Baratron (tracé rouge), elle est maintenue au-dessous de 10^{-3} mbar en sublimation, la température des étagères (tracé vert) est de 0°C.....	138
Figure 58 : Schéma décrivant le déplacement du front de sublimation dans le flacon. A gauche évolution horizontale du front de sublimation horizontale, à droite déplacement infiltrante du front de sublimation.....	139
Figure 59 : Analyses thermiques en cours de réchauffement sur produit sec (cycle LT108) effectuées par le Pr. Rey.....	153
Figure 60 : Comparaison mesure teneur en eau méthode Karl Fisher et analyse pression de vapeur effectuée par le Pr. Rey.....	144
Figure 61 : Courbes d'évolution des pressions de vapeurs pour un flacon et une ampoule remplis et vides.....	146

Partie 1 : Revue générale sur la connaissance et la maîtrise de la lyophilisation

Partie 1.1 : Introduction

Partie 1.1.1 : La lyophilisation, de la sémantique à la pratique

Le mot lyophilisation est né du terme grec « lyophile » qui signifie littéralement « ami des solvants », ceci traduit le caractère **hygroscopique** que revêt un produit solide lyophilisé, grâce à l'opération de dessiccation qu'il a subi et qui lui permet de se dissoudre très rapidement lors de sa reconstitution.

Mais avant tout, la lyophilisation est une méthode développée pour **le séchage** de solutions, suspensions, poudres, à basse température. Le principe physique de la lyophilisation est d'éliminer le solvant, généralement l'eau, pour grande partie par **sublimation**, c'est-à-dire passage de l'état solide à l'état vapeur, sans passage à l'état liquide, par une combinaison définie de température et pression. Cette explication simplifiée du procédé ne reflète pas la **haute technicité** nécessaire à sa mise en œuvre ainsi que sa **criticité**. Cependant ces éléments n'entachent en rien le développement croissant de cette méthode dans de nombreux domaines, dont celui de **la pharmacie**. Dans ce cas particulier, la lyophilisation a vu son essor grâce à la formulation de protéines, molécules fragiles qui sont dénaturées par l'utilisation de températures élevées. Mais aujourd'hui, la mise en œuvre de cette technique concerne également de nombreuses autres **molécules chimiques**.

Partie 1.1.2 : Historique

Il faut remonter au XII^{ème} siècle , sous la civilisation Incas pour retrouver les premières utilisations du procédé mis en oeuvre pour parer aux problèmes de **conservation des aliments**, en particulier la viande [2]. Les hauts plateaux des Andes réunissaient les conditions nécessaires pour cette opération : une basse température qui assurait la congélation de la viande et, une basse pression qui alliée au rayonnement du soleil, permettait la dessiccation par sublimation. C'est en 1906 que la lyophilisation naît officiellement [2]. Les chercheurs français Bordas et d'Arsonval, démontrent à l'Académie des Sciences de Paris, pour la première fois, qu'il est possible de sécher un produit à partir d'une **solution congelée sous vide**. Ils décrivent également l'application de cette méthode à la conservation des vaccins et sérums.

En 1909, l'américain Shakell reprend ces travaux pour les appliquer à la **conservation des protéines** [3]. Il utilise des desséchants chimiques pour absorber l'eau libérée lors de la sublimation. Puis en 1935, Earl W. Flosdorf publie d'importants résultats de recherches qui décrivent la grande capacité du produit séché par lyophilisation à se réhydrater [2]. Pendant la seconde guerre mondiale, Earl W. Flosdorf collabore avec Ronald Greaves et François Hennaff pour travailler sur la production de **plasma sanguin lyophilisé**. Ces événements initient un tournant majeur dans le développement du procédé.

C'est grâce à la mise en place du premier **Cours International sur la Lyophilisation** initié par Charles Mérieux et Louis Rey en 1958, qui permet de réunir un grand nombre d'experts que le procédé tient aujourd'hui une place importante dans les domaines pharmaceutiques et alimentaires et qu'il s'impose comme un moyen performant de séchage de nombreux produits [4], [2]. En 1964, L. Rey développe des essais de lyophilisation de **systèmes non-aqueux** et démontrent sa faisabilité [5]. Cela étend, donc, le procédé à tout produit en solution dans un solvant non-aqueux.

Partie 1.1.3 : Les domaines d'application

Bien que le procédé de lyophilisation soit complexe et coûteux, il trouve de nombreuses applications dans divers domaines [1]:

- La conservation des substances médicamenteuses fragiles par exemple les produits d'origine biologique, ou de synthèse sensibles à la température.
- La conservation des greffons d'origine humaine ou animale – La lyophilisation est mise en place pour la génération de banques de tissus d'origine humaine : os, fragments de peau, cornée, cartilages...
- La conservation de la matière vivante – Pour le moment la conservation d'organismes vivants est limitée aux microorganismes, virus et bactéries.

La lyophilisation peut également être appliquée pour résoudre et/ou améliorer des problèmes techniques. Le galéniste y a recours [1],[6] pour :

- le conditionnement de composants non miscibles à l'état liquide et qui congelés en phases successives, sont ensuite lyophilisés ;
- la répartition de façon précise de petites doses de principe actif diluées en solution ;
- L'obtention d'un produit final poreux facile à remettre en solution ou en suspension ;
- L'obtention d'un produit final stérile après stérilisation par filtration ou par irradiation.

Partie 1.2 : Le Principe de lyophilisation

Le procédé de lyophilisation est un procédé de séchage qui se découpe en trois phases:

- la congélation,

- la dessiccation primaire ou sublimation
- la dessiccation secondaire également nommée désorption.

Les paramètres température et temps appliqués au cours d'un cycle de lyophilisation sont détaillés dans le schéma ci-après (cf. Figure 1).

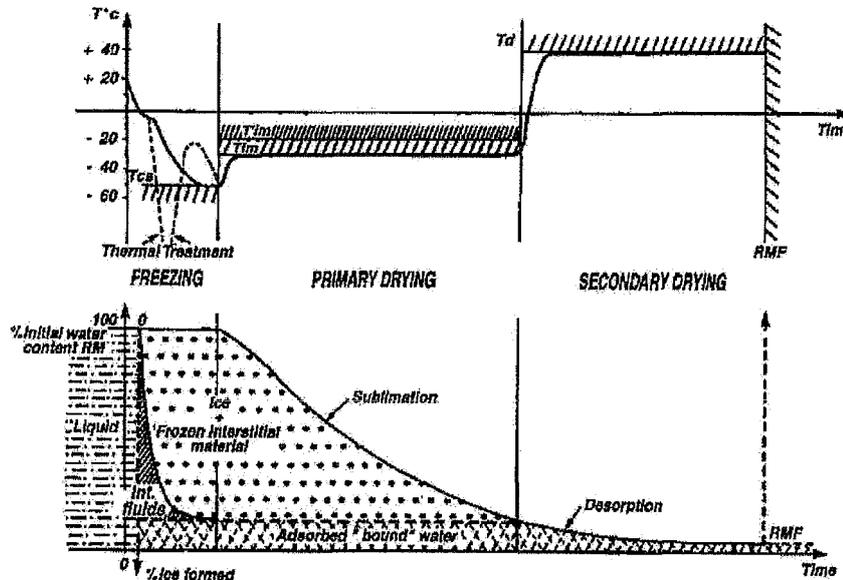


Figure 1 d'après Rey [7]. Evolution schématique du procédé de lyophilisation. La courbe de température et la courbe de teneur en eau sont indiquées en fonction du temps. Dans le diagramme de température : T_{CS} = température de complète solidification ; T_{Im} = température minimum de fusion commençante ; T_{Im} = température maximum de fusion commençante ; T_d = température maximum autorisée pour le produit sec. Dans le diagramme de teneur en eau : RMF = teneur en eau finale attendue.

Le principe de l'étape de congélation consiste à **solidifier** l'ensemble du produit, i.e. solvant et soluté. Pour cela le produit est porté à une température inférieure à la température communément appelée **température de solidification totale**, T_{CS} . Pour les solutions de faibles concentrations, c'est-à-dire inférieur à 30 % en soluté, cas généralement retrouvé en pharmacie, le solvant considéré dans la suite de l'exposé comme étant de l'eau se solidifie en premier. L'eau se congèle en formant des cristaux de glace. Le solvant se sépare ainsi du soluté logé dans le liquide interstitiel. Ce soluté va alors à son tour se solidifier sous différentes formes selon sa nature. Il peut former un réseau cristallin, rester amorphe, ou bien encore vitreux [8].

Du fait que ces transformations d'états concernant le solvant et le soluté n'interviennent pas simultanément, mais l'une après l'autre, induit un *stress* physico-chimique pour le soluté par concentration de ce dernier ainsi qu'un *stress* physique du à la cristallisation de l'eau. Ces éléments permettent d'aborder le **caractère critique** de la phase de congélation qui incite à suivre de près les évolutions d'états du produit pour éviter toute détérioration.

La dessiccation primaire démarre alors, lorsque le matériel congelé est placé sous vide et est progressivement chauffé à la température T_{im} , **température de fusion commençante**, ceci dans le but d'apporter suffisamment d'**énergie** pour sublimer la glace. L'objectif de la sublimation est d'éliminer l'ensemble de **l'eau libre** présente dans le produit.

La diminution de pression et l'apport d'énergie sous forme de chaleur permettent le transfert de la vapeur d'eau du produit vers la chambre de lyophilisation, puis vers le condenseur. Ce dernier par sa température très basse piège les molécules d'eau sublimée. Durant cette étape, les paramètres de pression et de température doivent être **finement contrôlés** de manière à obtenir un taux de sublimation le plus élevé possible sans dégradation du produit. La température maximale autorisée, décrit dans la Figure 1, est la température T'_{im} .

L'ensemble des éléments composants le lyophilisateur sont décrits ci-après dans la Figure 2.

La dessiccation secondaire correspond à **l'extraction de l'eau liée**. Cette étape nécessite l'application d'un vide poussé accompagné d'une augmentation de la température. Cette étape doit être également suivi avec vigilance. Une désorption trop importante peut être défavorable au produit.

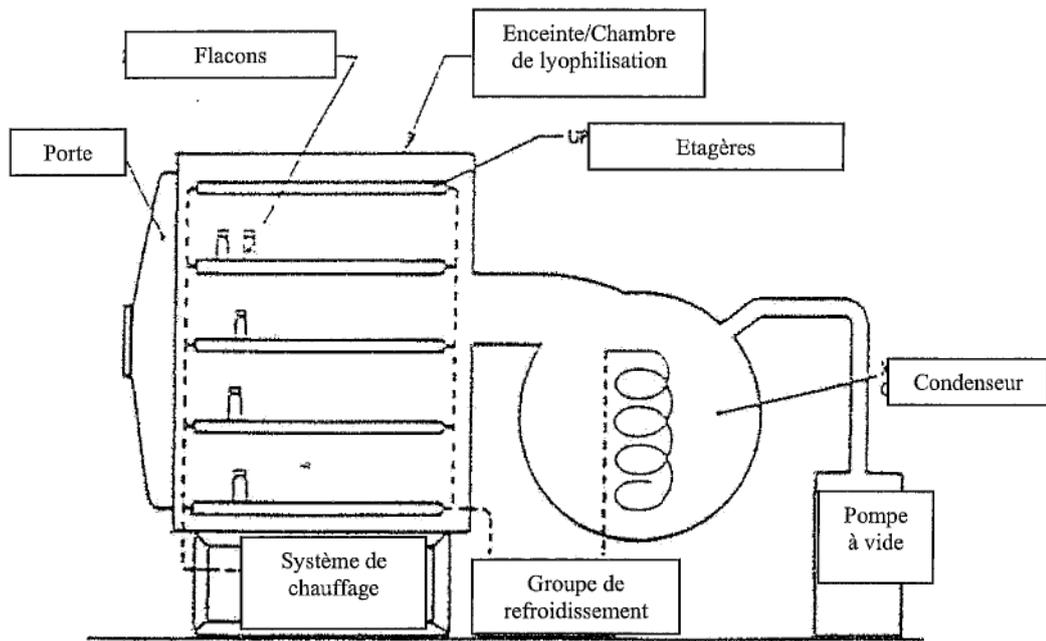


Figure 2 d'après Nail [8]. Schéma d'un lyophilisateur classique. L'eau sublimée passe de l'enceinte de lyophilisation vers le condenseur.

Partie 1.2.1 : La congélation

L'objectif de l'étape de congélation est d'immobiliser le produit dans un état solide et de fixer la structure poreuse adéquate pour permettre la sublimation. Cette étape est l'un des éléments les plus critiques du procédé parce que les **composantes chimiques et morphologiques** de la solution congelée peuvent affecter de manière importante : non seulement la vitesse de dessiccation primaire, mais aussi les propriétés du lyophilisat final. Ces composantes sont elles mêmes dépendantes de la manière dont la température de solidification a été atteinte [7].

Pour comprendre ces effets, il est nécessaire de les dissocier et de présenter en premier lieu l'étape de cristallisation de l'eau puis, en second lieu, la solidification du soluté avec les différents états que ce dernier peut revêtir.

Partie 1.2.1.1 : Cristallisation de l'eau

En diminuant la température du produit, l'eau liquide va se transformer en cristaux de glace, ce changement d'état est précédé d'un phénomène de **nucléation**. Au degré de nucléation correspond un degré de **surfusion** qui est équivalent à la différence de température entre la température théorique d'équilibre de formation de la glace et la température à laquelle la glace se forme réellement [9]. La notion de surfusion est importante notamment pour aborder la **morphologie** des cristaux de glace. En effet, plus le degré de surfusion est important, plus la taille des cristaux est petite et, comme cela sera développé ultérieurement, plus la vitesse de dessiccation primaire est ralentie.

Par l'augmentation des cristaux de glace au fur et à mesure de la congélation, le soluté se concentre impliquant : une augmentation de la force ionique et, dans la plupart des cas, des variations de pH. Ces événements peuvent entraîner une **détérioration** du produit par accélération des réactions de second ordre par exemple, comme développé par Hatley et *al* [10].

Il est à noter que dans certains cas, très rares dans le domaine pharmaceutique, la cristallisation du soluté peut précéder celle du solvant, ceci est liée à la diminution de la solubilité causée par la diminution de la température [8]. Ce cas n'est pas courant. En général, après cristallisation de l'eau, le soluté cristallise ou bien reste amorphe et/ou forme un verre. Dans certains cas, plus rares, le composé amorphe peut former un verre instable ou un cristal liquide, comme décrit ci-après.

Partie 1.2.1.2 : Solidification du soluté

➤ Système eutectique :

C'est le cas le plus simple. La cristallisation du soluté à partir de la solution concentrée forme un système eutectique. Pour décrire ce phénomène, il est plus aisé de se référer à un

exemple : celui d'une solution de glycine dans l'eau présenté dans la Figure 3. Avant congélation, le solvant et le soluté sont en solution (point a). Lorsque le mélange atteint le point b, point d'équilibre de congélation, et dès lors qu'il n'y a pas de surfusion, l'eau congèle. S'il y a surfusion, l'eau se congèle en dessous du point d'équilibre de congélation, point c. La congélation de l'eau est un phénomène exothermique, la **libération de chaleur** se traduit par une augmentation de température du produit.

Note :

- *Seule la cristallisation au niveau du point C est représentée sur le schéma.*
- *La droite entre 0 et le point eutectique correspond à l'ensemble des points de température d'équilibre de congélation de l'eau en fonction de la concentration en glycine.*

La cristallisation de l'eau progresse et l'évolution de la concentration du soluté suit la droite O-Eutectique jusqu'à l'eutectique qui correspond au niveau **maximum de concentration** du soluté. La concentration de glycine est alors de 12 % et la température est de -3.6°C . Ce passage se traduit par la **cristallisation du soluté**. En dessous de cette température, le mélange est totalement solidifié.

La recherche de la température eutectique représente un intérêt majeur pour mener à bien le cycle de lyophilisation. Tout d'abord elle correspond à la température à atteindre en congélation, la température de solidification totale (T_{cs}) ; Mais également la température maximale tolérée en sublimation, la température de perte de structure (T_{im}). Sera vu ultérieurement que ces températures, selon que le produit soit en cours de congélation ou en cours de réchauffement, peuvent différer, ce qui explique les différences de valeurs entre T_{cs} et T_{im} clairement visualisées sur la Figure 1.

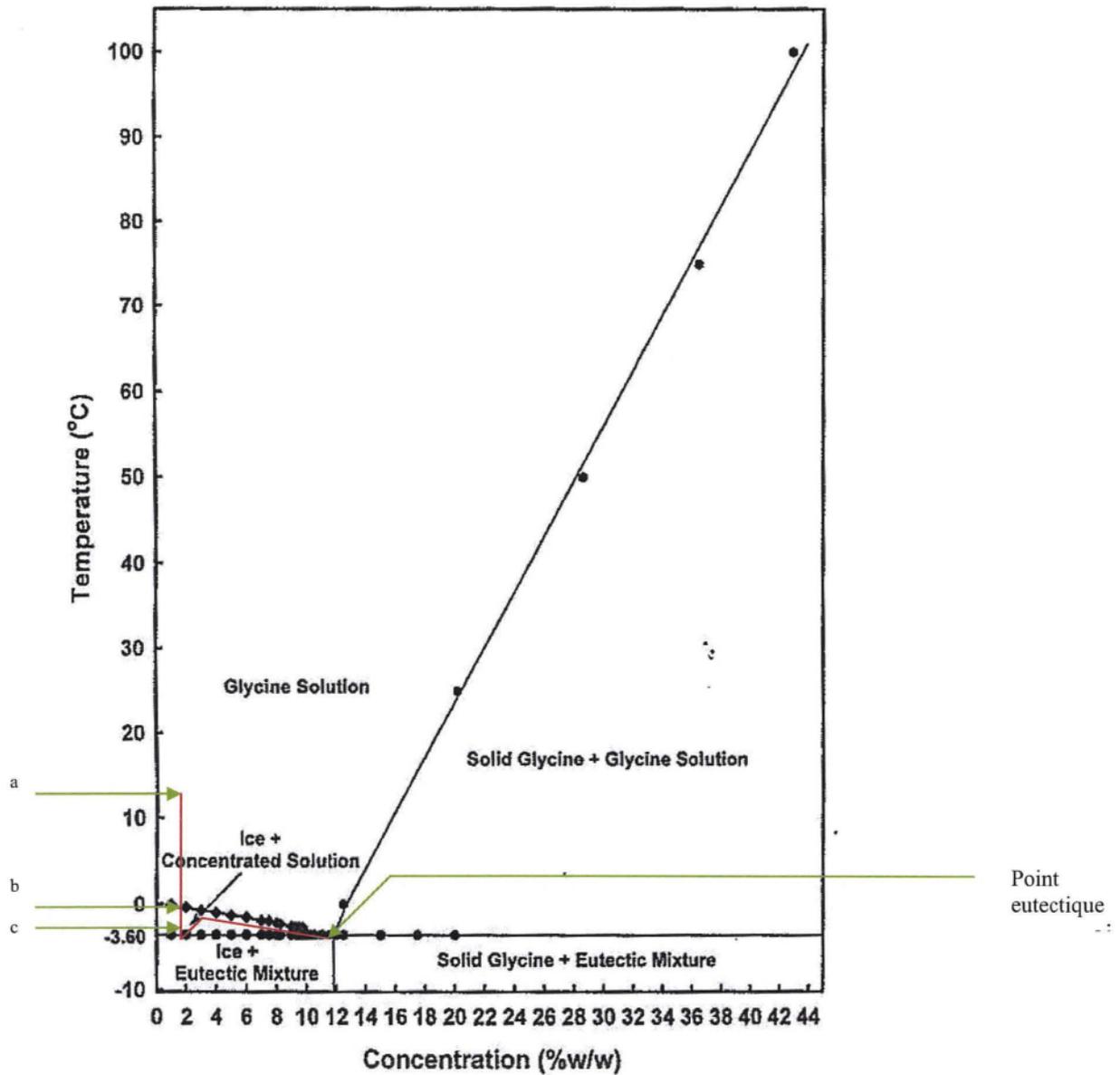


Figure 3 : diagramme de phase glycine/eau d'après Nail *et al* [8]. Point a = coordonnées température et concentration de la solution de départ, point b = coordonnées température et concentration pour la cristallisation de l'eau sans surfusion, point c = coordonnées température et concentration pour la cristallisation de l'eau avec surfusion, point eutectique = coordonnées température et concentration pour la cristallisation du soluté.

➤ Verre

De nombreux solutés ne cristallisent pas pendant la congélation. Dans ce cas, le comportement du mélange se déroule comme décrit dans le schéma présenté en Figure 4.

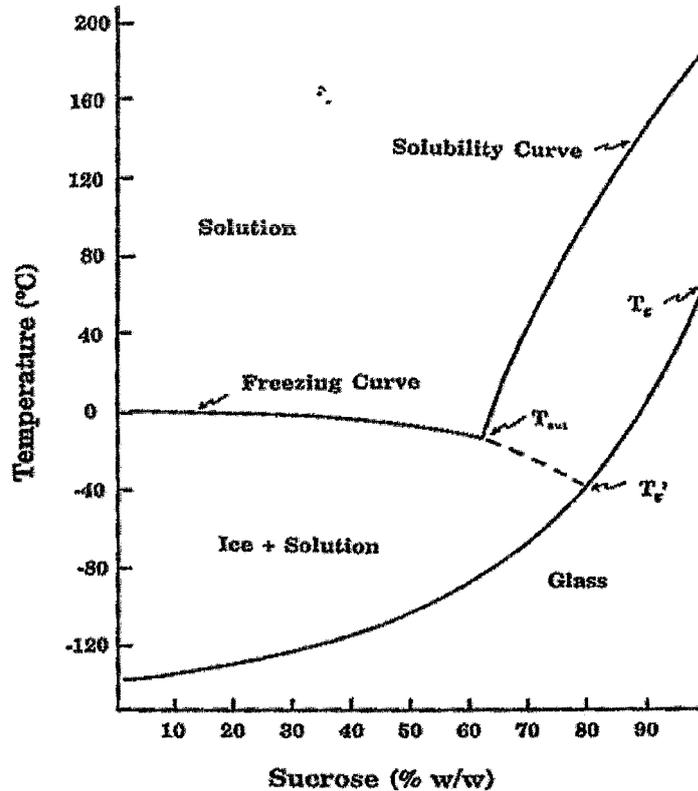


Figure 4 : diagramme de phase saccharose/eau d'après Nail *et al* [8]. T_g' = température de transition vitreuse qui correspond à la concentration maximale de saccharose en solution, T_g = température de transition vitreuse sur produit sec, T_{eut} = température eutectique

Comme dans le cas d'un eutectique, l'eau cristallise, selon la concentration de la solution de départ à la température d'équilibre de congélation de l'eau, représentée par la courbe de congélation. Cette observation est valable s'il n'y a pas surfusion, dans le cas contraire l'eau cristallise en dessous de la courbe. A contrario du système eutectique, le soluté ne cristallise pas à la température eutectique. Il continue à se concentrer en suivant la droite $T_{eut}-T_g'$. Les cristaux de glace continuent ainsi à se développer et le soluté atteint sa concentration maximale à la température T_g' (température de transition vitreuse du soluté à sa concentration maximale). A cette température le soluté visqueux se transforme en verre. Ce changement d'état est réversible. Cette réaction est endothermique.

La **température de transition vitreuse**, T_g' , représente une valeur d'intérêt puisque généralement admise comme la température à atteindre lors de la congélation (T_{cs}), mais

également le point au delà duquel le produit peut perdre sa microstructure, s'affaisser (T_{im}). De la même manière que présenter pour les systèmes eutectiques, ces températures, T_{cs} et T_{im} , peuvent différer selon si le produit est en cours de congélation ou en cours de réchauffement.

Comme représenté sur le diagramme, lorsque le saccharose est sec, la température de transition vitreuse, qui correspond à la T_g , peut être fortement diminuée par une élévation de la teneur en eau. Ce phénomène correspond à l'effet **plastifiant** de l'eau. Il sera développé ultérieurement dans le chapitre portant sur la stabilité. Pour éviter toute confusion : la température de transition vitreuse T_g représente communément la température de transition vitreuse pour les produits secs et T_g' la température de transition vitreuse des solutions.

Le verre a la propriété en cours de réchauffement de changer d'état : il évolue de l'état vitreux solide à l'état vitreux liquide (cf. Figure 5). Cette modification est appelée **transformation vitreuse** et s'accompagne d'une augmentation de volume et de chaleur spécifique pour le produit. Ce phénomène est complètement **réversible** [11].

➤ Autres types de comportement :

Formation vitreuse instable :

D'autres types de structures peuvent être observées lors de la phase de congélation, comme la formation vitreuse instable. Lors du réchauffement d'un verre comme décrit dans le paragraphe précédent, le verre passe de l'état solide à l'état liquide. Dans certains cas ce changement d'état peut rendre le verre **hautement instable** et celui-ci va chercher à atteindre un niveau de stabilité meilleure qui correspond à une structure de volume moins

important et de chaleur spécifique moindre. Cette évolution correspond à la **crystallisation du verre** (cf. Figure 5). Ce phénomène exothermique, appelé **dévittrification**, est **irréversible**, comme décrit. Le verre peut cristalliser totalement ou partiellement.

Cette transformation peut être provoquée volontairement dans le cadre de traitement thermique et participe à la formation du système de recuit qui sera détaillé ultérieurement.

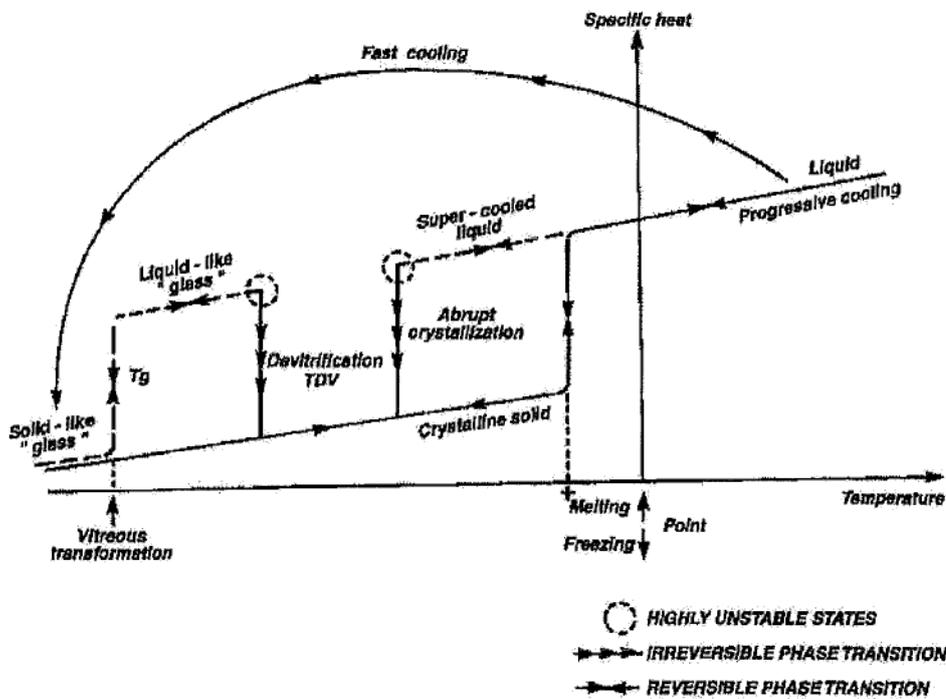


Figure 5 d'après L. Rey [1]. Description des changements d'états que peut revêtir un soluté amorphe. La chaleur spécifique est considéré comme un «marqueur».

Formation d'un cristal liquide

L'apparition d'une structure cristalline liquide est peu courante. Elle correspond aux produits de structures intermédiaires entre un produit amorphe et un produit cristallin. Les cristaux liquides sont d'une manière générale, répartis dans deux catégories : d'une part, les cristaux *thermotropiques*, c'est-à-dire formés sous l'action de la chaleur, et d'autre part, les cristaux *lyotropiques* qui sont formés par l'action d'un solvant dans un solide [8]. Seule cette deuxième catégorie peut être obtenue par lyophilisation. Les composés qui forment les cristaux liquides lyotropiques possèdent une surface active et une structure plus

ordonnée que celle d'une micelle. Ce haut degré d'organisation est obtenu grâce à l'étape de congélation par la concentration. Herman et Al (1994) ont reporté la formation d'un cristal liquide de méthylprednisolone succinate de sodium ; et ont mis en évidence, grâce à des études de stabilité que dans certains flacons, le composé cristallisait avec le temps [12]. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour savoir si le composé cristallise à partir d'une phase cristalline liquide déshydratée ou bien si la phase cristalline liquide se convertit dans un premier temps en produit amorphe pour donner par la suite un solide cristallin.

Partie 1.2.1.3 : Maîtrise des paramètres de congélation:

➤ Vitesse de congélation

La vitesse de congélation influe sur la **taille des cristaux** d'eau par une modification sur le degré de surfusion et indirectement sur la vitesse de dessiccation primaire. Plus le degré de surfusion est important plus la taille des cristaux est petite et plus la vitesse de dessiccation primaire est lente.

Il a été démontré qu'une vitesse de congélation plus élevée entraîne un degré de surfusion plus important. Cela étant dit, Searles et al (2001) ont démontré que le paramètre réel était non pas la vitesse de congélation, mais la **température de nucléation** et la **température de cristallisation**. Plus la température de nucléation est basse, plus la taille des cristaux est petite. Plus la nucléation et la cristallisation sont espacés dans le temps plus la taille des cristaux est également petite.

Les différents moyens utilisés pour congeler le produit influent également sur le degré de surfusion : congélation par immersion dans l'azote liquide (-80°C), étagère des lyophilisateurs déjà pré refroidies, congélation par vitesse de refroidissement contrôlé (méthode classique). La congélation brusque dans l'azote liquide entraîne le degré de

surfusion le plus élevé avec un gradient thermique important. Tandis que l'utilisation des étagères pré refroidies permet d'obtenir un faible degré de surfusion, mais par contre une grande hétérogénéité dans le degré de surfusion inter-flacons.

➤ **Température et temps de congélation**

Après congélation, le produit doit être dans un état solide cela signifie que le produit doit atteindre, selon ses propriétés, une température en dessous de la température eutectique pour les solutés qui cristallisent ; et une température en dessous de la température de transition vitreuse pour les produits qui se transforment en verre, cette température correspond à la **température de solidification totale**, T_{cs} . Mais cela requiert également que le produit reste un **temps suffisant** à cette température pour que le changement d'état soit terminé et cette durée est fonction du volume de répartition dans le flacon [13].

Partie 1.2.1.4 : Traitement thermique

Le traitement thermique appelé également recuit, est une méthode appliquée pour améliorer les propriétés du produit à l'égard de sa sublimation et sa conservation. Elle consiste à porter un **produit amorphe** se transformant en verre à une température inférieure à T_g . Puis dans un deuxième temps à amener le produit à une température supérieure à T_g . Le produit amorphe passe alors de l'état solide vitreux à l'état liquide vitreux. Ceci à plusieurs conséquences :

- Si le soluté est cristallisable : le produit à l'état liquide vitreux est métastable. Il va donc chercher à **cristalliser** pour atteindre un niveau de stabilité plus important. Ceci correspond à la dévitrification (cf. Figure 5).

- Dans tous les cas : le produit perd sa microstructure initiale par fusion partielle des cristaux de glace et évolue vers une structure avec des **cristaux de glace de taille plus importante**.

Pour faire suite au palier thermique, le produit est porté de nouveau à une température inférieure à T_g , pour une resolidification totale et le cycle de lyophilisation reprend alors son cours.

Le premier état concerne uniquement les produits cristallisables, et a pour but de provoquer la cristallisation d'un produit qui n'a pas eu lieu lors de la congélation initiale. Cette étape permet de s'affranchir d'une cristallisation imprévue qui pourrait se former au cours du cycle de lyophilisation ou en cours de stabilité et qui pourrait avoir des conséquences dommageables sur le produit.

Le deuxième évènement est recherché pour améliorer la structure interne du produit en augmentant la taille des cristaux de glace et permettre ainsi une vitesse de sublimation plus rapide.

La taille des cristaux de glace n'est donc pas uniquement déterminée lors de l'étape de nucléation, mais peut également être maîtrisée lors d'un traitement par recuit [14].

Il est cependant important de noter que de récentes études menées par Lu et Pikal (2004) ont infirmé le bénéfice du traitement thermique sur la vitesse de dessiccation primaire. En effet, la formule testée dans l'étude à base de mannitol et traitée par traitement thermique, comparée à une formule sans traitement thermique, a une durée de dessiccation nettement plus longue. Ils ont observé que la structure cristalline du mannitol, uniquement obtenu avec le cycle intégrant un traitement thermique, constituait un maillage serré de molécules et limitait le passage des molécules d'eau.

Partie 1.2.2 : La dessiccation primaire

La dessiccation primaire constitue l'étape **la plus longue** du procédé de lyophilisation. Cette étape démarre dès l'augmentation de la température des étagères et la diminution de la pression. Durant cette étape, l'ensemble de l'eau non-liée sublime. La vapeur d'eau est éliminée en passant à travers la matrice poreuse du produit partiellement sec. Le produit évolue selon la structure décrite dans la Figure 6.

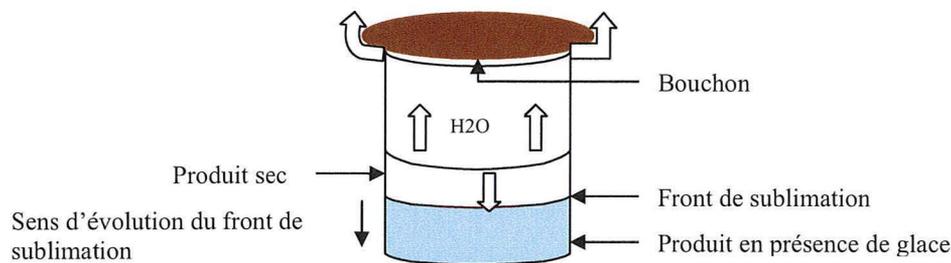


Figure 6 : Schéma d'évolution du front de sublimation en cours de dessiccation primaire

Le front de sublimation évolue horizontalement en s'enfonçant dans le produit, laissant derrière lui une matrice poreuse sèche. Cette évolution est caractéristique des produits pharmaceutiques

Partie 1.2.2.1 : Transfert de chaleur – transfert de masse

Pour permettre le phénomène de sublimation, le procédé apporte de l'énergie sous forme de chaleur au niveau des étagères, cette chaleur est transférée des étagères au produit. La température appliquée aux étagères pour cela est fonction de la température de fusion du soluté. La température maximale autorisée est la température T_{im} , qui correspond à la température de fusion interstitielle. Cette température mesurée en cycle de réchauffement n'équivaut généralement pas à la température de solidification abordée précédemment (T_{cs})

mesurée en congélation, mais est légèrement supérieure, comme le montre l'hystérésis sur les courbes de réchauffement et refroidissement du produit sur la Figure 7.

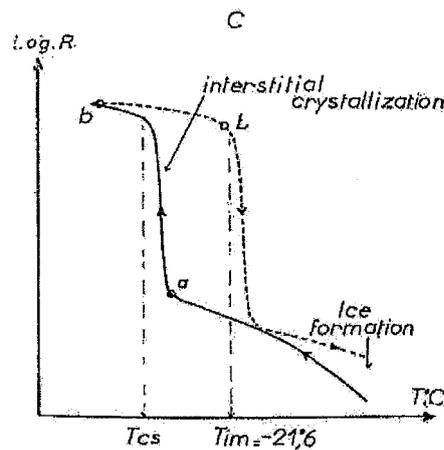


Figure 7 d'après L.Rey [15] : Evolution de l'impédance électrique en fonction de la température. En cours de refroidissement le mélange est considéré solidifié quand sa valeur en log R est élevée (T_{cs}). En cours de réchauffement ce même mélange est considéré comme fondu lorsque son impédance (log R) chute brutalement (T_{im})

Le transfert de chaleur est lié à la sublimation suivant l'équation ci-dessous :

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \cdot \frac{dm}{dt} \quad (1)$$

ΔH_s correspond à la chaleur de sublimation de la glace, dQ/dt correspond au taux de transfert de chaleur et dm/dt correspond au taux de sublimation (g/h).

Mais pour mieux comprendre les événements, il est important de rappeler les trois modes de transfert de chaleur :

- **transfert par conduction** : ce transfert est réalisé par transmission de l'agitation moléculaire de proche en proche dans le matériau ou d'un matériau à l'autre. La loi fondamentale du transport de chaleur par conduction, la loi de Fourier, a pour expression :

$$\Phi = -k \cdot dT / dZ \quad (2)$$

Φ représente le flux de chaleur (W.m^{-2}), dT/dZ représente le gradient local de température (K.m^{-1}), et k est le coefficient de conductivité thermique du milieu de transmission ($\text{W}^{-1}.\text{K}^{-1}$). Il est également important d'introduire la notion de résistance thermique définie comme l'inverse de la conductance.

- **transfert par convection** : il correspond à un échange de chaleur entre un solide et un fluide (liquide-gaz) en mouvement. Le flux de chaleur transmis entre une paroi à température T_1 et un fluide à température T_2 par convection peut s'écrire sous la forme suivante (Loi de Newton):

$$\Phi = h_c S(T_1 - T_2) \quad (3)$$

ou h_c représente le coefficient d'échange par convection (unité $\text{W.m}^{-2}\text{K}^{-1}$), et S la surface d'échange (m^2). On définira de la même façon que précédemment la résistance thermique comme l'inverse du coefficient de convection.

- **transfert par radiation** : c'est un transfert de chaleur par radiation électromagnétique. Il dépend, dans le lyophilisateur, du ratio : surface de la chambre de lyophilisation / surface des parois du lyophilisateur. L'équation de transfert de chaleur par radiation peut s'exprimer sous la forme (Loi de Newton) :

$$\Phi = h_r S(T_1 - T_2) \quad (4)$$

h_r représente le coefficient de transmission de chaleur par rayonnement (unité $\text{W.m}^{-2}\text{K}^{-1}$). La résistance thermique est également égale à l'inverse de la transmission de chaleur par rayonnement.

L'ensemble de ces trois phénomènes intervenant lors de la dessiccation sont schématisés dans la Figure 8.

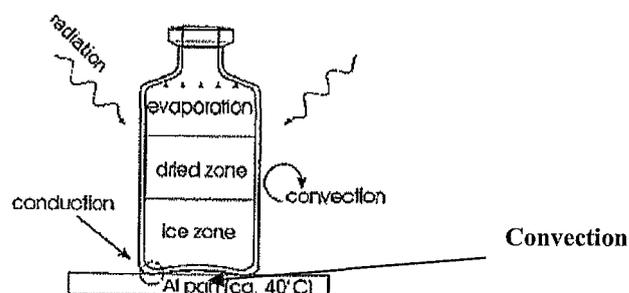


Figure 8 d'après Thurk *et al* [16] décrivant les différents transferts de chaleur impliqués dans la dessiccation

Le transfert par conduction peut-être optimisé en sélectionnant le flacon qui offrira la meilleur surface de contact tout en possédant une épaisseur de verre la plus fine possible [17], c'est-à-dire le **minimum de résistance**.

Pikal, Roy *et al* [18] ont mis au point un procédé expérimental qui permet de classer les flacons selon leur **capacité** à transférer la chaleur. Pour cela, ils ont mesuré le taux de sublimation dm/dt pendant un temps donné et en ont déduit le taux de transfert de chaleur par l'équation citée en (1), ainsi le coefficient de transfert de chaleur du flacon peut être calculé par l'équation suivante :

$$\frac{dQ}{dt} = A_v.K_v.(T_s - T_b) \quad (5)$$

A_v est la surface externe de la base du flacon , K_v est le coefficient de transfert de chaleur (cal/h.cm².K), T_b correspond à la température du produit et T_s à la température de l'étagère. Ceci souligne l'importance du **choix du conditionnement primaire** sur l'étape de dessiccation primaire.

Le transfert de chaleur par radiation dépend pour beaucoup du lyophilisateur, comme souligné précédemment.

Concernant le transfert par convection, il dépend de la **pression** dans l'enceinte. Une faible pression limite la conductivité des gaz dans l'enceinte. L. Rey et Rieutord [11] ont développé un procédé **d'injection d'air** contrôlée dans l'enceinte de lyophilisation en

début de dessiccation primaire. Cette injection de gaz incondensable, simultanément à l'augmentation de la température des étagères, entraîne une augmentation de la pression et par conséquent une augmentation de la conductivité thermique des gaz. En conséquence, la température des produits augmente beaucoup plus rapidement quand on la compare à la augmentation des flacons provoqués par la seule variation de la température des étagères. Mais une augmentation trop importante de la pression serait néfaste à la deuxième composante de la sublimation qui repose sur le **transfert de masse** des molécules d'eau du produit vers le condenseur. Ce transfert est lié à la pression selon l'équation suivante :

$$\frac{dm}{dt} = \frac{P_{ice} - P_c}{R_p + R_s} \quad (6)$$

dm/dt correspond au taux de sublimation (g/h), P_{ice} est la pression de vapeur de la glace au niveau de l'interface de sublimation, P_c est la pression partielle appliquée dans la chambre du lyophilisateur, R_p et R_s représente la résistance, respectivement du produit et du bouchon, au transport de la vapeur d'eau. Dans cette relation, plus la pression de l'enceinte est basse, meilleur est le transfert de masse. La sélection d'une pression optimale implique donc de prendre en considération les deux éléments : le transfert de masse et le transfert de chaleur. Ceci permet d'obtenir une sublimation la plus élevée possible.

Partie 1.2.2.2 : Résistance du produit

Concernant la résistance du produit au passage des molécules d'eau, cette dernière est liée à leurs morphologies. Elle dépend, pour l'essentiel, du déroulement de l'étape de congélation.

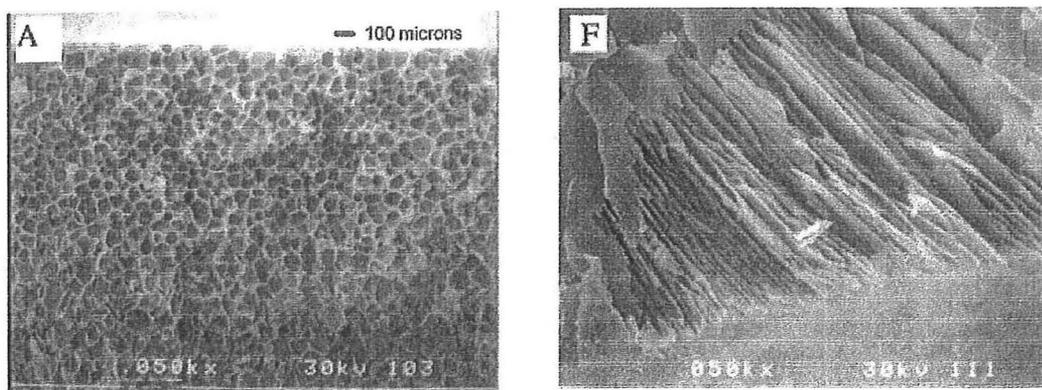


Figure 9 d'après Searles *et al* [9] : photographie de lyophilisats observés en microscopie électronique, coupe verticale (x50). Produit en A : température de nucléation basse, produit en F : température de nucléation élevée

La Figure 9 met en exergue les contrastes de structures obtenues entre deux lyophilisats de même nature dont la température de nucléation est différente. Le produit en A (structure sphérulétique) obtenue avec une température de nucléation basse offre une grande résistance au passage de la vapeur d'eau. Ceci est du à sa matrice spongieuse composée de pores entourées d'une structure limitant le passage de la vapeur d'eau et augmentant donc la résistance. Cette structure se forme avec un haut degré de surfusion. Elle est caractéristique des congélations avec formation de petits cristaux de glace.

Le produit en F, obtenue avec une température de nucléation élevée a une structure dendritique avec de larges « cheminées » tournées vers la surface du lyophilisat qui permettent un passage aisé de la vapeur d'eau. Cette structure est caractéristique d'un faible degré de surfusion.

Partie 1.2.2.3 : Résistance du bouchon

La résistance du bouchon au passage du flux de vapeur d'eau est un facteur de relativement moindre importance, mais il n'est cependant pas négligeable. Cette résistance est fonction

du *design* du bouchon. Dans la Figure 10, sont présentés trois formes de bouchons différentes qui limitent plus ou moins le passage du flux de vapeur d'eau.

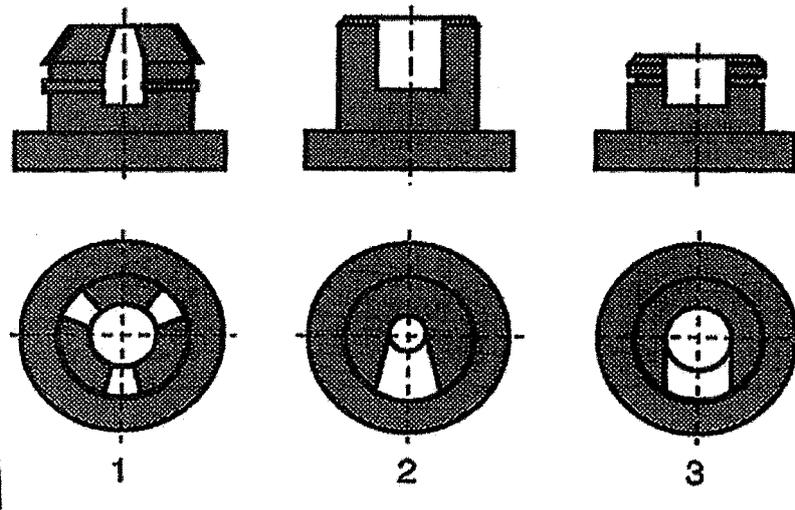


Figure 10 d'après Willemer [17]. Influence de la forme des bouchons sur le procédé de lyophilisation. Le pourcentage de glace sublimée en 3 heures à la même température est de (en considérant le 100% avec flacons sans bouchons), le bouchon 1 : 77%, le bouchon 2 : 75%, le bouchon 3 : 66%.

De Grazio a conclu, lors d'une étude de comparaison de bouchons, que le flux de vapeur dépendait tout autant de la surface que de la géométrie de l'espace offert au passage du flux de vapeur. Il a défini la combinaison qui permettait d'obtenir le minimum de résistance. Elle correspond à un bouchon dont la hauteur de l'ouverture est égale à sa largeur [19].

Le point final de dessiccation primaire est signé par l'**absence de glace** dans le flacon, cette dernière s'est entièrement sublimée. L'énergie nécessaire à cette opération apportée sous forme de chaleur est donc désormais disponible. La température du produit rejoint donc la température des étagères. La nature des gaz dans la chambre de lyophilisation évolue de la vapeur d'eau vers l'air ou azote selon le gaz utilisé.

Partie 1.2.3 : La dessiccation secondaire ou désorption

Cette étape correspond à l'extraction progressive des molécules d'eau liée à une température supérieure à 0°C.

Immédiatement après l'étape de dessiccation primaire, le produit a une teneur en eau qui fluctue généralement entre 5% et 20%. L'objectif de l'étape de dessiccation secondaire est de réduire cette humidité à un **niveau optimal** pour assurer la stabilité du produit. Cette teneur optimale dépend de la nature du produit [13]. Ceci ne peut-être atteint qu'avec la conjonction de deux facteurs : une température des étagères plus élevée quand on la compare à la température appliquée en dessiccation primaire, et une pression relativement basse. Concernant le paramètre température, lors de la première partie de la désorption, les étagères doivent être chauffées à une vitesse suffisamment lente pour éviter tout risque de perte de structure des produits amorphes. Il est nécessaire de rappeler qu'étant donné les teneurs en eau élevées à ce stade du cycle, les températures de transition vitreuse sont relativement **basses** (cf. Figure 4). Par contre il n'est pas nécessaire d'appliquer la même prudence avec les produits cristallins.

Pikal et *al* ont étudié la cinétique de séchage en fonction de la température et de la pression. ils ont observé que la teneur en eau diminue rapidement pendant les premières heures pour atteindre ensuite un plateau, et que le niveau du plateau diminue de façon conséquente avec une température des étagères plus élevée [20]. Ils ont noté que plus la surface spécifique du produit est élevée, plus la désorption est rapide. C'est exactement le contraire lors de la dessiccation primaire. Par contre, une diminution importante de la pression n'implique pas une augmentation significative de la désorption [20].

Il est important de rappeler qu'une faible teneur en eau résiduelle ne garantit pas automatiquement la stabilité du produit traité. Dans certains cas le formulateur devra

atteindre une teneur intermédiaire qui assurera une stabilité optimale. L'existence d'un optimal implique la réalisation de nombreux essais [13].

En fin de dessiccation secondaire, en fonction de la sensibilité du lyophilisat vis à vis de l'eau et/ou de l'oxygène lors de sa conservation, la pression dans la chambre est amenée à la pression atmosphérique avec de l'air sec ou un gaz inerte. Dans la plupart des cas l'azote est utilisé, plus rarement l'argon, l'hélium ou le dioxyde de carbone. Les flacons sont ensuite bouchés sous pression atmosphérique ou sous pression partielle, c'est-à-dire 900 mbar.

Partie 1.3 : Stabilité du lyophilisat

Il est pertinent d'aborder cette partie parce que : d'une part elle est directement reliée au contrôle du cycle de lyophilisation et d'autre part, elle fait l'objet de nombreuses et récentes publications. Cet exposé ne vise pas à exposer de manière exhaustive l'ensemble de travaux publiés à ce sujet, mais essayera de résumer et d'explicitier les principales opinions qui se dégagent de la bibliographie.

Le point de départ qui lie la majorité de ces travaux entre eux est l'étude de la **mobilité moléculaire** des produits lyophilisés sous forme amorphe, puisque presque toute **réaction de dégradation** nécessite un degré de mobilité pour sa mise en route à une vitesse significative. Pour rappel, un composé à l'état amorphe est dans un état physique métastable de haute énergie, les molécules au cours du temps vont évoluer vers un état stable de plus basse énergie et de plus haute densité. Ceci signifie que les molécules vont soit cristalliser, soit se diriger vers un état d'équilibre de liquide supercongelé de basse énergie. Cette modification d'état est appelé **relaxation structurale** et se traduit : par une libération de chaleur définie par **l'enthalpie de relaxation**, et une diminution de volume

ceci durant une période t définie comme le **temps de relaxation structurale** [21]. Le degré de mobilité moléculaire est inversement proportionnel au temps de relaxation moléculaire. A partir de ces connaissances, l'intérêt d'investigations complémentaires a porté sur la recherche de la **température de conservation optimale**, c'est-à-dire la température à laquelle la mobilité moléculaire est minimale. Certains travaux ont assumé que la mobilité de la molécule était exclusivement reliée à la **viscosité** de la solution. Ainsi, sachant qu'un produit amorphe à l'état vitreux a un degré de viscosité élevé (10^{13} poises), par voie de conséquence, le degré de mobilité devenait insignifiant. Par extension, tout produit conservé à une température inférieure à la température de transition vitreuse serait stable. Cette hypothèse appelée *hypothèse de dévitrification* est basée sur l'équation de Stokes- Einstein :

$$D = kT / 6\pi\eta a \quad (7)$$

Dans laquelle D correspond au coefficient de diffusion (degré de mobilité), η correspond au coefficient de viscosité, k est la constante de Boltzmann et a est le rayon effectif de diffusion hydrodynamique.

Cependant de nombreux autres travaux de recherche ont remis en cause cette hypothèse considérée comme une simplification de la réalité [22]. Hancock et *al* (1995) ont étudié le comportement dynamique des molécules de produits amorphes conservés à une température inférieure à la température de transition vitreuse. Tout d'abord, ces travaux ont démontré que de nombreux matériaux possédaient un **degré de mobilité moléculaire significatif** en dessous de T_g . Donc, même si les produits amorphes à l'état vitreux ont une dynamique plus proche de celle d'un cristal que de celle d'un liquide formé au dessus de la température de fusion, un produit à l'état vitreux libère de l'énergie pour acquérir une meilleure stabilité de manière moins importante, mais significative.

De plus, cette étude a démontré que la vitesse de relaxation était plus élevée avec un différentiel de température moins important entre la température de conservation du produit et la température de transition vitreuse. De nombreuses études ont porté sur la recherche d'une fonction éventuelle reliant : **la température de transition vitreuse, la température de conservation et le degré de mobilité du produit**. Pikal et *al* en 1991 ont observé une relation linéaire entre la vitesse de dégradation et l'augmentation du rapport $T - T_g$ mais ceci à des températures de conservation toujours supérieures à la température de transition vitreuse. Cette étude a été contredite, par la suite, par de nombreux travaux plus récents ne mettant pas en relation directe la stabilité du produit avec la température de transition vitreuse et la température de conservation du produit. Ces travaux suggèrent de conserver le produit en dessous de la température de transition vitreuse de manière à obtenir une meilleure stabilité ainsi qu'une meilleure qualité visuelle. Mais il n'est pas forcément pertinent de conserver le produit à la température la plus basse possible en dessous de la transition vitreuse [23] [2]. Sur cette base, le formulateur peut améliorer la stabilité du produit en travaillant sur d'autres paramètres comme la **nature des excipients** ajoutés à la composition du lyophilisat. Les travaux de Kakumanu et Bansal ont démontré que l'ajout d'excipients tel que le polyvinylpyrrolidone (PVP) diminue considérablement la mobilité des molécules de celecoxib, anti-inflammatoires non stéroïdiens, par **effet anti-plastifiant** [17]. Le formulateur peut aussi intervenir sur **la teneur en eau** du produit. En effet, les molécules d'eau ont un **effet plastifiant** sur les molécules amorphes et elles diminuent la température de transition vitreuse du produit, comme observé sur le schéma de la figure n°2 [24]. Plus un produit est sec et plus sa température de transition vitreuse doit être élevée et sa mobilité réduite. Mais la seule évaluation de la teneur en eau d'une formulation d'un produit amorphe ne suffit pas à prédire sa stabilité et, comme développé dans les travaux de Herman et *al* (1994), le scientifique doit se soucier de la quantité d'eau

active, c'est-à-dire de la quantité d'eau réellement liée au principe actif. Par conséquent, une haute teneur en eau ne signifiera pas forcément une vitesse de dégradation plus élevée pour un produit amorphe, si cette eau est liée aux excipients par exemple.

D'autre part, la maîtrise des sources de molécules d'eau pour un lyophilisat lors de sa conservation constitue un élément important. On distingue deux sources, la première correspond au passage des molécules de l'environnement extérieur vers le flacon et elle peut être limitée en sélectionnant le meilleur couplage bouchon-flacon. La seconde voie, majoritaire dans les trois premiers mois de stabilité, est le relargage des molécules d'eau du bouchon vers le flacon. Elle peut être contrôlée en séchant au maximum les bouchons avant utilisation ainsi qu'en sélectionnant des bouchons dont la composition limite l'absorption et la désorption des molécules d'eau. Le cycle de séchage des bouchons doit non seulement éliminer les molécules d'eau en surface mais également supprimer l'humidité interne [19].

Partie 1.4 : Intérêt des excipients

L'ajout d'un ou plusieurs excipients dans la formule initiale d'un produit est motivé par différentes préoccupations. L'une des principales est **l'apport de ballast** dans la formule pour créer la masse du lyophilisat. Ils peuvent permettre l'amélioration du cycle de lyophilisation en tant que **cryoprotecteur** et **améliorer la stabilité** du produit lors de sa conservation. Enfin et d'un point de vue visuel, ils peuvent **améliorer l'aspect** du lyophilisat.

Ce sont généralement des sucres. Les plus couramment utilisés sont : le mannitol, le lactose, le saccharose, ou bien encore le tréhalose. D'autres familles de composés sont également utilisées comme les acides aminés et en particulier la glycine. De nombreuses

études ont démontré l'effet cryoprotecteur des sucres dans la lyophilisation de protéines [25], [26]. En diminuant : le risque de cristallisation, l'agrégation par séparation spatiale des composants du produit, ils pourraient agir en tant qu'agents de déshydratation en mimant les liaisons hydrogènes que réalise l'eau avec les groupements polaires du produit en solution et ceci lors des phases de dessiccation.

Lu et Pikal ont démontré qu'une formulation composée d'excipients qui cristallisent autour d'un composé amorphe, protègent l'ensemble de la matrice des risques de début de perte de structure et ceci non seulement au cours de la lyophilisation mais aussi pendant la conservation du produit en améliorant sa stabilité quand sa température excède la température de transition vitreuse. L'intérêt de maintenir ou d'apporter un excipient amorphe dans une formulation finale pour améliorer la stabilité du produit réside, dans ce cas particulier, dans le fait que la température de **transition vitreuse du mélange** dans le lyophilisat est fonction de la température vitreuse du composé et de l'excipient. Elle est exprimée par l'équation suivante :

$$T_g = \frac{w_1 T_{g_1} + K w_2 T_{g_2}}{w_1 + K w_2} \quad (8)$$

w_1 et w_2 sont les fractions de pesées de chaque composé, K est une constante et T_{g_1} , T_{g_2} sont les températures de transitions vitreuses de chaque composé.

Ceci signifie que la formulation d'un produit amorphe avec un excipient dont la température de transition vitreuse est élevée permet d'obtenir une température de transition vitreuse pour le mélange plus élevée que celle du produit seul [23, 13].

L'état amorphe permet également à l'excipient de jouer un rôle de **tampon** pour les molécules d'eau vis-à-vis du produit, si l'excipient est hautement hygroscopique. C'est le cas du lactose dans la formulation testée par Herman et al (1994) qui par son pouvoir hygroscopique relativement élevé capte les molécules d'eau et protège ainsi l'actif

pharmaceutique amorphe des réactions d'hydrolyses. Par contre, il est nécessaire de porter une attention toute particulière aux excipients conservés à l'état amorphe mais qui ont le pouvoir de cristalliser. C'est le cas notamment du mannitol ou de la glycine, qui utilisés comme lyoprotecteurs sont à l'état amorphe [27]. La stabilité d'une formulation contenant un mélange de mannitol amorphe peut être altérée par une cristallisation subite du mannitol. Ceci peut-être du à l'équilibre de vapeur entre le flacon et le lyophilisat et/ou le relargage des molécules d'eau du bouchon vers le lyophilisat entraînant une diminution de viscosité pour le mannitol et par voie de conséquence une diminution de T_g d'où la cristallisation de l'excipient. Pour obtenir un composé amorphe lors d'un cycle de lyophilisation, Kim et al (1994) ont défini que la proportion maximale au delà de laquelle le mannitol cristallise, lors d'un cycle de lyophilisation sans traitement thermique particulier, était de 30% [28].

Partie 1.5 : Equipements et méthodes permettant la mise en œuvre, le suivi et l'évaluation du cycle de lyophilisation

Un ensemble d'équipements et de nombreuses méthodes sont à la disposition des scientifiques. Seront présentés, ici, les équipements les plus fréquemment utilisés.

Partie 1.5.1 : L'analyse du comportement basse température des produits à lyophiliser

Pour la mise en œuvre d'un cycle de lyophilisation, le scientifique doit préalablement rechercher *la température de solidification du soluté* (T_{cs}) et *la température de perte de structure* (T_{im}) du mélange en solution. Pour cela différents équipements ont été développés. une présentation non exhaustive, de ces derniers, figure ci-après :

Partie 1.5.1.1 : Analyse thermique différentielle (ATD) ou analyse microcalorimétrique différentielle (DSC)

Tout changement d'état d'un produit est accompagné d'une **libération** ou d'une **absorption d'énergie** transmise sous forme de chaleur. L'analyse thermique différentielle permet de mesurer cette différence de chaleur, que l'évènement soit endothermique ou exothermique. La mesure se fait sur un échantillon solide ou liquide de 5 à 20 mg en général. Il est refroidi par azote liquide ou par refroidissement mécanique à température définie. La mesure est soit effectuée au cours d'un cycle de refroidissement, soit au cours d'un cycle de réchauffement et dans les deux cas à la vitesse désirée. La cellule compare la température de l'échantillon avec la température d'une référence. Il est généralement nécessaire de tester plusieurs vitesses de réchauffement pour obtenir le plus d'évènements possibles. Le flux de chaleur enregistré par l'analyse est exprimé par l'équation suivante :

$$\frac{dQ}{dt} = C_p \frac{dT}{dt} + f(t, T) \quad (9)$$

dQ/dt représente le flux de chaleur total (Js^{-1} ou W), C_p est la capacité de chaleur. Le terme $C_p.dT/dt$, représente **la composante réversible** du flux de chaleur, donc il décrit les évènements réversibles comme la transition vitreuse, tandis que la fonction cinétique $f(t, T)$ représente **la composante irréversible** et décrit des évènements comme la cristallisation ou bien la relaxation endothermique [29] [30]. Pour mémoire, le principal évènement exothermique est : la cristallisation, et les principaux évènements endothermiques sont : la transition vitreuse, la fusion et la relaxation de l'échantillon durant la stabilité, quelques uns de ces évènements sont représentés sur la Figure 11.

Pour observer au mieux ces évènements, deux paramètres doivent être maîtrisés : **la sensibilité et la résolution** de la méthode. Le premier est primordial pour détecter les températures de transition vitreuse. En effet l'amplitude des endothermes n'est pas toujours bien marquée. Quant à la résolution, elle doit être suffisamment bonne pour suivre les

composés cristallins car dans certains cas, les deux évènements : fusion du soluté et fusion de l'eau sont assez proches [8]. Cette technique utilisée sur produit amorphe et sec, permet également d'évaluer l'enthalpie de relaxation ainsi que la température de transition vitreuse [31].

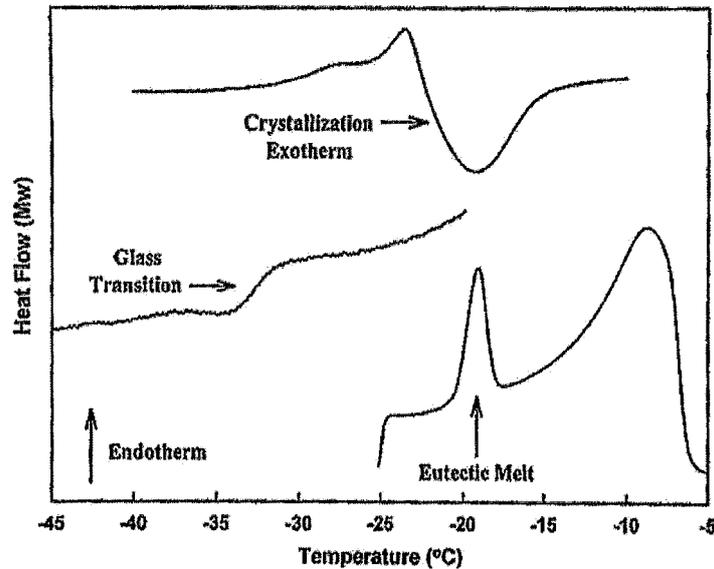


Figure 11 d'après Nails [8], représentation des évènements thermiques les plus courants observés par analyse thermique différentielle.

Partie 1.5.1.2 : Analyse microcalorimétrique différentielle modulée (MDSC)

Elle est basée sur le même principe que l'analyse décrite préalablement à la différence près que cette méthode permet de **séparer**, sur des courbes distinctes, la composante réversible irréversible et total du signal, comme montré dans la Figure 12. Dans cette technique une modulation sinusoidale de la température est superposée à un programme de température linéaire, ce qui génère un flux de chaleur également de forme sinusoidale. L'analyse de cette courbe de flux de chaleur modulé permet de séparer les effets superposés. Certains effets, comme un changement de capacité de chaleur spécifique du à une transition vitreuse, peuvent suivre ces modulations de température, tandis que d'autres évènements comme la cristallisation ne le peuvent. Les premiers correspondent aux

évènements réversibles et les seconds aux évènements irréversibles. Ainsi seuls les évènements réversibles, en phase avec ce programme, ne peuvent être lus directement. Pour dessiner le tracé des évènements irréversibles, il suffit de retrancher les évènements réversibles au tracé du flux de chaleur total, mesuré de la même manière qu'avec une DSC classique (décrite auparavant).

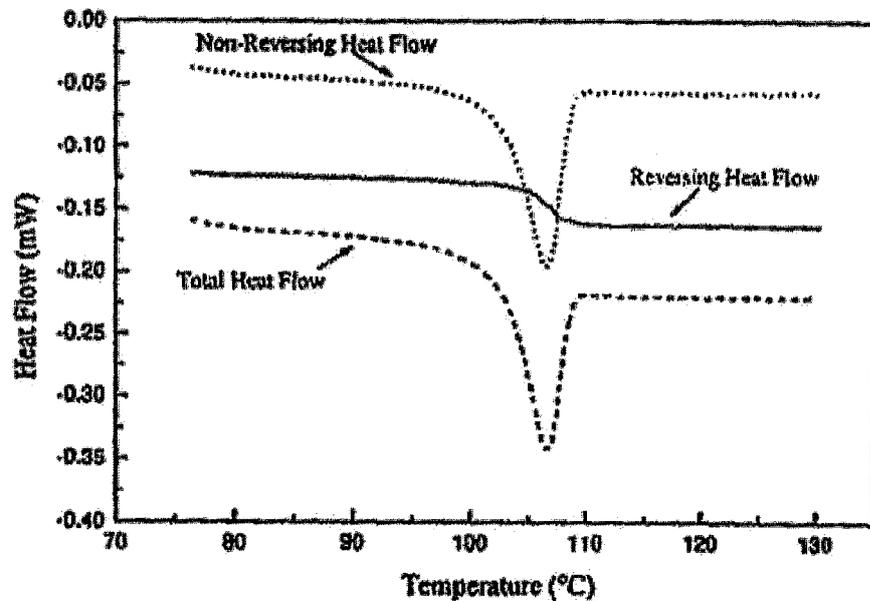


Figure 12 d'après Royall et al. [8, 30] : thermogrammes MDSC sur le saquinavir lyophilisé, montrant le signal réversible, irréversible et total du flux de chaleur en cycle de réchauffement.

Cette technique a l'avantage d'améliorer la **précision** de détermination des évènements. Par exemple la détermination de la température de transition vitreuse en DSC classique peut être masqué par le pic exothermique de cristallisation, ce qui n'est, par conséquent, pas le cas avec la MDSC.

Partie 1.5.1.3 : Analyse de l'impédance électrique

C'est une technique de mesure des propriétés électriques d'un composé congelé qui consiste à enregistrer l'impédance électrique du produit en fonction de sa température. Cette technique a été mise au point par L. Rey en 1958 [7]. Le principe sur lequel repose

cette méthode est le suivant : un produit entièrement solidifié par congélation possède une faible **mobilité de charge** et donc une résistance élevée (= impédance élevée), tandis qu'un produit réchauffé va présenter à l'approche de sa température de fusion une augmentation de la mobilité des charges et donc une diminution marquée de la résistance du produit au passage du courant. Cette technique permet de relever l'**effondrement** du produit lors de son réchauffement de manière plus précoce comparé aux techniques DSC ou DTA. [2]. Par contre, il est nécessaire de définir la fréquence qui permet d'obtenir la meilleure réponse. L. Rey (2004) conseille d'utiliser une fréquence élevée de l'ordre de 1000 Hz.

Partie 1.5.1.4 : Analyse diélectrique

Cette méthode a la spécificité de séparer les évènements thermodynamique de premier ordre, comme la cristallisation du solvant, la fusion, des évènements de second ordre, comme la transition vitreuse. Ceci est traduit par une différence de **mobilité des dipôles** lors de l'apparition de l'évènement. Pour accéder aux propriétés diélectriques, un capteur est utilisé, constitué de deux électrodes métalliques entre lesquelles est placé l'échantillon à tester. Le matériau est soumis à un champ électrique en appliquant une tension alternative à l'une des deux électrodes, l'autre étant reliée à la masse. La mesure est réalisée sur le courant circulant dans l'échantillon. Il est possible d'utiliser de **multiples fréquences** lors de l'analyse ce qui différencie, avec plus de précision, les évènements de premier ordre qui sont indépendants de la fréquence, des évènements de second ordre qui sont dépendants de la fréquence.

Partie 1.5.1.5 : Microscopie optique

Elle permet de suivre l'aspect que revêt le produit durant l'ensemble du cycle de lyophilisation par ajustement des paramètres de température et pression, directement sur le microscope. L'échantillon, quelques μl en solution, est placé sur un support qui possède une très bonne conductivité thermique, comme le quartz par exemple. L'échantillon est ensuite congelé. L'observation est réalisée avec un objectif dont le grossissement est généralement compris entre $50\times$ et $100\times$. Cette technique est principalement utilisée pour mesurer la température de perte de structure du produit. Elle peut être différente de la température de transition vitreuse mesurée en analyse thermique différentielle. Ceci permet également d'examiner l'influence de la composition formulée sur la morphologie de la glace ; mais aussi la cristallisation ou non du soluté durant la congélation ou avec un traitement thermique (recuit).

Partie 1.5.2 : L'analyse du produit sec

Comme évoqué précédemment, l'analyse de *la teneur en eau* constitue un élément primordial pour évaluer le lyophilisat obtenu avec une recette de lyophilisation précise. Cette analyse peut être réalisée par plusieurs méthodes :

Partie 1.5.2.1 : Mesure de l'humidité résiduelle

➤ Méthode Karl Fisher

L'eau est dosée par l'iode en présence de pyridine, dioxyde de sulfure et méthanol. La criticité de cette méthode repose sur les opérations où *l'échantillon est en contact avec l'air ambiant* avant analyse ; en effet si cette méthode est réalisée à l'air libre le produit va capter des molécules d'eau et ainsi la teneur en eau quantifiée sera erronée. De la même

manière, si le prélèvement est réalisé sous boîtes à gants, dans un système fermé dont l'humidité résiduelle est d'environ 15% à 20%, le produit peut sécher avant dosage. Joan C. May a décrit une méthode qui permet de limiter au maximum les temps de contact de l'échantillon avec l'air ambiant [1]. La particularité de cette méthode réside dans le fait que l'échantillon à doser n'est pas pesé avant analyse. Cela limite donc le temps de contact de ce dernier avec l'air ambiant. La manipulation est la suivante :

- le flacon est vortexé préalablement pour donner une poudre homogène
- les étiquettes sont retirées du flacon
- les flacons sont placés sous boîte à gants, et si ceux-ci ont été bouchés sous vide, le vide est rompu par introduction rapide d'air puis rebouchés.
- Les flacons sont pesés
- L'analyste prélève alors un échantillon approximativement de 20 à 30 mg qu'il introduit dans le flacon contenant les réactifs.
- Enfin le flacon est repesé de manière à déterminer la quantité exacte qui a été analysée.

➤ Analyse par gravimétrie

Cette méthode consiste à évaluer l'humidité de surface d'un échantillon et une partie de l'eau liée, ceci par **pesée** du produit avant et après séchage dans dessiccateur.

➤ Analyse par pression de vapeur

Le principe de cette analyse consiste à évaluer la pression de vapeur à l'intérieur du flacon de manière indirecte par mesure du **point de rosée** [1]. Sachant, qu'après quelques heures,

la l'humidité résiduelle libre dans l'échantillon s'équilibre avec l'humidité résiduelle libre dans l'espace libre du flacon, la mesure est réalisée dans l'espace libre sur un point très précis. Cette méthode est **non-intrusive, non-destructive**, et permet le suivi de **l'humidité résiduelle libre à l'équilibre** sur un **même échantillon**. Le flacon est disposé dans une enceinte fermée, une tige métallique est appliquée sur le flacon avec à son extrémité un miroir. Une source lumineuse est mise en direction du miroir qui réfléchit cette lumière vers un récepteur qui mesure l'intensité de la lumière réfléchi. A la température de condensation, l'eau en présence dans le flacon se condense au niveau du miroir, ce phénomène entraîne la diffusion de la lumière et l'intensité du rayon réfléchi vers le récepteur est fortement diminuée. C'est le signal qui permet d'évaluer la température de condensation. Avant la mesure, le flacon est thermostaté à une température définie par le manipulateur. Cette mesure permet notamment de suivre l'évolution de la teneur en eau dans les études de stabilité pour un même flacon, puisque cette méthode n'est pas intrusive, les flacons restent intacts.

➤ Thermogravimétrie

La thermogravimétrie permet de collecter des données plus précises par rapport aux données fournies par la gravimétrie ; ceci par **chauffage** de l'échantillon. Les échantillons disposés dans une boîte à gants sont pesés pendant le chauffage jusqu'à ce que la pesée des échantillons soit constante. La différence entre la pesée initiale et la pesée finale permet de connaître la teneur en eau dans le produit.

Partie 1.5.2.2 : Mesure BET

Un autre élément majeur à analyser est la **surface interne du lyophilisat**, cette donnée est importante pour comprendre comment se comporte le lyophilisat en présence de solvants

ou d'un gaz comme celui utilisé en fin de cycle de lyophilisation avant bouchage des flacons. Il permet également d'analyser la **microstructure** du produit et d'observer notamment pour une même formulation les différences de structures selon la vitesse de congélation définie. En appliquant la **méthode de Brunner, Emmett, et Teller (BET)**, il est possible de connaître la densité réelle du produit, sa surface spécifique, ainsi que la taille des pores [1]. L'équipement nécessaire pour réaliser la mesure est schématisé dans la Figure 13.

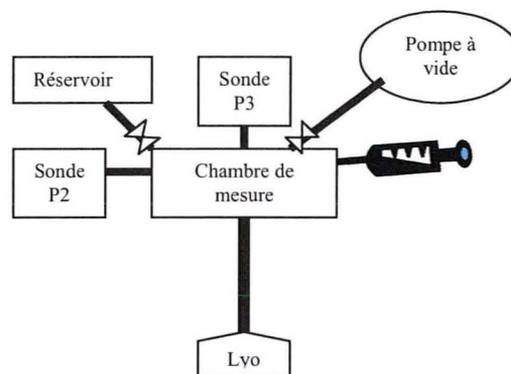


Figure 13 : Représentation schématique d'un équipement BET

La première étape, avant la mesure, consiste à récupérer le plus rapidement possible le lyophilisat, dans son intégralité, en découpant le flacon. Le lyophilisat est ensuite déposé dans une cellule spéciale, hermétique, puis pesé. Cette cellule est reliée à l'ensemble de l'équipement par une canne qui permet les échanges gazeux entre la cellule et la chambre de mesure. Les deux sondes de pression P2 et P3 (cf. Figure 13) permettent de mesurer la pression atmosphérique et la pression dans la chambre de mesure respectivement. Avant toute mesure, le lyophilisat est décontaminé, à température ambiante, de tous gaz résiduels qui pourraient être adsorbés. Cela consiste à réaliser plusieurs campagnes de mise sous vide (pompage) puis dégazage de l'échantillon successives, jusqu'à ce que la pression indiquée par la sonde P2 indique une pression $< 8.10^{-4}$ mBar/s. Démarre ensuite le calcul

de la densité par injection, grâce à la seringue, d'hélium. Cette mesure donne le volume réel de l'échantillon et non le volume apparent, qui comprend les pores. La cellule est ensuite immergée dans de l'azote liquide pour pouvoir réaliser les cycles d'adsorption et de désorption. Quand la température et la pression sont stables, des quantités connues de gaz (azote, argon, krypton) sont introduites dans la chambre de mesure pour calibrer le système avant la mesure. Enfin la cellule est de nouveau dégazée puis la mesure peut démarrer en injectant des quantités connues de gaz dans la chambre d'où est déduit la quantité de moles adsorbées de gaz par gramme de lyophilisat. Quand la saturation est atteinte, la cellule est lentement dégazée ce qui permet de définir l'isotherme de désorption, mais également la taille des pores et leur distribution dans le lyophilisat [1].

La nature des gaz utilisés pour réaliser les cycles d'absorption/désorption dépend de la surface du produit. Pour des produits de surface entre 50 m^2 et 5 m^2 , le gaz utilisé est de l'azote ; pour une surface comprise entre 5 m^2 et 0.5 m^2 le gaz est de l'argon , puis pour une surface inférieure le krypton.

En complément, il est possible d'observer par microscope la structure du lyophilisat. La **microscopie à balayage électronique** est généralement utilisée et également la **microscopie optique**.

Partie 1.5.2.3 : Analyse isothermes de sorption de l'eau

Pour compléter l'analyse des isothermes de sorption, après ceux de gaz (analyse BET) le galéniste peut étudier le comportement du lyophilisat sec selon l'humidité relative en réalisant des *études de sorption du produit vis-à-vis de l'eau*. En état d'équilibre, il est possible de décrire graphiquement la relation entre la teneur en eau et l'humidité relative à une température constante donnée, à partir d'un produit sec (isotherme d'adsorption), ou à partir d'un produit humidifié (isotherme de désorption). Ces isothermes de sorption sont

établies expérimentalement. Avant 1994, la principale technique constituait à déposer quelques grammes de l'échantillon à tester dans différents dessiccateurs dont l'humidité relative était contrôlée grâce à la présence d'une solution saturée en sels. L'ensemble des dessiccateurs pouvait couvrir un panel d'humidité relative entre 0% et 90%, et étaient placés à température constante. L'échantillon était alors régulièrement pesé jusqu'à ce que son poids soit stable (m_s). La détermination du poids sec (m_0) se faisait sur l'échantillon placé dans le dessiccateur dont l'humidité relative était de 0%. Ainsi à partir des ces données le scientifique pouvait en déduire la teneur en eau (T_{H_2O}) de l'échantillon,

$$T_{H_2O} = \frac{m_s - m_0}{m_0} \quad (10)$$

en fonction de l'humidité relative à température constante, et représenter ces résultats graphiquement.

Cette technique longtemps éprouvée était fastidieuse et longue, quelques semaines voire quelques mois étaient nécessaires. Sa bonne réalisation dépendait pour beaucoup de la rigueur du manipulateur. Une nouvelle technique a alors été développée, **Dynamic Vapour Sorption (DVS)**, système qui permet de mesurer les variations de masse d'un échantillon en fonction de l'humidité relative et en fonction du temps. La mesure se fait sur quelques heures et est entièrement automatisée. La Figure 14 représente les cinétiques de sorption mesurée sur un échantillon de cellulose microcristalline.

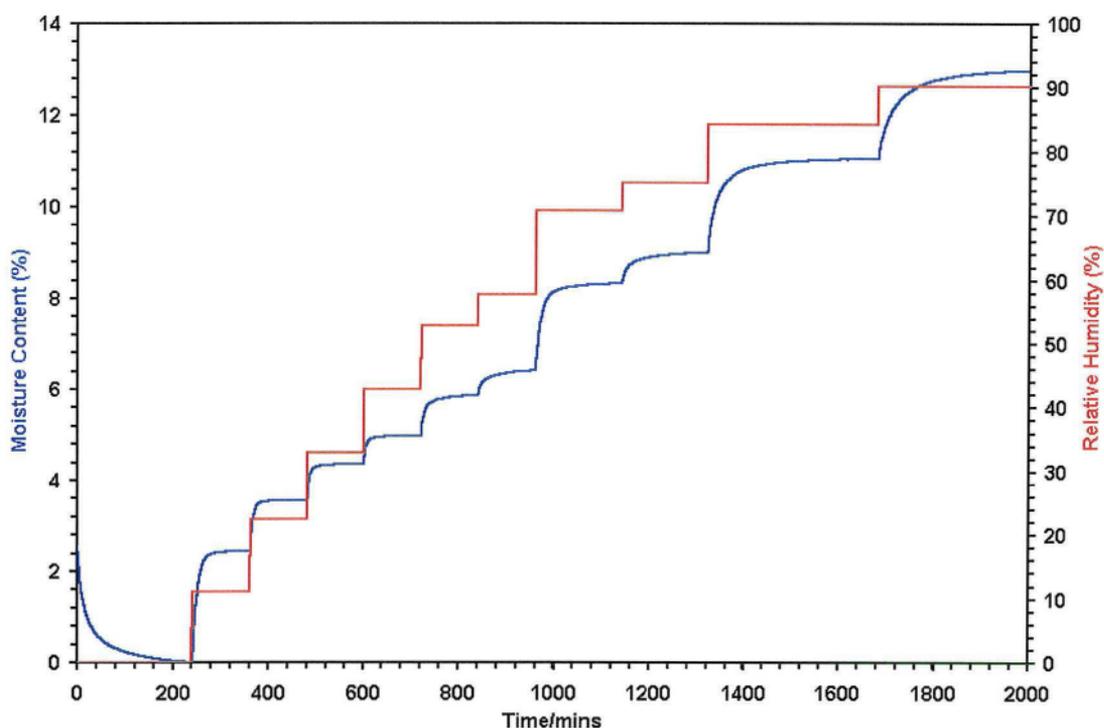


Figure 14 d'après , Cinétiques d'adsorption obtenues par analyse DVS sur 10 mg de cellulose microcristalline.

L'étude des isothermes de sorption, permet également de repérer les changements d'états du produit étudié. *Tout changement d'état du produit étudié entraîne également une modification de la sorption.*

Pour confirmer la structure, ou les structures en présence du lyophilisat, amorphes ou cristallines, le galéniste peut avoir recours à **la diffraction par rayons X**.

D'autre part **la DSC et l'ATD** sont également utilisées pour évaluer la température de transition vitreuse sur le produit sec lorsque celui-ci est un amorphe. Une autre technique beaucoup moins répandue consiste à évaluer la densité du produit en fonction de la température et ceci à humidité contrôlée. Ainsi la température à laquelle la vitesse d'évolution de densité change brusquement correspond à la température de transition vitreuse [32].

Partie 1.5.3 : Le suivi des paramètres pression et température en cours de lyophilisation

Pour compléter cet exposé des méthodes et équipements utilisés pour analyser le produit, voici une présentation des équipements qui permettent de suivre les paramètres de lyophilisation, pression et température, pendant le cycle.

Partie 1.5.3.1 : Suivi de la pression

La pression est suivie par des sondes placées à l'intérieur de l'enceinte du lyophilisateur. Il existe deux types de sondes : **les sondes Pirani et les sondes capacitives**.

- Les sondes Pirani ou sondes de conductivité thermique

La mesure est réalisée par perte de chaleur d'un filament chauffé par conduction ; la perte de chaleur est proportionnelle à la pression et est également fonction de la composition de la phase gazeuse. Cela explique les différences de pression mesurée lors de la dessiccation primaire au moment du passage phase gazeuse vapeur d'eau à phase gazeuse air ou azote.

- Les sondes capacitives

Elles mesurent directement la pression.

La stratégie d'utilisation des deux sondes en simultanée pour suivre le cycle est la suivante : la pression de la sonde capacitive reste constante tout au long de la phase de dessiccation primaire, et tandis que la dessiccation primaire se termine, la pression indiquée par la sonde Pirani diminue, par changement de la nature des gaz en présence dans l'enceinte en fin de sublimation, pour atteindre la pression indiquée par la sonde

capacitive. Ceci est un bon moyen pour déterminer **la fin de la dessiccation primaire** [33].

Partie 1.5.3.2 : Suivi de la température

Pour suivre *la température* du produit, les scientifiques ont mis aux points différentes techniques :

➤ Les thermocouples

Ils permettent de mesurer la température **directement** dans le produit. Les sondes sont installées dans la solution de départ et suivent la température du produit tout au long du procédé.

➤ Les mesures barométriques de la température pendant la sublimation

Cette méthode est basée sur la mesure de la pression de vapeur de l'enceinte qui atteint la pression de vapeur de la glace au niveau du front de sublimation [34]. Pour cela le flux de vapeur entre l'enceinte du lyophilisateur et le condenseur est interrompu. La pression dans l'enceinte augmente rapidement du au phénomène de sublimation. Mais cette sublimation cesse lorsque la pression dans l'enceinte atteint la pression de vapeur de la glace au niveau du front de sublimation et ainsi la pression dans l'enceinte se stabilise. La mesure de la pression peut alors être réalisée et de là, on peut déduire la température du produit au niveau du front de sublimation. Cette méthode nécessite un lyophilisateur dans lequel, la chambre de lyophilisation et le condenseur ne soient pas réunis dans un seul bloc, mais assemblés de manière à les isoler l'un de l'autre par un système de valves. La manipulation pour réaliser la mesure ne doit pas durer plus de quelques secondes de manière à ne pas perturber le procédé.

Partie 2 : Matériels et méthodes, résultats

Partie 2.1 : Introduction

La présente étude s'appuie sur le travail effectué depuis juillet 2002 sur le projet de formulation de PHOSPHOSTIM[®] 200 au sein de la société INNATE PHARMA.

INNATE PHARMA est une société **bio-pharmaceutique** basée à Marseille et créée en 1999 par un groupe de quatre scientifiques européens et deux managers de la biotech, développant des médicaments et procédés de thérapie cellulaire innovants dérivant d'un concept nouveau, la manipulation de **l'immunité lymphoïde non-conventionnelle** (lymphocytes NK et lymphocytes T $\gamma\delta$). De cette base technologique dérive deux familles de produits :

- La famille des **médicaments immuno-modulateurs/stimulants**, dans laquelle sont déclinées les Phosphalohydrines, petites molécules de synthèse activant les cellules T $\gamma\delta$ découvertes par les chercheurs co-fondateurs de la société ; ainsi que les anticorps monoclonaux (agonistes et antagonistes) dirigés contre des récepteurs exprimés par les cellules NK.
- La famille de procédés de **thérapie cellulaire** utilisant les molécules immunostimulantes comme les Phosphalohydrines pour activer ex-vivo les cellules ciblées.

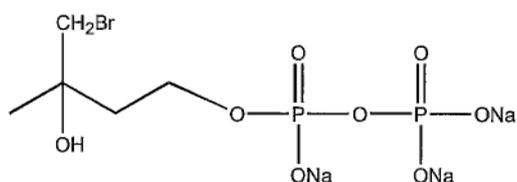
L'ensemble de ces produits sont au stade *recherche ou développement* et ciblent le domaine de la cancérologie.

Le produit **PHOSPHOSTIM[®] 200** représente le premier candidat en développement dont le principe actif est une phosphalohydrine, le bromohydrine pyrophosphate sel de sodium,

BrHPPNa. Ce produit a obtenu en 2004 le statut de médicament orphelin dans l'indication carcinome rénal métastatique.

L'ensemble des études de formulation de PHOSPHOSTIM[®] 200 présentées dans la suite de ce rapport ont été réalisées chez des sous-traitants mais menées et coordonnées par INNATE PHARMA. Elles sont décrites, ici, **en deux parties**, ceci par l'évolution du contexte et des objectifs en cours de développement. La première partie s'inscrit dans le cadre d'un premier développement de formulation pour PHOSPHOSTIM[®] 200 avec pour objectif la mise en œuvre d'une formulation pour un **essai clinique de phase I** en 1 an. La deuxième partie a pour but **l'optimisation de la formulation** qui permette d'améliorer la stabilité du produit PHOSPHOSTIM[®] 200.

Partie 2.2 : Les principales caractéristiques physico-chimique du bromohydrine pyrophosphate, sel de sodium



- *Masse moléculaire* : 409 (trois molécules de sodium)
- *Nom IUPAC* : di ou trisodium (R, S)-3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate.
- *Stoechiométrie du sel* : La stoechiométrie fluctue entre deux et trois molécules de sodium.

Remarque : pour plus de commodité le bromohydrine pyrophosphate sel de sodium sera appelé dans la suite du document BrHPP.

- *Pouvoir rotatoire* : Le BrHPP est une molécule chirale, par son carbone n°3. Sa synthèse permet d'obtenir un racémique, contrôlé par son pouvoir rotatoire nul.
- *Aspect* : Le BrHPP peut se présenter sous forme de poudre blanche, c'est d'ailleurs sous cette forme qu'il a été produit pour l'ensemble des premiers essais, mais également en solution aqueuse selon le procédé de synthèse.
- *Pureté* : la pureté du BrHPP a évolué en cours d'étude et son expression également. Cette pureté est exprimée dans un premier temps en pourcentage de BrHPP forme saline, et dans un deuxième temps en pourcentage de BrHPP forme anionique.
- *Cristallinité* : La poudre de BrHPP a été analysée par diffraction de rayons X pour analyser le(s) type(s) de structure en présence. Aucune structure cristalline n'a été identifiée. Le BrHPP sous forme de poudre est amorphe.
- *Conservation* : Le BrHPP est conservé à $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- *Solubilité* : La solubilité du BrHPPNa dans le solvant eau à 20°C est supérieure à **600mg/ml** à ce niveau de concentration la solution devient très visqueuse. Cette donnée, permet de s'assurer lors de la congélation que la molécule en présence dans le soluté après cristallisation de l'eau ne devrait pas précipiter. Par contre la molécule de BrHPP est très faiblement soluble dans les solvants organiques.
- *Acidité* : Les acidités de la molécule de BrHPP sont caractérisées par deux valeurs de pKa :
 - $\text{pKa}_1 = 2.1$, pour les deux premières acidités confondues
 - $\text{pKa}_2 = 6.6$, pour la dernière acidité
- *Hygroscopicité* : L'ensemble des manipulateurs ont noté que la poudre de BrHPP travaillée en milieu ambiant devient très vite pâteuse et s'accroche à toutes spatules et récipients. Ceci est du à son très fort pouvoir hygroscopique, confirmé par **les études d'isotherme d'adsorption et de désorption de l'eau par DVS** (cf. Figure 14).

Isotherme de sorption BrHPP 0092-14 à 20°C

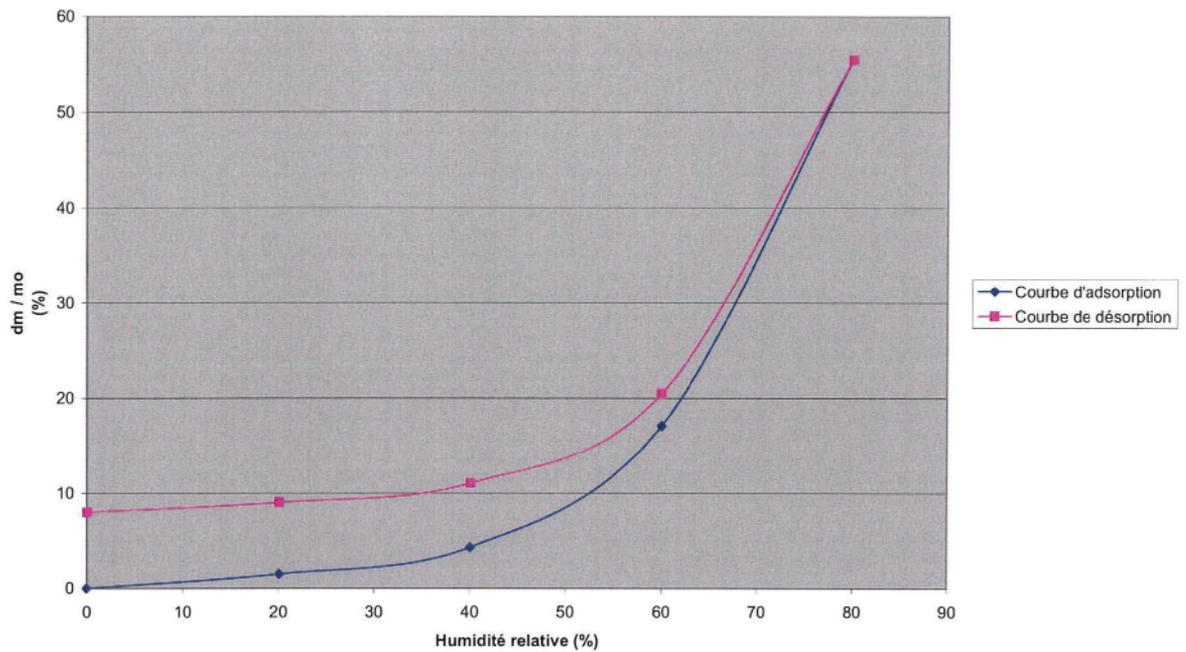


Figure 15 : Etude d'isothermes de sorption par DVS. Tracé bleu : isotherme d'adsorption, tracé rose : isotherme de désorption

La prise de poids du BrHPP à 80% d'humidité relative est supérieure à 50%. Il faut noter qu'à 80% d'humidité relative l'équilibre n'est pas atteint mais le produit est probablement en déliquescence car en fin d'analyse les produits sont récupérés sous forme d'une pâte et non d'une poudre. Cette courbe met en valeur une différence de pouvoir d'adsorption de l'eau par la molécule autour de 40 % d'humidité relative. Ceci pourrait signifier que le BrHPP change d'état quand il atteint un pourcentage d'humidité résiduelle supérieur à 3-4% %. Vu l'état final du produit, il est possible d'imaginer qu'au delà de 3-4% d'humidité résiduelle, le BrHPP à 20°C a fait l'objet **d'une transition vitreuse**. Cette transformation d'état pourrait, alors, expliquer ces différences d'adsorption.

- *Stabilité* : Quelques données préliminaires de stabilité ont démontrées que le BrHPP en solution n'est pas stable, **il s'hydrolyse**. Les vitesses des réactions de dégradation augmentent avec **la température**. De ce fait il a été convenu de conserver le BrHPP à -

20°C et de se tourner vers une formulation qui permette d'obtenir **une poudre** à reconstituer extemporanément.

- *Formulation* : Le choix de la forme pharmaceutique, **lyophilisat**, est justifié par plusieurs arguments. D'une part, comme évoqué précédemment, il est préférable d'envisager un produit sous forme de poudre pour assurer une stabilité convenable et protéger la molécule de l'humidité ambiante. D'autre part les données de pharmacodynamie et de pharmacocinétique in vitro, nécessitent une administration par voie intraveineuse. Or les étapes de stérilisation et de dépyrogénéisation s'intègrent parfaitement dans le procédé de lyophilisation pour répondre au critère de stérilité et d'apyrogénicité requis pour un injectable. Enfin un séchage sans utilisation de températures élevées paraît tout à fait adapté à la molécule aux vues des premières données de stabilité.

Des **études préliminaires** sur la lyophilisation du BrHPP ont été menées, dans lesquelles étaient testées différents excipients à différentes concentrations et différentes températures de désorption. Il n'y a pas eu au préalable d'étude du comportement basse température du BrHPP. Les excipients sélectionnés étaient **le lactose** (la solubilité à 20°C est de 360 g/l) et **le mannitol** (la solubilité à 20°C est de 182g/l). Les concentrations des excipients variaient entre 1.5% et 7.5% dans la solution alors que le BrHPP était à 10%. Ces concentrations ont été définies volontairement basse pour plusieurs raisons. D'abord cela permettait de ne pas masquer de façon trop importante les propriétés du BrHPP lyophilisé, et donc d'apprendre à connaître son comportement. Ensuite la quantité de principe actif étant déjà importante (200mg/flacon), l'ajout d'une quantité également importante d'excipients aurait entraîné, par conséquent, des volumes de répartition de solutions importants et ainsi des durées de cycle relativement longues ou des grandes tailles de flacons. De plus ces concentrations permettaient de s'affranchir de tout risque de cristallisation du mannitol. Les excipients jouaient essentiellement ici le rôle de ballast pour améliorer l'aspect visuel.

Sur les critères suivant : teneur en BrHPP / pourcentage de dégradation, teneur en eau, vitesse de dissolution, aspect visuel ; cette étude a permis de sélectionner deux formules : « **BrHPP 10% + mannitol 2.5%** »; « **BrHPP 10% + lactose 2.5%** ».

D'autres part cette étude a permis d'observer qu'avec une température de désorption n'excédant pas 30°C, le BrHPP ne se dégradait pas de manière importante.

Partie 2.3 : La Formulation PHOSHOSTIM® 200 : première étape

Avant de présenter l'ensemble des matériels et méthodes ainsi que les résultats de ce premier travail, un rappel sur le **contexte** et l'**objectif** de cette étape sont détaillés. Comme évoqué précédemment PHOSHOSTIM® 200 représente le premier produit de cette classe de médicament à voir le jour en développement, et également le projet le plus avancé en développement pour INNATE PHARMA. La nécessité de la **preuve pharmacodynamique** d'une augmentation des cellules TGD chez les patients traités est donc primordiale pour la suite des projets de la société et représente **un enjeu économique majeur**. Cette situation, quelque peu exceptionnelle, donne le ton des études de cette première partie présentées ci-après. Le lecteur ressentira, de ce fait, que le temps imparti aux études représente le principal facteur limitant du projet.

Mais pour mieux aborder ce cette première étape, il est nécessaire d'en rappeler son objectif : la mise au point d'une formule et la définition d'un cycle de lyophilisation pour PHOSHOSTIM® 200 phase I avec 200mg de BrHPP/flacon.

La première partie de ce chapitre a été réalisée en collaboration avec la société ARCHEMIS (Lyon, France). Elle a été organisée de la manière suivante. Tout d'abord, il s'agissait de **définir une recette de lyophilisation** transposable au fabricant des unités

thérapeutiques, STERILYO (St Amand les Eaux, France). Pour cela le premier point était de caractériser le **comportement basse température** des deux formulations précédemment sélectionnées (pour rappel : « BrHPP 10% + lactose 2.5% », « BrHPP 10% + mannitol 2.5% ») auxquelles nous avons rajouté, pour comparaison, la formule « BrHPP 10% seul ». Puis le point suivant consistait à **développer une ou plusieurs recette(s) de lyophilisation** adaptée(s) aux trois formulations.

Ce(s) cycle(s) de lyophilisation, alors, devaient être **transposés à une échelle pilote** chez STERILYO. Ceci permettait donc de fabriquer des tailles de lots suffisantes, d'environ 200-400 flacons pour lancer des études de stabilité, et **sélectionner la formulation la plus stable** qui deviendrait par voie de conséquence la formulation pour les essais clinique de phase I.

Partie 2.3.1 : Matériels et méthodes pour la mise en oeuvre du cycle de lyophilisation n°1

Partie 2.3.1.1 : Les matières premières

Cinq grammes de BrHPP lot VL124-033 étaient disponibles pour réaliser cette étude ; il contenait autour de **1% d'éthanol** avec une pureté anionique de 60% environ.

Les excipients utilisés étaient : du lactose α -monohydrate Prolabo de grade Pharmacopée Européenne et du mannitol Prolabo de qualité Pharmacopée Européenne.

Trois solutions ont ainsi été préparées :

- une solution contenant du BrHPP 10%
- une solution contenant du BrHPP 10% + lactose 2.5%
- une solution contenant du BrHPP 10% + mannitol 2.5%

6 flacons (ref Verrebutex 2275) de chaque mélange ont été préparés en répartissant 2 ml dans chaque. Les bouchons utilisés étaient des bouchons en chlorobutyl.

Partie 2.3.1.2 : Les équipements

Le suivi du comportement basse température des formules a été réalisée grâce à deux équipements :

➤ La **MDSC** (modulated differential scanning calorimetry) Q1000 de TA Instruments. Cet équipement permet de rechercher et de séparer *les évènements réversibles* (transition vitreuse) *des évènements irréversibles* (cristallisation, relaxation endothermique), contrairement à la DSC classique. La plage d'étude sélectionnée pour les cycles de refroidissement et de chauffage était de -80°C jusqu'à +25°C.

Cinq milligrammes de produit ont été pesés puis déposés dans le porte échantillon, une capsule d'aluminium sertie, puis le produit a été porté à -80°C et réchauffé dans un deuxième temps à +25°C.

➤ Un **cryomicroscope** équipé d'une cryoplatine FDSC196 LINKAM, d'un microscope BX60 OLYMPUS et d'un logiciel d'analyse d'images Microvision. Cet équipement permet de rechercher la température *de début de perte de structure* (T_{im}), la température à laquelle la texture de la matière lyophilisée contre le front de sublimation commence à se déformer. L'observation a été effectuée sur une prise d'échantillon d'environ 7µl disposé entre lame et lamelle. L'échantillon a subi le cycle suivant qui simule un cycle de lyophilisation avec traitement thermique:

- refroidissement à 2°C/min jusqu'à la température à laquelle une grande partie de l'eau a cristallisé, définie par l'analyse thermique différentielle

- recuit à une température proche de la température de cristallisation de l'eau
- refroidissement en dessous de la température de congélation du produit défini par l'analyse thermique différentielle.
- mise sous vide pendant la stabilisation
- remontée progressive de la température de l'échantillon (1°C/min et paliers)

➤ **Le lyophilisateur** utilisé était un pilote LYOSTAR FTS-Systems d'une capacité de 0.5m², sur lequel il était possible de brancher une sonde Pirani, une sonde capacitive et 4 sondes de température.

➤ Le BrHPP a été dosé par **chromatographie d'échanges d'ions haute performance** couplée au détecteur à conductivité ionique, cette analyse a été réalisée par Innate Pharma.

➤ La mesure de la teneur en eau a été réalisée par un **dosage Karl Fisher** selon la Pharmacopée Européenne 4^{ème} édition.

Partie 2.3.2 : Résultats de l'étude du comportement basse température sur les solutions de BrHPP seul et en mélange

Partie 2.3.2.1 : Détermination de la température de cristallisation de l'eau

Solutions	Température de cristallisation (°C)
BrHPP 10%	-19.6
BrHPP 10% + lactose 2.5%	-12.6
BrHPP 10% + mannitol 2.5%	-20.3

Table 1 : Températures de cristallisation de l'eau mesurées par MDSC

La température de cristallisation correspond à la température à laquelle il y a nucléation et début de cristallisation de l'eau en glace. Ces températures ont été définies lors du cycle de refroidissement. La Figure 16 présente en suivant le tracé MDSC sur la formule « BrHPP 10% ».

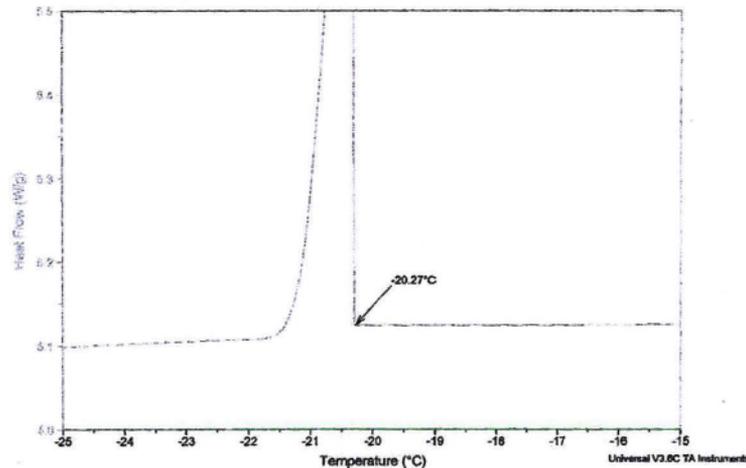


Figure 16 : Analyse MDSC sur la formule BrHPP 10%+ mannitol 2.5% en cycle de congélation. Le pic exothermique correspond à la cristallisation de l'eau

Ces données sont **anormalement basses**. La surfusion de l'eau ne peut atteindre des températures aussi basses. Ces données sont donc aujourd'hui remises en question, mais ce ne fut pas le cas aux jours des essais par le sous-traitant.

Partie 2.3.2.2 : Détermination de la température de solidification du :BrHPP seul et du mélange BrHPP + excipients

En cycle de réchauffement est observé **une transition vitreuse** pour les trois échantillons.

Solutions	Température de transition vitreuse (°C)
BrHPP 10%	-53.3°C
BrHPP 10% + lactose 2.5%	-50.3°C
BrHPP 10% + mannitol 2.5%	-51.1°C

Table 2 : Température de transition vitreuse mesurée par MDSC

Ces températures T_g obtenues pour les trois échantillons sont **particulièrement basses**, et sont proches les unes des autres. La présence d'excipients ne modifie guère les propriétés des solutions. L'analyse MDSC réalisée en cycle de réchauffement est présentée en suivant sur le BrHPP seul (cf. Figure 17). Le tracé de **la composante irréversible** montre un évènement autour de $-54.22\text{ }^\circ\text{C}$ qui doit correspondre à l'enthalpie de relaxation. La **composante réversible** montre un évènement autour de -53.29°C qui correspond à la transition vitreuse.

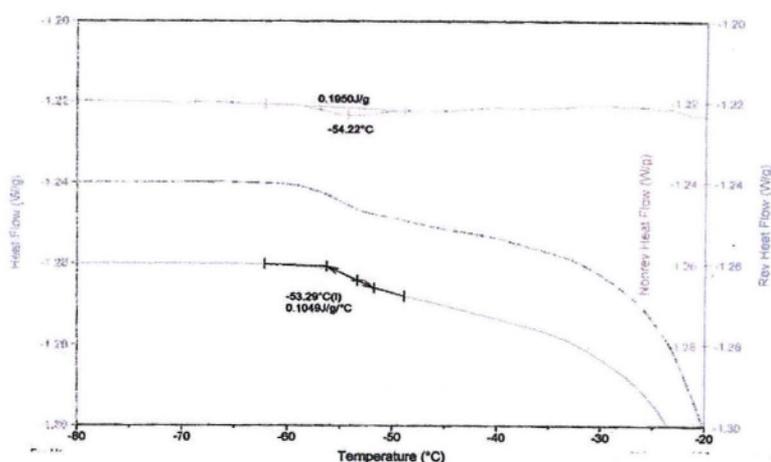


Figure 17 : Résultats MDSC obtenus en cycle de réchauffement sur la solution BrHPP 10% seul. Le tracé le plus haut correspond à la composante irréversible du flux de chaleur, le tracé du milieu correspond à la totalité du flux de chaleur, le tracé du bas correspond à la composante réversible du flux de chaleur.

Partie 2.3.2.3 : Recherche de la température de perte de structure (T_{im})

Le cycle appliqué à l'échantillon dans le cryomicroscope était le suivant :

Refroidissement	-30°C
Recuit	entre -15°C et -10°C
Refroidissement	$<-50^\circ\text{C}$
Mise sous vide	$<-50^\circ\text{C}$
Remontée progressive de la température	$1^\circ\text{C}/\text{min}$

Les observations sont les suivantes :

-Aucune température de perte de structure n'a pu être déterminée car aucun front de sublimation n'a pu être observé.

- des **bulles liquides d'éthanol** apparaissent en surface de l'échantillon après le début de la cristallisation (cf. Figure 18). Ces bulles grossissent progressivement en cours de sublimation.

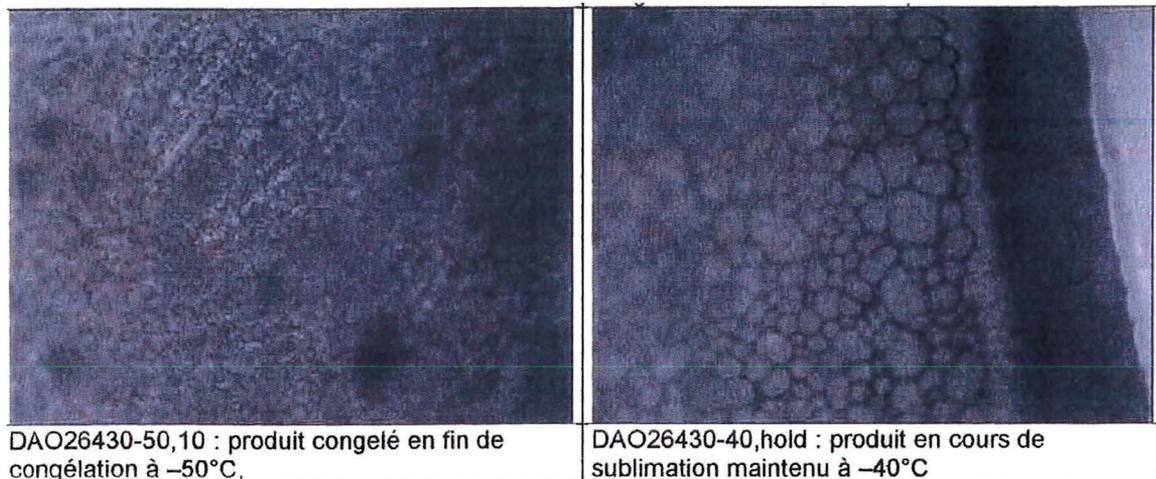


Figure 18 : Photographie de la formule « BrHPP 10% » obtenue en cryomicroscopie

- Dans le cas de la formulation avec mannitol, il y a confirmation de **l'absence de formation cristalline du mannitol**.

- Les températures de cristallisation de l'eau relevées sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par DSC modulée.

L'évaluation de la température T_{im} ne pouvant se faire expérimentalement, son estimation s'est fait avec les données de la littérature et l'expérience du sous-traitant. D'une part la température T_{im} est décrite comme étant environ 2°C à 6°C au dessus de la température de transition vitreuse. D'autre part des essais similaires avaient été réalisés par le sous-traitant sur un produit contaminé par environ 1% d'éthanol. Il avait alors observé que la température de transition vitreuse était plus basse de 10°C par rapport au même produit ne contenant pas le solvant. Mais néanmoins ceci n'affectait pas la température T_{im} qui était 2 à 3°C au dessus de la température de transition vitreuse déterminée en l'absence d'éthanol.

En partant de l'hypothèse que la présence d'éthanol affecte de la même manière la température de transition vitreuse et la température T_{im} , alors cette dernière a été estimée pour les trois solutions à :

Solutions	Transition vitreuse mesurée avec 1% d'éthanol (°C)	Transition vitreuse estimée en absence d'éthanol (°C)	Température de début de perte de structure estimée (°C)
BrHPP 10%	-53.3	-40	-37
BrHPP 10% + lactose 2.5%	-50.3	-37	-34
BrHPP 10% + mannitol 2.5%	-51.1	-38	-35

Table 3 : Valeurs de la transition vitreuse mesurée et estimée, estimation de la température de début de perte de structure

Les températures de début de perte de structure (T_{im}) obtenues par calcul sont situées autour de **-35°C**. C'est la valeur qui a été retenue pour mettre au point le cycle de lyophilisation

Partie 2.3.3 : Mise au point de la recette de lyophilisation n°1

A partir des données expérimentales et/ou estimées obtenues précédemment l'intérêt était de définir l'ensemble des paramètres de lyophilisation à appliquer simultanément aux trois formules et transposable chez le fabricant des unités thérapeutiques à l'échelle pilote.

- Cycle de lyophilisation proposé :

cycle	étape	pression	Consigne T. étagère (°C)	Pente (min)	palier T. (min)
Congélation	Chargement	Atm	20	-	-
	Segment 1		-4	1	30
	Segment 2		-45	1	60
	Segment 3		-15	1	60
	Segment 4		-45	1	180
Sublimation	Segment 1	50mTorr	-25	60	Selon process
Dessiccation secondaire	Segment 1	50mTorr	30	120	< 24heures
Bouchage		0.9Atm			

Table 4 : Cycle de lyophilisation proposé n°1

➤ Description du cycle :

Etape de congélation

Le chargement est réalisé à température ambiante puis les flacons sont maintenus à -4°C pour amener l'ensemble du volume dispersé à température négative avant congélation. Une congélation rapide jusqu'à -45°C est ensuite programmée pour permettre une solidification de l'eau mais également une partie du soluté. Une température de -55°C aurait été idéale pour refroidir les solutions mais -45°C correspond à la température la plus basse que peut atteindre le lyophilisateur du fabricant des unités thérapeutiques, STERILYO.

Cette étape est suivie d'un traitement thermique, recuit à -15°C, pendant 1 heure ceci pour donner une texture plus aérée pour la sublimation. Enfin un refroidissement final à -45°C pendant 3 heures termine cette première étape.

Etape de sublimation

L'objectif est de maintenir le produit à une température en dessous de -35°C, température de début de perte de structure estimée ; jusqu'à ce que la température du produit décroche.

La pression est abaissée à 50mtorr, pression inférieure à la pression de vapeur saturante à - 35°C.

Dessiccation secondaire

Les étagères sont réchauffées à raison de 30°C/heure jusqu'à la valeur de 30°C. La pression de chambre est maintenue à 50mtorr.

Bouchage des flacons

Le bouchage en place des flacons est réalisés à 0.9 atmosphère

Le cycle de lyophilisation effectivement réalisé était le suivant :

cycle	étape	pression	Consigne T. étagère (°C)	Pente (min)	palier T. (min)
Congélation	Chargement	Atm	20	-	-
	Segment 1		-4	41	30
	Segment 2		-45	78	60
	Segment 3		-15	18	60
	Segment 4		-45	23	180
Sublimation	Segment 1	50mTorr	-25	60	2090
	Segment 2		-15	20	260
Dessiccation secondaire	Segment 1	50mTorr	30	120	1080
Bouchage		0.9Atm			

Table 5 : Cycle de lyophilisation réalisé n°1

Le segment 2 de la sublimation a été rajouté car les enregistrements des températures des produits ont été interrompus entre la 1803^e et la 2676^e minutes ceci en raison d'un problème technique. L'intérêt était de porter le produit à plus haute température pensant que la sublimation n'était pas terminée. Ce segment n'a en fait aucune utilité dans le cycle.

L'historique du cycle est le suivant :

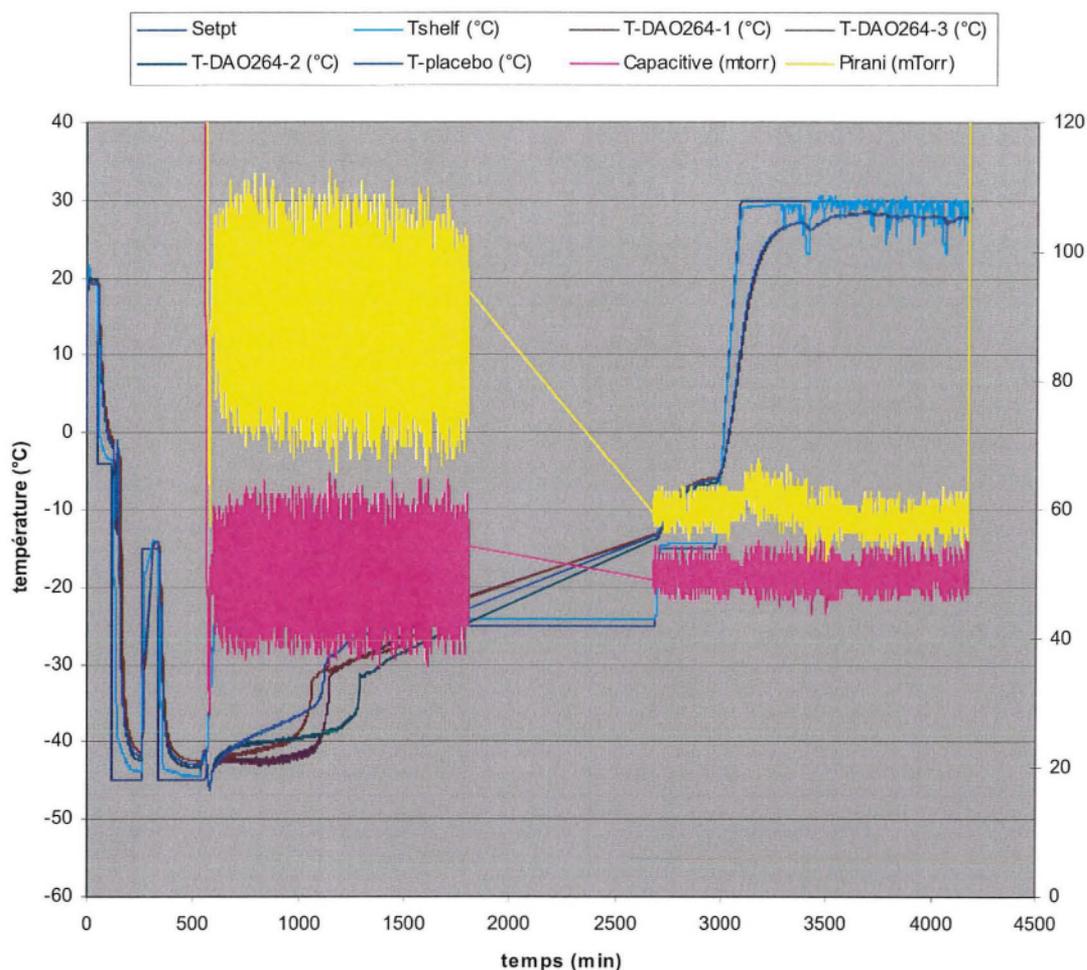


Figure 19 : Cycle ARCHEMIS n°1. Les valeurs entre la 1803^e et la 2676^e minutes ont été perdues, le tracé entre ces deux points a été rajouté mais ne correspond pas forcément à la réalité. La sonde T-DA0264-2 suit la température « BrHPP 10% + lactose 2.5% », la sonde T-DA0264-1 suit la température « BrHPP 10% », la sonde T-DA0264-3 suit la température « BrHPP 10% + mannitol 2.5% ».

L'historique Figure 19 montre que la cristallisation de l'eau a lieu autour de -10°C/-15°C ; notée par la présence d'un pic exothermique et non autour de -20°C comme analysé par DSC. La montée de la température des produits durant le démarrage de l'étape de sublimation est lente, due à la basse pression appliquée dans l'enceinte. Ceci devrait permettre de ne pas atteindre la température de début de perte de structure. De plus malgré les pertes de données, il est aisé de constater que la température des flacons est supérieure

à la température des étagères ; ceci doit être dû à un fort effet de transfert thermique par radiation. Enfin la fin de sublimation est nettement définie par la convergence des valeurs de la jauge Pirani vers les valeurs de la jauge capacitive. Pour conclure, le comportement des trois produits est similaire, le comportement du BrHPP a « le dessus » sur la composition ; cela permettra donc d'utiliser le même cycle pour les trois formulations.

Partie 2.3.4 : Analyse des lyophilisats

Les lyophilisats « BrHPP seul » sont **fortement rétractés** en surface supérieure, paraissent très **hétérogènes**, et possèdent des **bulles** au milieu du gâteau (cf. Figure 20). Ceci pourrait provenir du dégagement de l'éthanol. Leur analyse par HPAEC montre une dégradation autour de 5%.

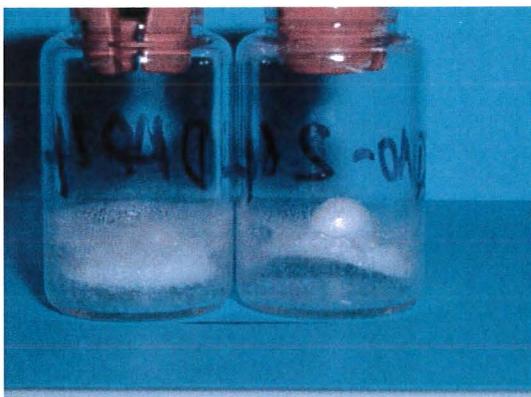


Figure 20 : BrHPP seul 10%

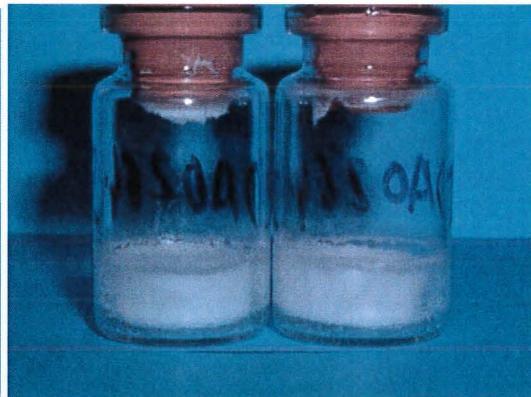


Figure 21 : BrHPP 10% + lactose 2,5%

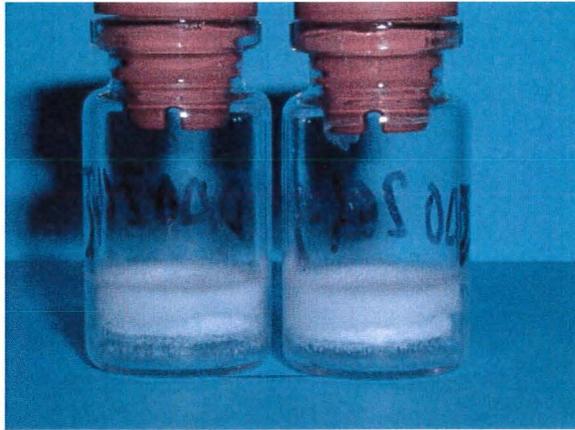


Figure 22 : BrHPP 10% + mannitol 2,5%

Par contre les lyophilisats BrHPP + lactose (cf. Figure 21) sont homogènes tout comme les lyophilisats BrHPP + mannitol (cf. Figure 22). Ils sont tous les deux collés à la paroi mais présentent une couche sans matière au fond du flacon d'une épaisseur de 1.5 à 2 mm. Ce vide est caractéristique des formulations contenant de l'éthanol résiduel. Les formulations avec excipient **ne sont pas dégradées à plus de 1%**.

La dégradation significative du lyophilisat BrHPP seul pourrait peut-être s'expliquer par une **non solidification** pendant l'étape de congélation, en effet la transition vitreuse du BrHPP est légèrement plus basse que celles des solutions avec excipients. Cependant la température de transition vitreuse, mesurée, est inférieure à -45°C pour les trois formules, température appliquée aux étagères durant la congélation. Ainsi aucune des trois formules n'a du se solidifier en intégralité. Mais l'inspection visuelle des flacons de BrHPP seul montre des signes de bullage et de cavitation caractéristique d'un produit qui a partiellement ou totalement fondu lors de la sublimation. Ceci pourrait également expliquer la dégradation du produit. Cette caractéristique ne se retrouve pas ou très légèrement pour les produits avec excipients, ils doivent être totalement ou tout du moins partiellement solidifiés lors de l'étape de sublimation. D'autre part la durée de l'étape de sublimation est peut-être trop longue pour le BrHPP seul qui contient un cinquième de matière en moins.

La **mesure de la teneur en eau a échoué**, les variations entre deux flacons sont de plus de 150%. Les résultats ont été invalidés. L'analyse n'a pas pu être refaite par manque de flacons.

Ces trois formules ainsi que la recette de lyophilisation ont été testés chez STERILYO, de manière d'une part à obtenir une taille de lot suffisante pour **mettre en stabilité les flacons** ($-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$; $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$; $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\%\text{RH} \pm 5\%\text{RH}$). D'autre part cela permettait d'observer **la transposition des paramètres de lyophilisation** de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote. La recette de lyophilisation transmise a été modifiée sur un point : la sublimation sera faite à la pression de 80mTorr au lieu de 50mTorr ; et comme indiqué précédemment le segment 2 de la sublimation a été éliminé. L'augmentation de la pression permettra peut-être d'augmenter légèrement la température des flacons et accélérer la sublimation.

Partie 2.3.5 : Matériels et méthodes pour la transposition n°1 chez STERILYO

STERILYO est le façonnier sélectionné pour fabriquer le produit PHOSHOSTIM[®] 200 phase I. L'objectif était de sélectionner la formulation, parmi les trois décrites précédemment, qui serait utilisée pour la clinique à partir des données de stabilité, étude sous-traitée chez Quality Assistance (Donstiennes, Belgique), sous-traitant analytique

Partie 2.3.5.1 : Les matières premières

Le principe actif utilisé pour cet essai était le BrHPP lot INP-D004-02a. Il avait le même profil de pureté que le lot précédemment utilisé, c'est-à-dire 60% de pureté anionique et

1% d'éthanol. Le lactose et mannitol étaient de même origine que ceux utilisés chez ARCHEMIS.

La préparation de la solution à répartir était la même, à la différence près que les solutions finales ont été **filtrées** sur des filtres de taille de pores inférieures à 0.22 μ M avant répartition de manière à obtenir un produit stérile.

La solution BrHPP seul (10%) a été lyophilisée simultanément (cycle de lyophilisation 1) à la solution BrHPP 10% + mannitol (2.5%). La solution BrHPP 10% + lactose 2.5% a été lyophilisée dans un deuxième temps (cycle de lyophilisation 2).

La nature des flacons et bouchons était identique à ceux utilisés chez ARCHEMIS

Partie 2.3.5.2 : Les équipements

Le **lyophilisateur** était un USIFROID (ref.9). Il peut lyophiliser jusqu'à 3840 flacons de 5/7 ml. Deux sondes de températures ont été branchées pour collecter la température du produit, une sonde donnant la température des étagères, et une jauge Pirani indiquant la pression. Par contre il n'est pas muni d'un système permettant l'enregistrement en temps réel de la température et de la pression en fonction du temps.

La teneur en eau a été déterminée par la méthode Karl Fisher décrite dans la Pharmacopée Européenne quatrième édition méthode 2.5.32 *Microdosage de l'eau* avec l'adaptation suivante : Le solvant, la solution iodée préneutralisée, a été introduit dans le flacon à l'aide d'un montage seringue/aiguille pour dissoudre le lyophilisat, le produit a été ensuite agité délicatement pendant 5 minutes et a été introduit, à l'aide du même montage, dans le milieu réactif. Le dosage a ensuite été réalisé.

Le produit a été dosé par une méthode de **couplage de chromatographie liquide haute performance (HPLC) et un détecteur de diffusion de lumière (DDL)**. Cette méthode permet de doser spécifiquement la molécule de BrHPP.

Des **études de stabilité** ont été planifiées sur 18 mois à trois températures :

- température de conservation : $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
- température accélérée : $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- température accélérée : $+25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, **60% RH \pm 5% RH**

Ces études ont été réalisées dans les conditions décrites par « International Conference of Harmonization » (ICH), par Quality Assistance. Les analyses programmées pour suivre le produit étaient essentiellement : l'apparence du lyophilisat, le dosage du BrHPP, la teneur en eau et le suivi des impuretés. Les impuretés ont été analysées par une méthode de chromatographie d'échange d'ions haute performance (HPAEC) couplée à un détecteur à conductivité ionique

Partie 2.3.6 : Cycles de lyophilisation 1 & 2

Les histogrammes des deux cycles, C1 et C2, sont présentés dans la figure suivante (cf. Figure 23) et ont été tracés grâce aux enregistrements manuels des données température et pression effectués par le technicien à différents temps.

Lyophilisation cycle 1 (C1) & cycle 2 (C2)

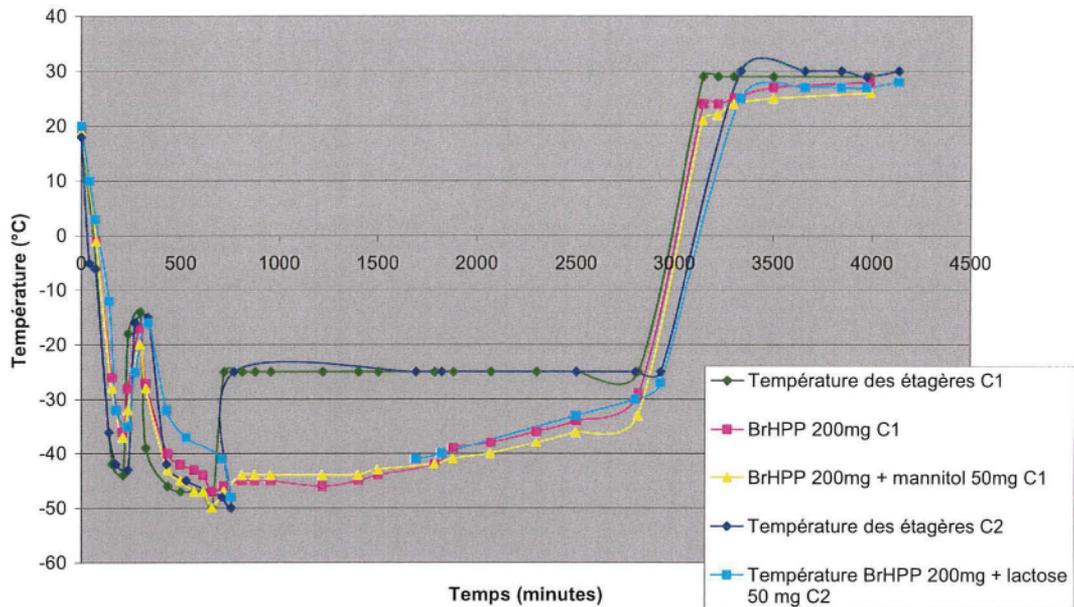


Figure 23 : Cycle n°1 et 2 mis en œuvre chez STERILYO

La pression appliquée était de 75 mTorr pendant la sublimation et 45 mTorr pendant la dessiccation secondaire.

Partie 2.3.7 : Analyse des lyophilisats

Partie 2.3.7.1 : Aspect visuel

L'aspect visuel des lyophilisats n'est **pas très bon** pour l'ensemble des formulations (cf. Figure 24 & Figure 25). Il semblerait que l'éthanol soit « prisonnier » de la matrice « BrHPP seul ou avec excipient », ce qui se traduit par des bulles dans le gâteau. Ce phénomène est moins accentué avec les lyophilisats « **BrHPP + lactose** ».



Figure 24 : BrHPP seul 10% (capsule verte), BrHPP 10% + mannitol 2.5% (capsule rouge) fabriqué par STERILYO



Figure 25 : BrHPP 10% + lactose 2.5%, fabriqué par STERILYO

Les cycles de lyophilisation appliqués par STERILYO respectent les consignes transmises par ARCHEMIS. Le comportement thermique des produits est cependant différent. *Les produits subliment beaucoup plus lentement* ceci se traduit par un décrochement de la température beaucoup plus tardif, également les lyophilisats n'atteignent pas une température au-dessus de la température des étagères comme observé chez ARCHEMIS.

Sachant que la matière première n'a pas été purifiée chez ARCHEMIS, et contient des particules en suspension ; leurs présences, plus importantes sans filtration, constituent des supports pour amorcer plus rapidement le phénomène de nucléation. Cet **état particulaire** comparé aux solutions filtrées peut justifier l'augmentation de la vitesse de sublimation. Ceci justifierait le décrochement plus rapide pour les lyophilisats obtenus chez ARCHEMIS. D'autre part les différences de températures en fin de sublimation pour les lyophilisats peuvent s'expliquer par une différence de transfert thermique entre les deux lyophilisateurs. La pression n'étant pas plus basse chez STERILYO le transfert par conduction-convection des gaz ne doit pas être diminuée, d'autre part les flacons utilisés étant les mêmes, le transfert par convection doit être similaire, ceci peut donc se justifier par une différence de transfert thermique par radiation. Différence d'environnement pour les lyophilisats, taille des parois du lyophilisateur différentes peuvent être à l'origine de la non reproductibilité du transfert thermique par radiation lors de la transposition d'échelle entre le lyophilisateur taille laboratoire et le lyophilisateur taille pilote.

Partie 2.3.7.2 : Dosage

Les résultats de **dosage** du BrHPP dans les trois formulations sont identiques à ceux obtenus avec les lyophilisats d'ARCHEMIS.

Partie 2.3.7.3 : Teneur en eau

Les résultats de **teneur en eau** sont les suivants :

	INP-D004-02c-01	INP-D004-02d-01	INP-D004-02e-01
Teneur en eau (mg/vial) ($\alpha = 0.05$)	2.11mg/vial \pm 0,18mg/vial	1.92 mg/vial \pm 0.15mg/vial	2.85mg/vial \pm 0.34mg/vial
Expression en %*	1.1%	0.8%	1.1%

Table 6 : Résultats de teneur en eau

* Les teneurs en eau, exprimées en pourcentage, sont calculées en considérant la masse moyenne de chacune des formulations.

Comme décrit précédemment le test a été développé de manière à éviter tout contact du produit avec l'air libre ceci dans le souci d'obtenir une reproductibilité satisfaisante, connaissant le caractère très hygroscopique de la poudre BrHPP. Cependant malgré cette adaptation la dispersion est assez conséquente. Ceci peut se justifier par une variation de masse des lyophilisats puisque la teneur, exprimée en mg/vial, n'est pas ramenée à la pesée mais à la masse moyenne. Dans tous les cas, elles sont toutes autour de 1% et sont légèrement plus basses pour les lyophilisats BrHPP + mannitol.

Partie 2.3.7.4 : Test de dissolution

La dissolution en eau des trois formulations se fait en moins d'une minute ce qui est tout à fait acceptable.

Partie 2.3.7.5 : Etudes de stabilité

Les **résultats de stabilité** sur 12 mois sont les suivants :

Formulation	BrHPP seul			BrHPP + mannitol			BrHPP + lactose		
	-20°C	+5°C	+25°C 60%RH	-20°C	+5°C	+25°C 60%RH	-20°C	+5°C	+25°C 60%RH
Constante de vitesse (mg/semaine) (vitesse d'ordre 0)	0.1	0.4	4	NA*	NA*	2	NA*	NA*	2.5

* Non applicable car lyophilisat non dégradé

Formulation		BrHPP seul			BrHPP + mannitol			BrHPP + lactose		
Température de stabilité		-20°C	+5°C	+25°C 60% RH	-20°C	+5°C	+25°C 60% RH	-20°C	+5°C	+25°C 60% RH
Teneur en eau (mg/vial)	T ₀	2.1±0.2 (1.1%)			1.9±0.2 (0.8%)			2.9±0.3 (1.1%)		
	T 6 mois	3.3±0.7 (1.7%)		3.1±0.2 (1.6%)	2.1±0.2 (0.9%)		4.0±0.5 (1.7%)	4.5±1.7 (1.8%)		4.7±0.2 (1.9%)
	T12 mois	3.3±0.7 (1.7%)	4.2±0.6 (2.1%)		2.4±0.1 (1.2%)	3.5±0.1 (1.4%)		2.3±0.1 (0.9%)	5.5±0.3 (2.2%)	

Le BrHPP seul se dégrade beaucoup plus rapidement par rapport aux lyophilisats formulés, à + 25°C ± 2°C. Les excipients jouent un rôle important dans la stabilité du lyophilisat.

La dégradation de la formule BrHPP + lactose est un peu plus élevée par rapport à la formulation BrHPP + mannitol à +25°C ± 2°C / 60%RH ± 5%. Aucune dégradation n'est observée pour les lyophilisats avec lactose ou mannitol à -20°C et +5°C au bout de 9 mois.

Pour information la quantité de matière sèche par flacon est de 196 mg pour le « BrHPP seul », 242 mg pour « BrHPP+mannitol », et 250 mg pour la formule « BrHPP+lactose ».

Concernant l'évolution des teneurs en eau dans le temps, pour interpréter les résultats il est important de tenir compte de l'intervalle de confiance ($\alpha=0.05$) qui peut être assez large, du à une mauvaise reproductibilité d'un flacon à l'autre. D'une manière générale, il est assez difficile de comparer les résultats de teneur en eau d'une température à une autre pour la même formulation. Par contre une tendance générale apparaît : **la teneur en eau augmente avec le temps.**

Cette augmentation pourrait s'expliquer par un phénomène de désorption des bouchons. Sachant que **les bouchons** sont stérilisés par autoclave et ne subissent ensuite aucun traitement thermique particulier pour leur séchage, il est fort probable qu'ils **désorbent** dans le temps.

L'ensemble de ces données collectées a permis de sélectionner la formule à mettre en œuvre pour la fabrication des unités thérapeutiques. Dès le départ la formule BrHPP seul a

été mise de côté, ceci se justifiant aisément par les résultats de stabilité et par la dégradation du produit pendant le cycle. Le choix entre la formule BrHPP + lactose et BrHPP + mannitol est argumenté par les résultats obtenus en **contrôle visuel**. Le BrHPP + lactose présente un meilleur aspect visuel et nettement plus « pharmaceutique » comparé à la formule BrHPP + mannitol, malgré le fait que la formule BrHPP + lactose semble moins stable que la formulation BrHPP + mannitol. C'est donc cette formule qui a été retenue pour la suite des études.

Partie 2.3.8 : Matériels et méthodes pour la mise en œuvre du lot clinique

Le lot clinique BrHPP + lactose d'une taille théorique de 2000 flacons a été fabriqué chez STERILYO. Il a été fabriqué à partir d'un nouveau lot d'actif pharmaceutique.

L'ensemble des équipements utilisés étaient les mêmes que ceux décrits précédemment. Le seul changement provenait de la nature du principe actif. Le lot utilisé pour cette étude était le INP-D004-03a. Du à des changements de procédé lors de la synthèse, ce nouveau lot avait un **profil de pureté différent**. Il contenait notamment **10% d'éthanol** et avait une pureté anionique de 66%, le lot précédent avait une pureté de 60%. Ces modifications ont justifié un **essai préalable à la taille laboratoire** pour s'assurer de la reproductibilité des résultats avec un nouvel actif pharmaceutique. D'autre part, il a été décidé de fournir pour les études cliniques des lyophilisats contenant 200 mg de BrHPP forme anionique au lieu des 200 mg de BrHPP forme saline. Ces essais permettaient donc de tester également la nouvelle teneur en actif pharmaceutique par flacon, c'est-à-dire $200/0.66 \approx 300\text{mg}$ de **matière sèche/flacon**. Cette quantité représentait une augmentation de 30 % de la teneur

en matière sèche dans le flacon. La quantité de lactose a été aussi ajustée de manière à obtenir la même proportion principe actif/excipient. La quantité de lactose par flacon était donc de : $50/0.66 \approx 75\text{mg}$. La solution à répartir était ainsi plus concentrée (BrHPP 15% + lactose 3.7%), mais le volume de répartition est resté inchangé.

Seuls sont présentés les résultats de l'étude réalisée chez ARCHEMIS, le matériel et les méthodes étant similaire à la première étude décrite, hormis pour la préparation des solutions qui ont été filtrées avant lyophilisation de manière à obtenir le même état particulière que celui attendu chez STERILYO.

Partie 2.3.9 : Mise en œuvre du cycle de lyophilisation n°2 d'ARCHEMIS

Le cycle était le suivant :

Cycle	étape	Pression	Consigne T. étagère(°C)	pente (min)	palier T. (min)
Congélation	Chargement	Atm	20	-	-
	Segment 1		-4	20	60
	Segment 2		-45	30	150
Mise sous vide		Atm à 200mTorr			
Sublimation	Segment 1	75mTorr	-25	20	2500
Dessiccation secondaire	Segment 1	50mTorr	30	120	1350
Bouchage		0.9Atm			

Table 7 : Cycle de lyophilisation n°2 réalisé par ARCHEMIS

L'histogramme du cycle est repris dans la Figure 26.

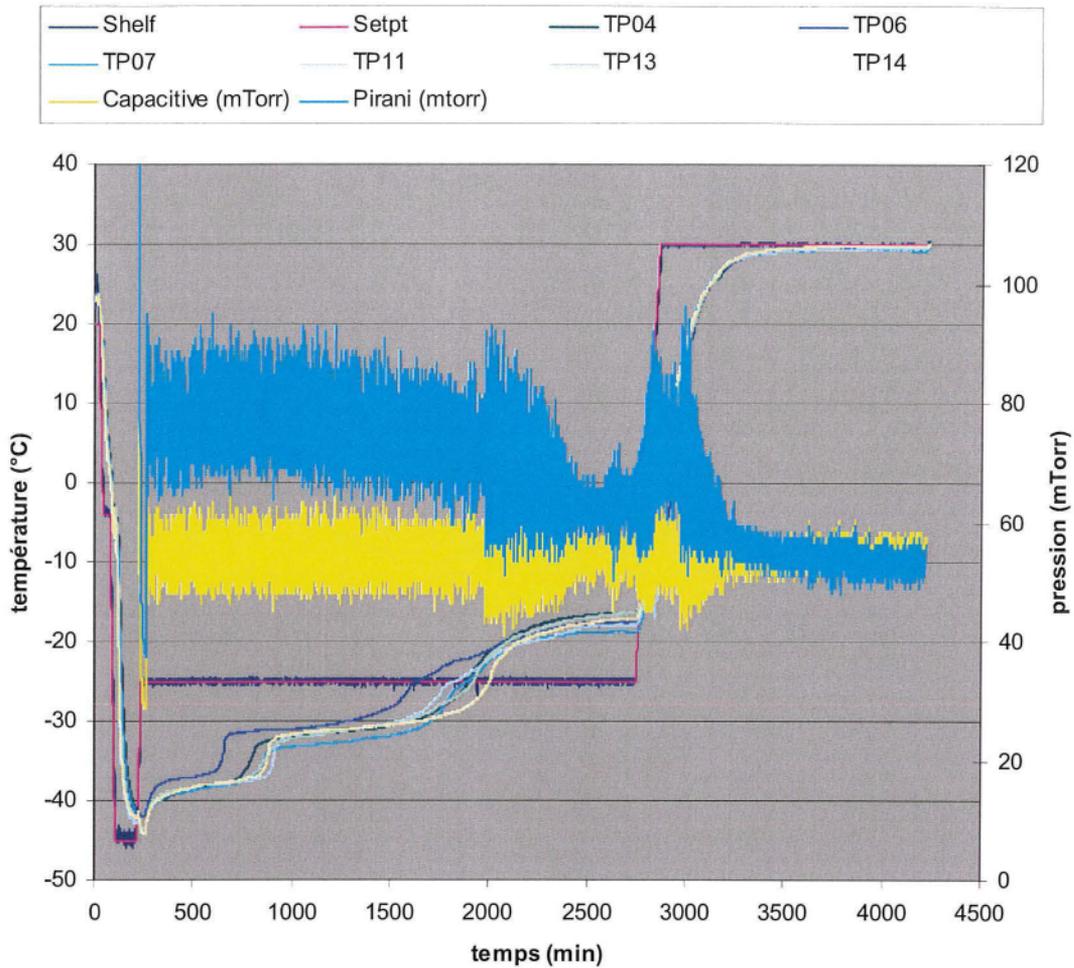


Figure 26 : Cycle de lyophilisation n° 2 mis en œuvre par ARCHEMIS. Les trois sondes, TP04, TP13, TP14 suivent la température du produit « BrHPP 15% + lactose 3.7% » dans trois flacons différents, la sonde TP06 est placée dans un flacon contenant uniquement du lactose.

Les changements, par rapport au cycle proposé précédemment, sont les suivants :

- étape de congélation : le palier à -4°C est porté à 60 minutes au lieu de 30, le palier à -45°C est porté à 150 minutes au lieu de 90 ;
- L'étape de recuit est éliminée
- La température des étagères atteint la température de sublimation 3 fois plus rapidement
- Le temps de sublimation est prolongé de 25 %, c'est-à-dire autour de 500 minutes

- La dessiccation secondaire est prolongée de 30%, c'est-à-dire autour de 300 minutes

La congélation ne comporte plus de traitement thermique. Son utilité dans le cycle n'était pas prouvée. D'ailleurs en étudiant le cycle, la vitesse de sublimation **ne semble pas ralentie** comparée aux résultats précédents. La fin de sublimation est atteinte après environ 2300 minutes contre 2150 pour le cycle précédent. Cette différence s'explique par l'augmentation de matière dans le flacon. Pour rappel la fin de sublimation est considérée, ici, comme étant le moment où la pression indiquée par la jauge Pirani atteint la pression indiquée par la jauge capacitive.

Les étapes de congélation et sublimation **sont prolongées** du à l'augmentation de la matière dans le flacon. Les augmentations de temps, 25-30% sont équivalentes à l'augmentation de matière sèche/flacon, 30%. L'étude de l'histogramme, sans perturbation cette fois-ci, permet d'observer que la température du produit évolue selon **trois paliers de température différente** lors de la sublimation.

Comme observé précédemment dans le même lyophilisateur, la température des flacons atteint en fin de sublimation une température supérieure à la température des étagères

Partie 2.3.10 : Analyse des lyophilisats obtenus avec le cycle n°2 d'ARCHEMIS

Les lyophilisats obtenus n'ont **pas un aspect pharmaceutique satisfaisant**, les lyophilisats sont **bombés** en forme de cloche (cf. Figure 27).



Figure 27 : Photographie des lyophilisats obtenus avec le cycle n°2 d'ARCHEMIS

L'apparition de cette cloche est très progressive au cours de l'étape de sublimation, la texture des lyophilisats est particulièrement mousseuse. Cet état se justifie par la présence importante d'éthanol qui perturbe l'étape de sublimation.

Mais malgré cette apparence les lyophilisats ne sont **pas dégradés à plus de 1%**, c'est à dire du même ordre que précédemment. D'un point de vue analytique les lyophilisats sont conformes. Dans le contexte du déroulement de ces essais, réaliser des études complémentaires représentait une perte de temps conséquente pour le lancement de l'étude clinique. Il a donc été décidé de **poursuivre les essais** et de transposer le travail chez STERILYO malgré les mauvais résultats visuels obtenus pour les lyophilisats.

Partie 2.3.11 : Transposition du cycle de lyophilisation pour la fabrication du lot clinique chez STERILYO

Lyophilisation INP-D004-03e-01

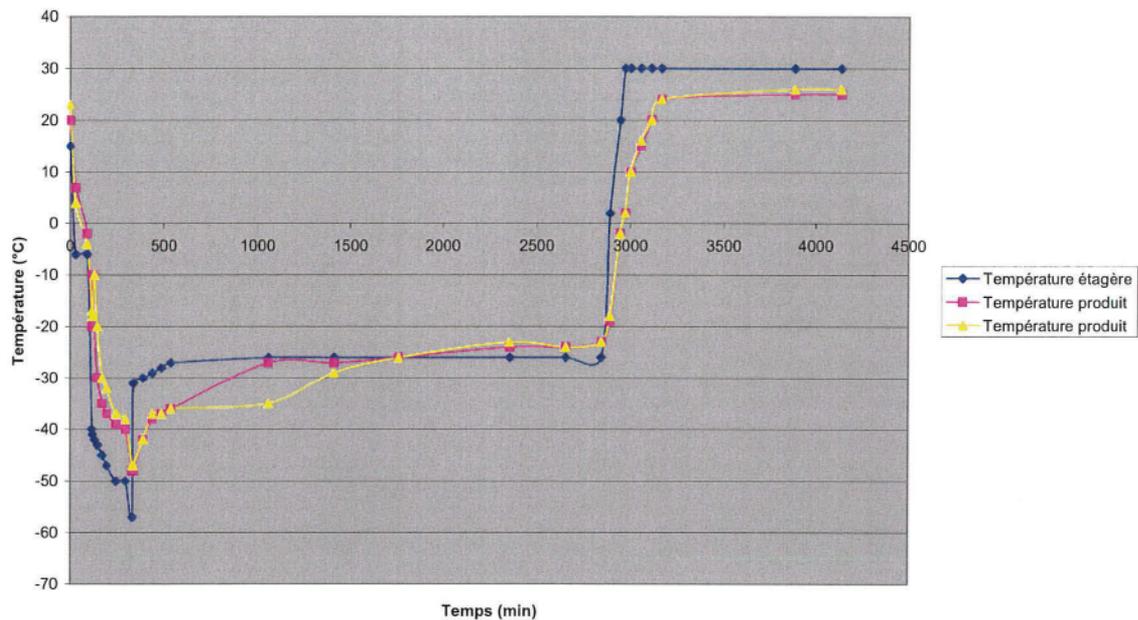


Figure 28 : Cycle de lyophilisation n°2 mis en œuvre par STERILYO

La pression en sublimation était de 75 mTorr, et en désorption de 30mTorr. La pression appliquée chez STERILYO en désorption est plus basse que celle initialement transmise 30mTorr au lieu de 50mTorr. Cette diminution peut, peut-être, améliorer la désorption mais ne doit pas être abaissée en dessous de 7.5 mTorr (i.e. $< 10^{-2}$ mbar). L'étude de l'histogramme montre que les deux flacons suivis avec la sonde de température ne se comportent pas de la même manière. Le premier flacon semble sublimer plus rapidement que le second. Ce dernier a d'ailleurs un profil très semblable aux flacons traités chez ARCHEMIS. La différence observée entre les deux tracés peut venir d'une hétérogénéité de transfert de chaleur, selon l'emplacement du flacon dans le lyophilisateur. Mais cela pourrait également être du à la position de la sonde dans le flacon. En effet si la sonde n'est pas exactement situé au même endroit dans le gâteau, la sonde la plus élevée dans le

lyophilisat donnera des vitesses de sublimation plus élevées par rapport à une sonde positionnée en bas du gâteau.

Partie 2.3.12 : Analyse des lyophilisats obtenus avec le cycle n°2 de STERILYO

Les lyophilisats ont **un aspect convenable**, ils sont **rétractés en partie basale**, mais sont certainement meilleurs que ceux obtenus chez ARCHEMIS (cf. Figure 29). Les différences d'aspect sont difficilement explicables, une pression plus élevée en désorption ne semble pas être un élément suffisant.



Figure 29 : Photographie des lyophilisats obtenus avec le cycle n°2 de STERILYO

Résultats de stabilité en HPLC/DDL sur 12 mois :

Formulation	BrHPP + lactose		
Température	-20°C	+5°C	+25°C 60%RH
Constante de vitesse (mg/semaine) (vitesse d'ordre 0)	0.2	0.1	2

Les résultats de stabilité sont sensiblement les mêmes que ceux précédemment fournis, pour rappel : BrHPP 10% + lactose 2.5%. Les différences constatées entre les résultats à

+5°C et -20°C sont justifiées par des erreurs de mesures. Les profils d'impuretés analysés en parallèle (résultats non présentés) sont sensiblement les mêmes et ne présentent aucune augmentation d'impureté significative. Le lyophilisat est donc considéré comme stable à -20°C sur 12 mois.

Partie 2.4 : La formulation PHOSHOSTIM® 200 : Deuxième étape

Cette deuxième étape s'ouvre avec les éléments suivants :

1. L'objectif de la première étape a été atteint : fournir un produit fini stable (12 mois à -20°C) et pharmaceutiquement acceptable pour les études cliniques de phase I.
2. Le travail sur la formule et la recette de lyophilisation n'a pas pu être approfondi par manque de temps.
3. La pureté de la molécule BrHPP a été améliorée en parallèle de la réalisation de ces travaux. La pureté est dorénavant de 80 % au lieu des 66% précédemment obtenu, et le BrHPP ne contient plus de solvants.

Ces éléments majeurs ont motivé la planification de nouveaux travaux sur le produit PHOSHOSTIM® 200, qui ont pris place dans un contexte plus « serein ». En voici les principales bornes :

1. Une redéfinition en vue de son amélioration du cycle de lyophilisation, basée sur une caractérisation plus élaborée du comportement de la molécule seule et en mélange, tout en conservant la formule actuelle.
2. Un nombre d'essais conséquents pour assurer une recette de lyophilisation robuste et transposable chez un façonnier.
3. Une bonne caractérisation du produit sec.

4. Des essais de formules avec de nouveaux mélanges d'excipients à réaliser en parallèle.

L'objectif majeur de ces travaux est d'adapter au mieux le procédé de lyophilisation à la molécule de BrHPP en vue **d'améliorer la stabilité** de PHOSHOSTIM[®] 200 et ceci selon deux campagnes d'études.

La première campagne consistait à améliorer la recette de lyophilisation tout en conservant la formule actuelle (borne1). L'intérêt était de pouvoir continuer à approvisionner les études cliniques avec la même formule dont la stabilité était assurée au minimum à un an. Une nouvelle formule aurait obligé à fournir auprès des autorités compétentes des nouvelles données de stabilité pour justifier de la date de péremption. Ceci était limitant pour le développement du projet. Les essais de nouvelles formules (borne 4), quant à eux, font partie de essais inclus dans la deuxième campagne. Ils ont été planifiés dès le démarrage des études de la première campagne et devraient être finalisés pour aborder les études cliniques de phase III (2006), ils ne seront donc présentés qu'en partie dans cet exposé.

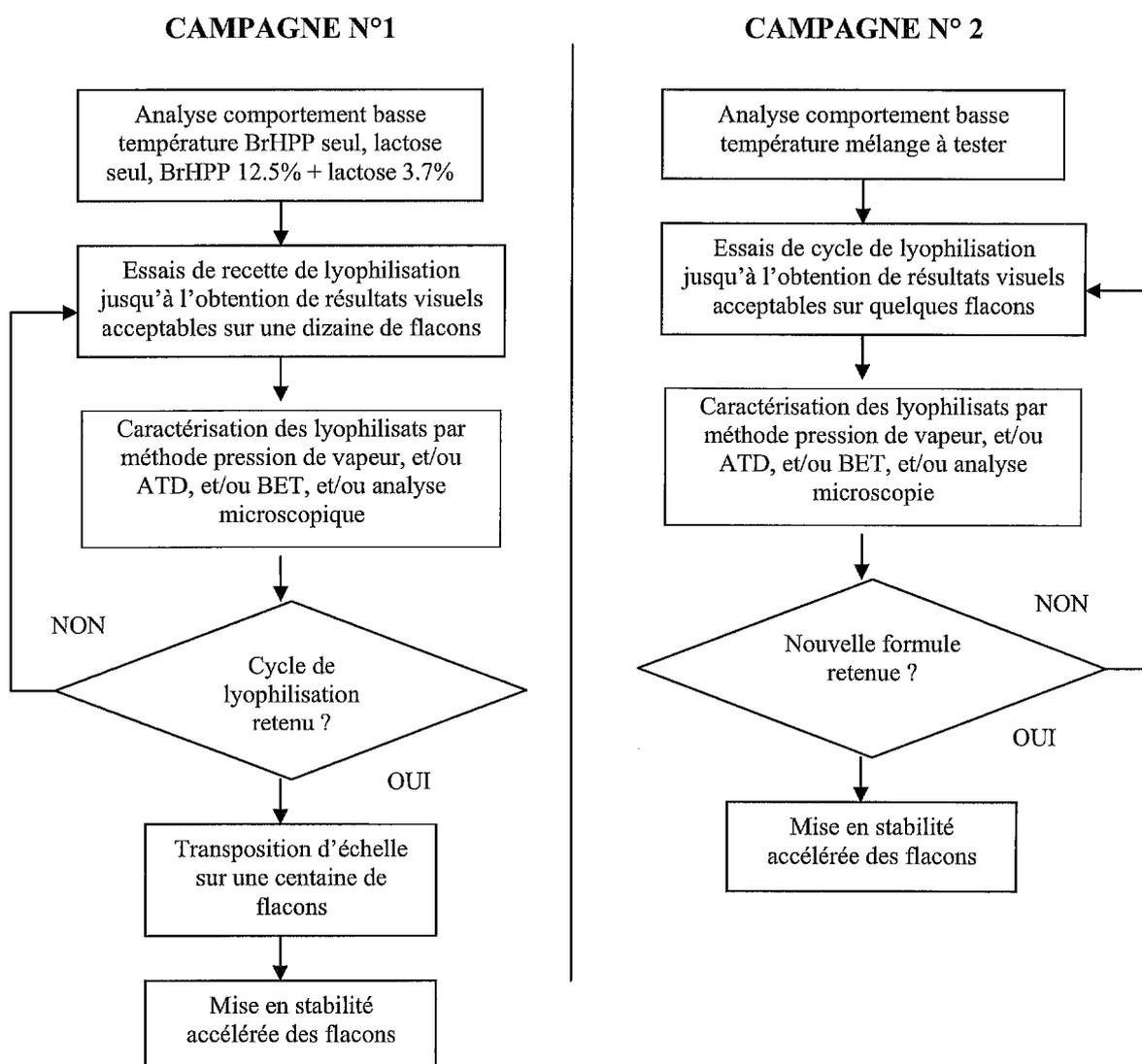
Nous présenterons, en suivant, la presque totalité des travaux menés sur l'amélioration de la recette de lyophilisation avec la formule actuelle. Nous ne pourrons par contre communiquer l'intégralité des résultats concernant les essais de nouvelles formules qui prendront fin en 2006.

L'ensemble de ces études ont été / sont réalisées en collaboration avec le Pr. Louis Rey (Lausanne, Suisse).

Partie 2.4.1 : Matériels et méthodes

Partie 2.4.1.1 : Méthode

L'organigramme suivant schématise les différentes étapes définies au démarrage des études.



Remarques :

- 1) Pour mémoire, l'objectif principal de la première campagne est de redéfinir la recette de lyophilisation en vue d'améliorer la stabilité de PHOSHOSTIM[®] 200. Quant à l'objectif secondaire, il a pour but de **réduire la durée du cycle de lyophilisation** qui avoisine les 3 jours. Durée relativement longue compte tenu de la quantité de matière au final dans le flacon.
- 2) Contrairement aux études ultérieures, la recette n'a pas été mise au point en fonction des limites techniques du lyophilisateur pilote. La possibilité de travailler chez un autre sous-traitant possédant un lyophilisateur pilote d'une plus haute technicité a été envisagée.
- 3) Dans la campagne n°2, de nouveaux excipients à de nouvelles concentrations mélangés au BrHPP ont été testés en parallèle. Le volume de répartition des formules devait être identique au volume de la formule BrHPP + lactose, c'est-à-dire 2 ml ; de manière à ce que la durée du cycle soit adaptée. Ceci signifie que la concentration maximale autorisée de la solution BrHPP + excipients ne devait pas dépasser 20%, seuil au-delà duquel le cycle de lyophilisation devrait être certainement modifié.

Partie 2.4.1.2 : Matériels

➤ **Matières premières**

1. Le BrHPP purifié, lot INP-D004-04a, ne contenait plus de solvants en quantité importante (<500 ppm), avait une pureté de 80%, et avait été filtré sur filtre 0.22 µm lors de sa synthèse dans les étapes finales. La nouvelle pureté impliquait, comme

précédemment, de réadapter la quantité de BrHPP matière sèche par flacon, i.e. $200/0.8 \approx 250$ mg. Il a été décidé de conserver la même quantité de lactose, i.e. 75 mg par flacon.

2. Les excipients utilisés ont été :

- le lactose (Fluka)
- le saccharose (Fluka)
- le mannitol (Fluka)

L'ensemble de ces excipients était de qualité Pharmacopée Européenne. Ils ont été utilisés, selon les cycles de lyophilisation, dans des proportions et des mélanges différents.

Le mannitol était reconnu pour jouer le rôle de ballast mécanique, quant au saccharose il pouvait constituer un bon tampon d'humidité.

3. Les flacons et bouchons étaient identiques à ceux utilisés précédemment.

➤ Equipements

1. Le suivi du comportement basse température des solutions citées ci-dessus a été réalisé par **analyse thermique différentielle (ATD)** et par mesure de **l'impédance électrique**. Les solutions à étudier ont été introduites dans une éprouvette, accompagnées d'une sonde pour suivi de l'impédance électrique et d'une sonde pour analyse thermique différentielle simultanément. L'observation des évènements thermique par ATD a été effectuée sur un cycle de refroidissement et un cycle de réchauffement à la vitesse moyenne de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. L'analyse de l'impédance électrique a été réalisée avec une fréquence de 1000Hz. Sur l'ensemble des résultats présentés en suivant, le tracé de la courbe $Z \cos \varphi$ représente la composante capacitive tandis que la courbe $Z \sin \varphi$ représente la composante résistive du

matériau à s'opposer au passage du courant. La température de rigidité d'un produit sera estimée avec une résistance autour de 1Mohm sur la composante $Z \sin\varphi$.

2. Le **lyophilisateur** était un TELSTAR LYOBETA 25. Une porte en plexiglas permet d'observer les flacons tout au long du cycle. Il a une capacité de 1000 flacons de 5/7 ml. Il est doté des technologies suivantes :

- une vanne d'entrée d'air dans la chambre de lyophilisation
- une valve permettant la séparation physique entre la chambre de lyophilisation et le condenseur
- des connectiques pour brancher des sondes de températures (en céramique), des sondes d'analyse d'impédance électrique, des sondes Pirani et Baratron

Les sondes d'analyse d'impédance électrique ont été introduites directement dans les flacons et ont été maintenues sur des bouchons adaptés. Ces bouchons ont été fabriqués de manière à reproduire, le plus possible, l'espace et l'ouverture qu'offrent les bouchons classiques.

Les sondes de suivi de température des produits ont été introduites au centre des solutions.

3. La pression de vapeur d'eau à l'équilibre a été analysée par la **méthode de pression de vapeur**. L'équipement utilisé était un prototype (cf. Figure 30) mis au point par le Pr. Rey, il était relié à un logiciel de suivi, en temps réel, de la température du miroir et de la quantité de lumière réfléchie.

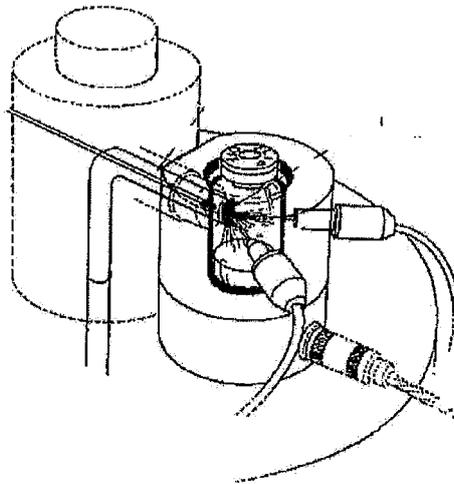


Figure 30 : Dessin de l'équipement de mesure de pression de vapeur d'après L. Rey [2]

Avant analyse les flacons ont été portés à +25°C ou +40°C pendant 30 minutes. Puis la température du miroir a été abaissée jusqu'à ce que cette dernière ait atteint la température du point de rosée. La lumière jusqu'alors réfléchi est devenue diffuse. Le récepteur a noté une diminution brusque de la quantité de lumière réfléchi. A ce point d'inflexion ont été calculée la température de rosée et donc la pression de vapeur dans le flacon.

4. L'analyse thermique différentielle sur les lyophilisats utilise le même équipement que décrit précédemment pour les analyses en solutions, seule la mise en place de la sonde diffère. Un thermocouple très fin, monté à l'extrémité distale d'une aiguille pour injection hypodermique, a été introduit dans le flacon à travers l'élastomère du bouchon et positionné au centre du flacon (cf. Figure 31). Cette technique a permis de limiter au maximum l'apport d'eau dans le flacon qui aurait biaisé les résultats. L'échantillon a été refroidi par de l'azote liquide jusqu'à -60°C puis a été réchauffé à vitesse constante (2°C/min) jusqu'à +70°C. Compte tenu de la très faible ampleur des événements thermiques, la précision des lectures devait être de l'ordre de 1/1000 de degré celsius.

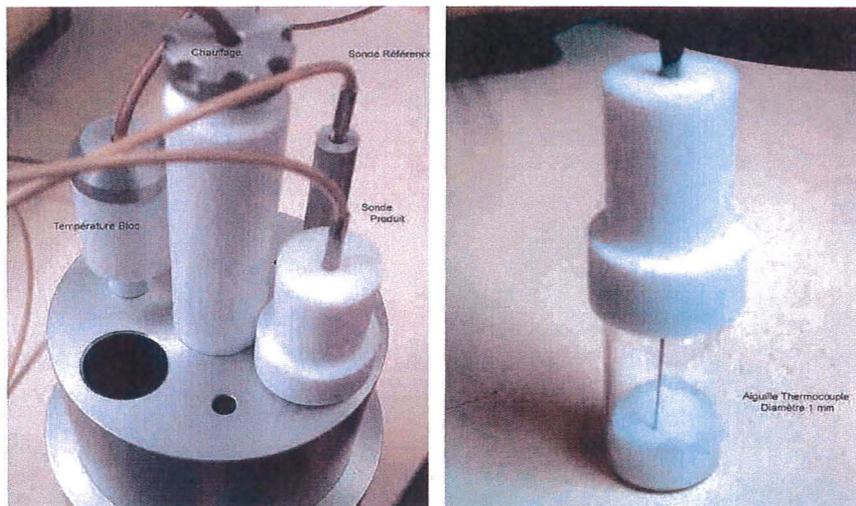


Figure 31 : Mise en place de l'échantillon sec pour analyse thermique différentielle, réalisée par le Pr. Rey.

5. La densité et les surfaces spécifiques ont été mesurées par la technique **BET** grâce à l'équipement DEN-AR-mat 1000 (STROHLEIN Instruments). Les lyophilisats ont été récupérés des flacons à l'aide d'une scie diamantée. Puis les lyophilisats ont été disposés dans une cellule d'acier hermétique. L'analyse des échantillons a nécessité la série d'étapes suivantes :

1. Pompage/Dégazage de l'échantillon jusqu'à une pression $< 8.10^{-4}$ mbar
2. Mesure de la densité par injection d'hélium
3. Immersion de l'échantillon dans l'azote liquide
4. Stabilisation de la température
5. Calibrage du système
6. Injection d'argon
7. Tracé de la courbe de sorption
8. Définition de la surface spécifique avec calcul à 2 paramètres ou à 3 paramètres

Le choix de l'argon était arbitraire, car la surface spécifique du produit était forcément inconnue à ce stade. Si les valeurs de BET ne formaient pas une droite, nous testerions un autre gaz.

6. L'analyse par **microscopie électronique** a été réalisée par MICROSCAN (Chavannes-près-Renens, Suisse) avec un microscope électronique à balayage LEICA 430i, en électrons secondaires, faisceau primaire de 20 Kv. L'étude a porté sur l'analyse de la surface supérieure, la coupe et la zone articulaire arrondie des culots. Les flacons ont été ouverts à l'aide d'un diamant, les culots ont été extraits et coupés. Les échantillons ont ensuite été directement collés avec un autocollant double face en carbone sur des porte-objets en aluminium pour microscopie électronique à balayage. Ils ont ensuite été recouverts d'une couche d'or de 5 à 10 nm d'épaisseur par pulvérisation cathodique afin d'améliorer le contraste en électrons secondaires et diminuer les effets de charge.

7. L'analyse **microscopie optique** est réalisée par le Pr. Rey. Cette analyse nécessite au préalable une inclusion en résine de l'échantillon. Cette étape préliminaire est réalisée par MICROSCAN, et a pour but de maintenir la structure originale de l'échantillon tout au long de l'analyse.

Partie 2.4.2 : Résultats

Partie 2.4.2.1 : Analyse comportement basse température

Résultats du comportement basses températures, en cours de congélation et en cours de réchauffement, des différentes solutions testées :

- « BrHPP 12.5% »,
- « lactose 3.7% »,
- « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% »,
- « BrHPP 12.5% + mannitol 5% + saccharose 2.5% » = nouvelle formule envisagée

➤ Analyse thermique différentielle :

	BrHPP 12.5%	Lactose 3.7%	BrHPP 12.5% + lactose 3.7%	BrHPP 12.5% + mannitol 5% + saccharose 2.5%
En cours de refroidissement	Cristallisation de l'eau à -8°C	Cristallisation de l'eau à -5.5°C	Cristallisation de l'eau à -9°C	Cristallisation de l'eau à -9°C
En cours de réchauffement	Fusion de la glace à -12°C	Fusion de la glace à -8°C	Fusion de la glace à -12°C	Fusion de la glace à -17°C

Table 8 : Résultats des analyses thermiques différentielles en refroidissement et en réchauffement sur les mélanges « BrHPP 12.5% », « lactose 3.7% », « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% », « BrHPP 12.5% + mannitol 5% + saccharose 2.5% »

Note : observation d'un très léger phénomène endothermique en réchauffement vers -36°C pour la solution de BrHPP seul qui paraît sans signification.

➤ Analyse de l'impédance électrique :

	BrHPP 12.5%	Lactose 3.7%	BrHPP 12.5% + lactose 3.7%	BrHPP 12.5% + mannitol 5% + saccharose 2.5%
En cours de refroidissement	Rigidité (1Mohm) atteint à -38°C	Rigidité (1Mohm) atteint à -16°C	Rigidité (1Mohm) atteint à -36°C	Rigidité (1Mohm) atteint à -35.5°C
En cours de réchauffement	Rigidité (1Mohm) perdue à -38.5°C	Rigidité (1Mohm) perdue à -13.5°C	Rigidité (1Mohm) perdue à -36°C	Rigidité (1Mohm) perdue à -36°C

Table 9 : Résultats des analyses d'impédance électrique en refroidissement et en réchauffement sur les mélanges « BrHPP 12.5% », « lactose 3.7% », « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% », « BrHPP 12.5% + mannitol 5% + saccharose 2.5% »

Pour la solution de BrHPP seul, le solvant, l'eau commence à cristalliser à une température relativement basse et de manière régulière (cf. Table 8). Le soluté se rigidifie à une température beaucoup plus basse **sans signe d'état vitreux** (cf. Figure 32). Lors du réchauffement la solution se comporte à l'identique, il n'y a **pas d'hystérésis** entre les deux courbes de refroidissement et réchauffement (cf. Figure 32 et Figure 33). C'est à dire que la température maximum appliquée pendant la sublimation (T_{im}) sera la même que la température de solidification totale du mélange (T_{cs}).

Le mélange avec le lactose ou mannitol/saccharose donne des résultats très similaires. Le comportement de *la molécule BrHPP « prend le dessus » sur le mélange* malgré l'augmentation de la quantité d'excipient dans la formule mannitol/saccharose. Mais il est vrai que la molécule BrHPP reste majoritaire dans le ratio BrHPP/excipients.

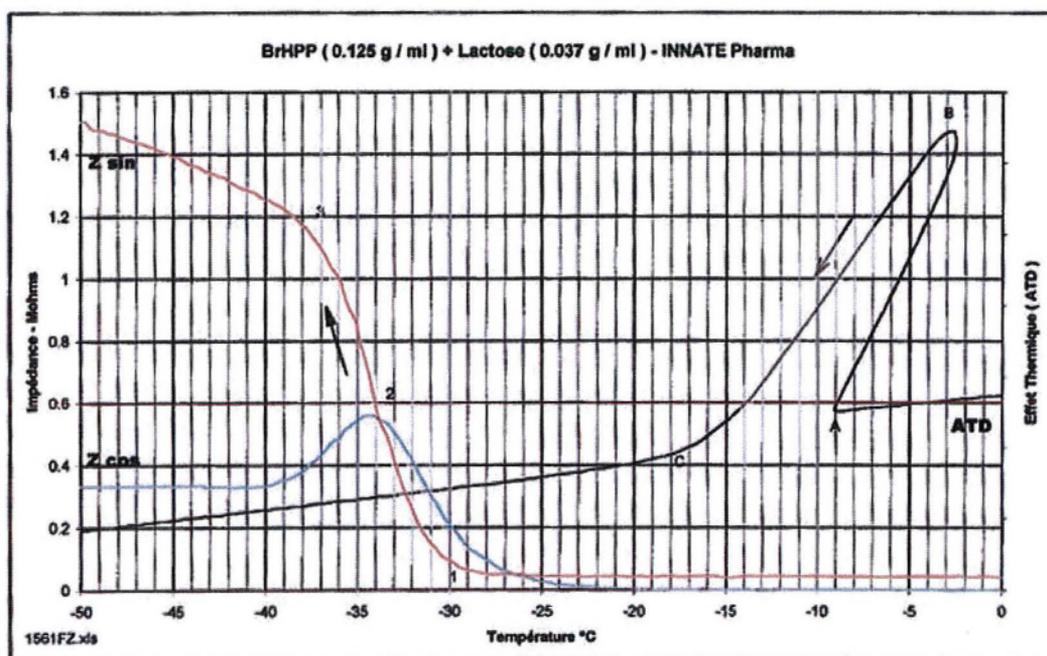


Figure 32 : Tracés de l'analyse de l'impédance électrique (Z_{sin} , Z_{cos}) ; tracé de l'analyse thermique différentielle (ATD) pour la formule « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » en cycle de refroidissement. Le pic exothermique révélé en ATD correspond à la cristallisation de l'eau, la brusque montée d'impédance en Z_{sin} et en Z_{cos} correspond à la solidification du soluté.

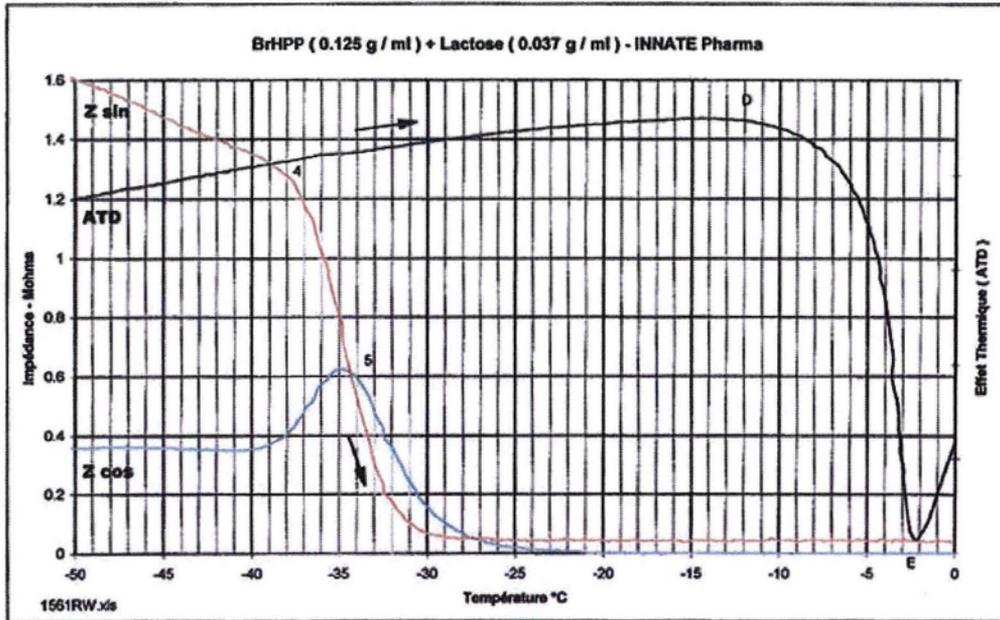


Figure 33 : Tracés de l'analyse de l'impédance électrique (Z_{\sin} , Z_{\cos}) ; tracé de l'analyse thermique différentielle (ATD) pour la formule « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » en cycle de réchauffement. Le pic endothermique révélé en ATD correspond à la fusion l'eau, la brusque perte d'impédance en Z_{\sin} et en Z_{\cos} correspond à la perte de solidification du soluté.

Suite à ces résultats, il a été décidé de ne pas réaliser de nouvelles analyses du comportement basse température, puisque comme expliqué précédemment le pourcentage d'excipients dans ces études ne pouvaient dépasser 20%. Par la suite, nous avons toujours considéré **la température de solidification du BrHPP 12.5% comme étant la température de solidification totale (T_{cs})** quelque soit le mélange, dans la mise au point des recettes de lyophilisation.

Le mélange « BrHPP 12.5% + mannitol 5% + saccharose 2.5% » n'apporte aucune amélioration sur le comportement basse température comparé à la formule BrHPP + lactose. Mais par contre il n'est pas impossible que sur le plan structural, la présence de mannitol confère une meilleure stabilité et que celle du saccharose limite la liaison avec l'eau résiduelle.

La solution étudiée semble fragile avec assouplissement interstitiel important dès -35°C . Il paraît donc souhaitable de traiter le produit **en dessiccation primaire vers $-35^{\circ}\text{C}/-38^{\circ}\text{C}$** et en tout cas à une température inférieure à -30°C . Pour réaliser **un cycle court**, la pression dans l'enceinte sera augmentée, lors de la sublimation, de manière à favoriser les échanges thermiques par convection.

Partie 2.4.2.2 : Essais de recettes de lyophilisation

➤ Cycle de lyophilisation LT103

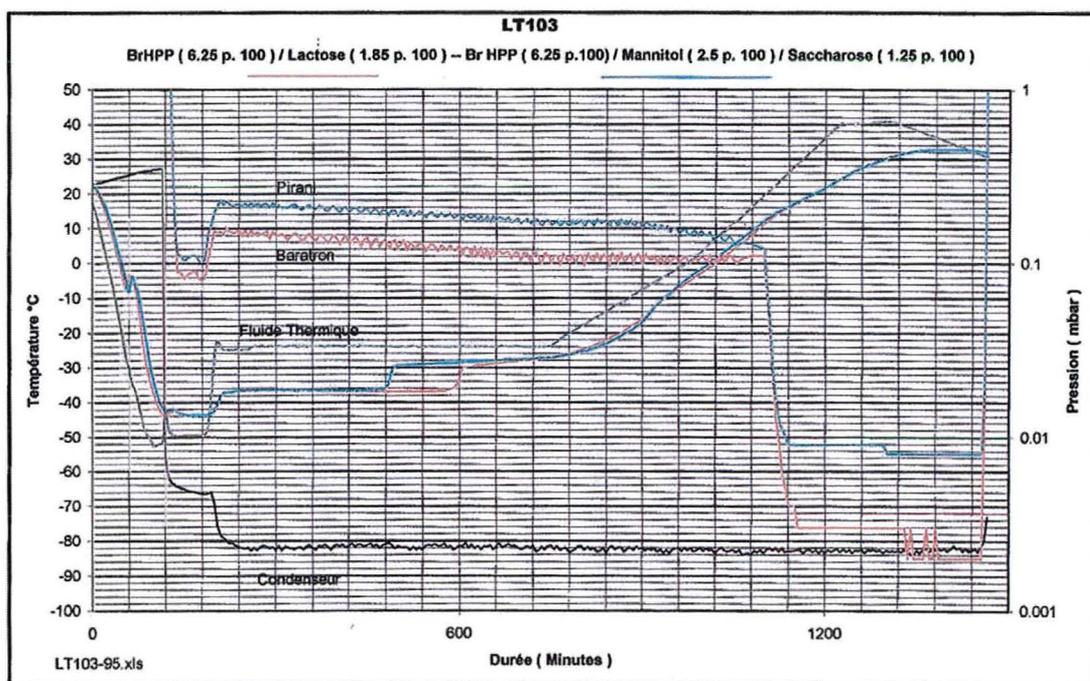


Figure 34 : Cycle de lyophilisation LT103 mis au point par le Pr. Rey. Tracé rouge : sonde d température dans la formule BrHPP + lactose tracé bleu : sonde d etempérature dans la formule BrHPP + mannitol + saccharose

Comme le montre la Figure 34, Lors du démarrage de la sublimation, après baisse de la pression, est provoquée simultanément à la remontée en température des étagères, une

injection d'air contrôlée pour faire remonter la pression et permettre, donc, de favoriser le transfert de chaleur par convection. Puis cette pression est diminuée progressivement durant toute la sublimation.

L'enregistrement des températures des produits montre que la solution de lactose se sublime un peu plus lentement (cf. Figure 34, tracé rouge), la dessiccation primaire prenant environ deux heures de plus.

L'examen du comportement de la jauge Pirani montre que la **sublimation n'est pas terminée** lorsque la désorption est programmée (= montée en température des étagères). En effet la pression de la jauge Pirani n'a pas encore rejoint la pression indiquée par la jauge capacitive (Baratron).

Les lyophilisats obtenus présentent de **mauvais résultats à l'examen visuel**. Les pastilles sont **rétractées** et présentent des signes de cavitation intense ou de bullage.

Le produit semble être monté en température trop rapidement en sublimation. Le cycle est trop court : la **dessiccation primaire est conduite trop rapidement** et n'est pas terminée au moment de la remontée en température des étagères. Le produit, alors, en présence d'une trop grande quantité de molécules d'eau libre doit s'effondrer au moment de la remontée en température des étagères en dessiccation secondaire.

➤ Cycle de lyophilisation LT104

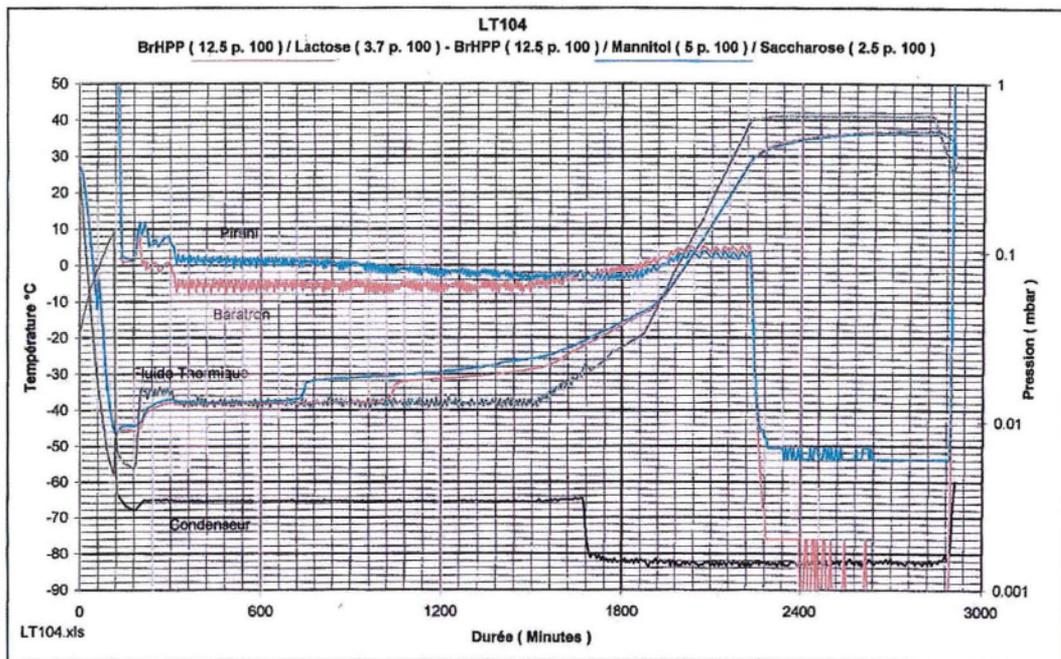


Figure 35 : Cycle de lyophilisation LT104 mis au point par le Pr. Rey,

Le fluide thermique est maintenu à -38°C pendant 20 heures puis élevé très progressivement jusqu'à -20°C , comme décrit dans la Figure 35. La pression de travail a été augmentée comme précédemment au démarrage de la sublimation mais de façon beaucoup moins importante et sur un temps très réduit pour être rapidement ramenée à 0.08mbar ; ceci limite la montée en température des produits. Durant la phase de dessiccation primaire, la température des flacons dépasse la température des étagères, comme observé chez ARCHEMIS. Ce comportement atypique doit être dû au transfert de chaleur par radiation important du fait d'un taux de remplissage du lyophilisateur très faible.

Les résultats sont **incontestablement meilleurs**, les pastilles sont **homogènes** sans trace de cavitation. Le gâteau avec lactose présente une **légère rétractation** et pour les deux formules un léger décollement annulaire dans la partie basale.

➤ Cycle de lyophilisation LT105

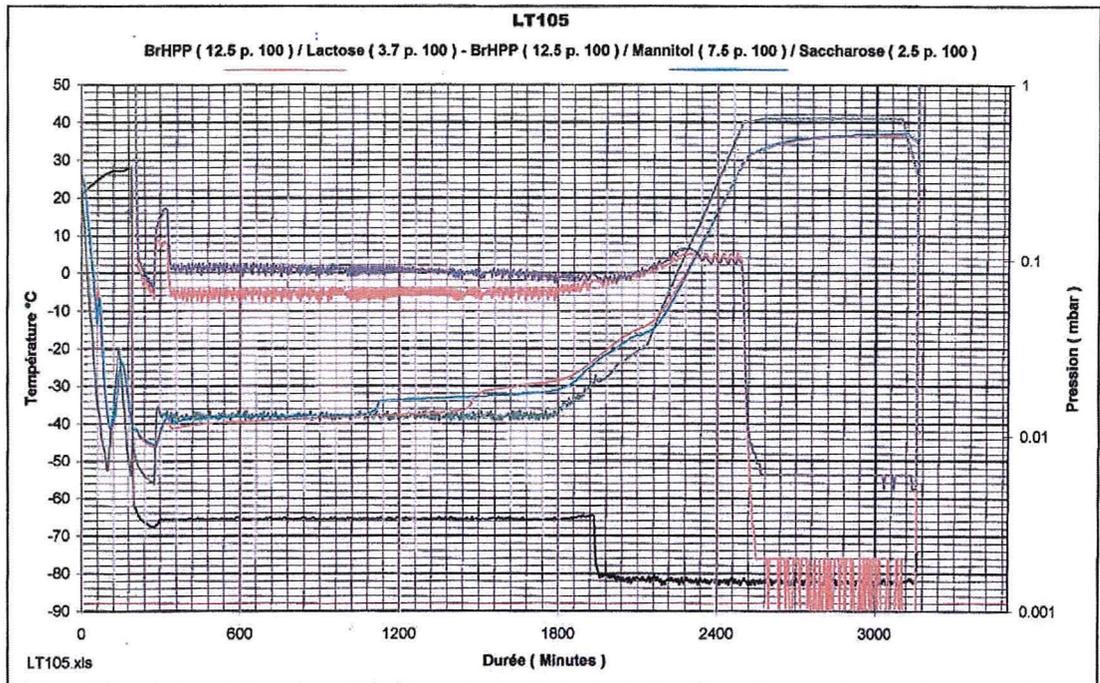


Figure 36 : Cycle de lyophilisation LT105 mis au point par le Pr. Rey

Un nouvel essai a été réalisé pour voir si un maintien à température basse plus longtemps et un **traitement thermique** préalable (recuit) pouvait encore améliorer la situation.

Le traitement thermique est mis en place pour la formule avec mannitol, cela permet d'anticiper tout risque de cristallisation inattendue du mannitol durant la conservation du lyophilisat ou durant le cycle.

Les résultats **n'ont pas été sensiblement améliorés**, sans doute parce qu'avec un fluide thermique à -38°C pendant 5 heures supplémentaires, la fin de sublimation n'a pas été facile.

➤ Cycle de lyophilisation LT106

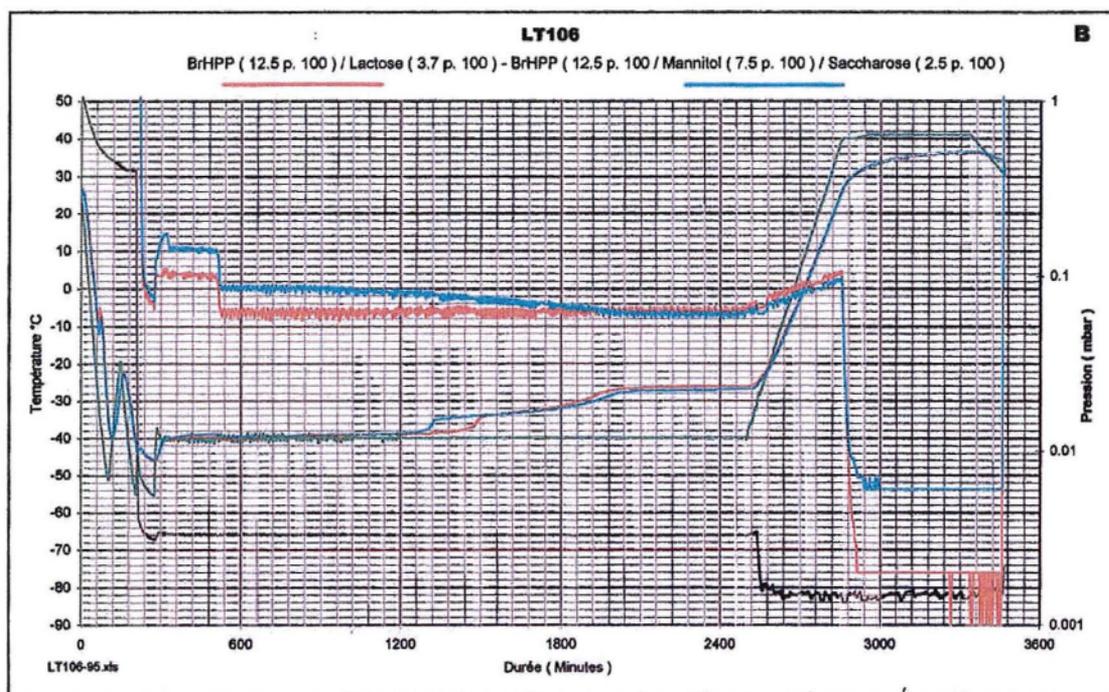


Figure 37 : Cycle de lyophilisation LT106 mis au point par le Pr. Rey

Un essai supplémentaire a porté sur un cycle long dont la phase « sublimation » a été prolongée à basse température.

Le cycle a les caractéristiques suivantes :

- **Un traitement thermique** programmé durant la phase de congélation,
- Une phase de dessiccation primaire d'une durée de 37 heures pendant laquelle le fluide est maintenu à -40°C,
- Une remontée rapide en dessiccation secondaire de -40°C à +40°C en 6 heures,
- Une phase de désorption sous vide poussé d'environ 10 heures se terminant à une température de +30°C.

Les résultats sont bons. Les meilleurs sont pour la solution BrHPP + lactose. La présence de saccharose dans la formule semble en effet exercer un effet négatif sur la structure du

produit sec qui présente des traces de cavitation. La pastille de BrHPP + lactose est **légèrement rétractée en partie basale mais elle est homogène**, finement poreuse avec des surfaces nettes.

Les lyophilisats obtenus dans ce dernier cycle sont analysés par la technique de pression de vapeur. Sont donc présentées dans la Table 10, les températures des échantillons au point de rosée.

Lyophilisats	Lactose	Mannitol/saccharose	BrHPP+lactose	BrHPP+mannitol/saccharose
Température	<-50°C	-26°C	-46°C	-7°C

Table 10 : Mesure pression de vapeur au point de rosée

Ces mesures montrent que la présence de BrHPP augmente de façon significative la teneur en eau dans le produit final. La présence de lactose semble stabiliser le lyophilisat à des humidités résiduelles inférieures à 1% et sans doute voisine de 0.6%. Il ne paraît donc pas nécessaire de prolonger la phase de dessiccation secondaire pour la formule BrHPP + lactose. La formule BrHPP mannitol/saccharose contient une quantité d'eau libre plus importante.

L'augmentation importante d'eau par la présence du mélange mannitol/saccharose n'est certainement pas très favorable au produit, cette formule est abandonnée.

Aux vues de l'ensemble de ces résultats la formule envisagée BrHPP 12.5% + mannitol 5%+ saccharose 2.5% est abandonnée, elle ne semble apporter aucun bénéfice.

➤ Cycle de lyophilisation LT108

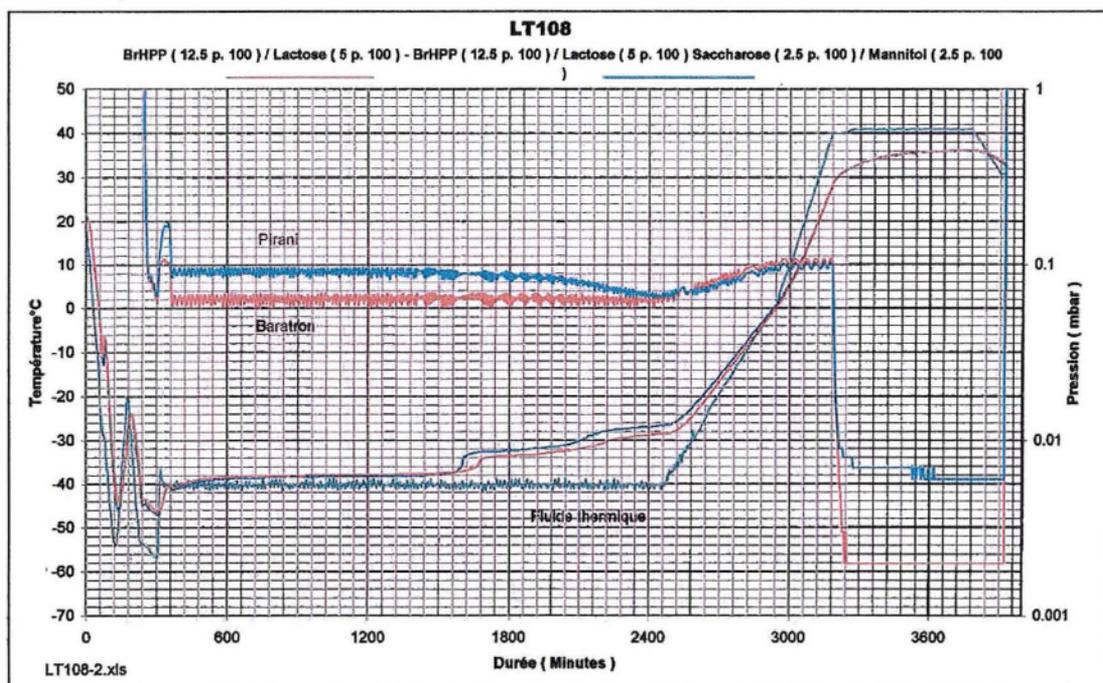


Figure 38 : cycle de lyophilisation LT108 mis au point par le Pr. Rey

Malgré de bons résultats visuels obtenus avec le cycle précédent, cycle 108, nous avons décidé de réaliser un essai supplémentaire en introduisant, une **sonde de suivi de l'impédance électrique** dans la formulation BrHPP + lactose, pour suivre le comportement du produit tout au long du cycle. Cela permet de s'assurer tout d'abord que les états physiques recherchés lors du traitement thermique sont bien atteints, mais aussi que le produit ne fait pas l'objet de fusion interstitielle lors de la phase de sublimation qui pourrait peut-être expliquer la rétraction du produit en partie basale.

Dans ce cycle sont introduites deux nouvelles formules :

- BrHPP 12.5% + lactose 5% + saccharose 2.5%
- BrHPP 12.5%+ lactose 5% + saccharose 2.5% + mannitol 2.5%

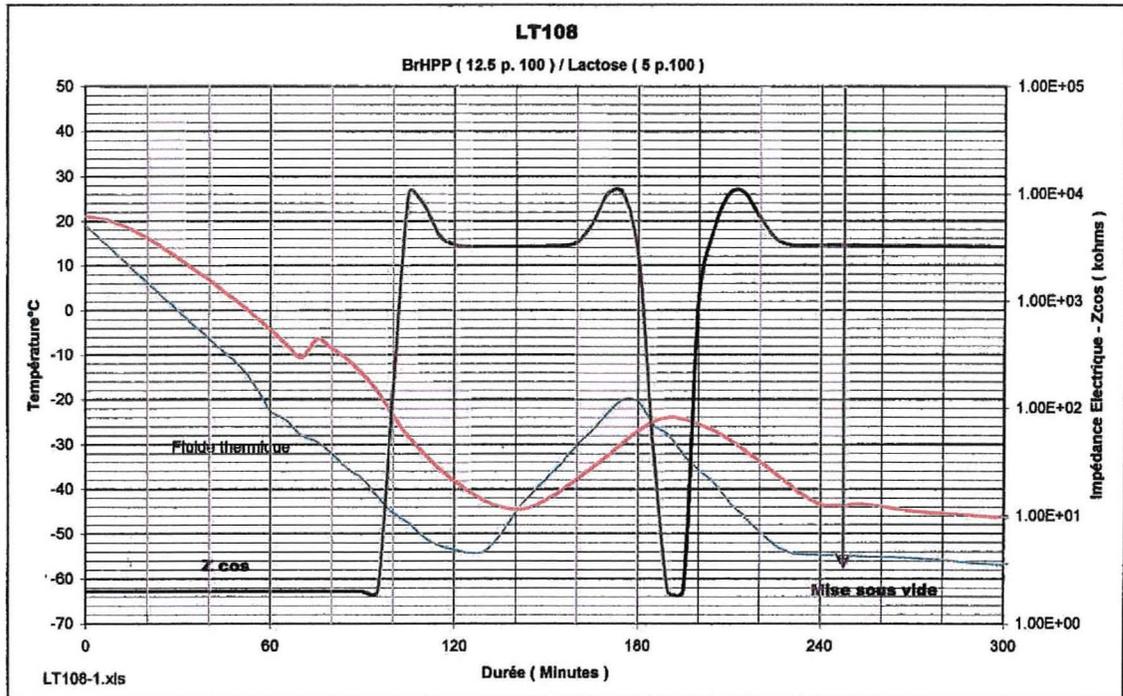


Figure 39 : Suivi de l'impédance électrique de la formule « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » en cours de congélation sur le cycle LT108

Au cours de ce cycle, l'impédance électrique mesurée en $Z \cos \varphi$ présente la variation attendue (cf. Figure 39). Lorsque le soluté atteint sa température de solidification totale, la résistance, indiquée par le tracé $Z \cos$, augmente rapidement pour atteindre 3.5 Mohms. Lors du traitement thermique le produit est réchauffé à une température supérieure à sa température de fusion naissante, ceci est confirmé par la chute brutale de la résistance. Enfin le produit est de nouveau recongelé à une température inférieure à sa température de solidification, la résistance remonte donc à 3.5 Mohms. Ce suivi donne la confirmation que le produit a suivi les changements d'états recherchés par le traitement thermique. Pour information la résistance du produit a été maintenue tout le long du cycle à 3.5 Mohms (résultats non présentés). Aucune fusion interstitielle n'a été relevée avec la sonde de suivi d'impédance.

La formule BrHPP + lactose donne une pastille homogène, finement poreuse, mais toujours légèrement rétractée dans sa partie basale qui présente un léger sillon (cf. Figure 40).

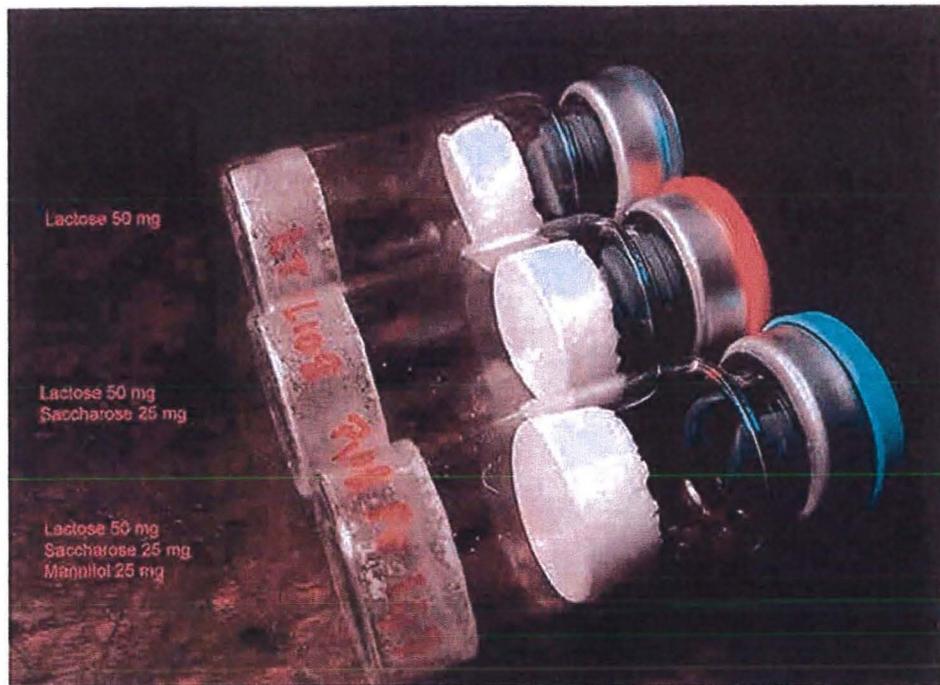


Figure 40 : Photographie des lyophilisats obtenus avec le cycle LT108

La formule BrHPP + lactose+ saccharose donne une pastille homogène mais faiblement rétractée dans sa partie basale qui présente quelques crénelures périphériques (cf. Figure 40).

La formule BrHPP + lactose + saccharose + mannitol offre une pastille parfaite et ne montre aucune trace de cavitation (cf. Figure 40).

Il est important de noter que la rétraction observée en partie basale se forme toujours **en fin de sublimation**.

Les résultats de teneur en eau sont les suivants :

Lyophilisats	BrHPP + lactose	BrHPP + lactose + saccharose	BrHPP + lactose + saccharose + mannitol
Température de condensation (°C)	-42°C	-43°C	-28°C

Table 11 : Mesure de la pression de vapeur pour les lyophilisats du cycle LT108

Les pressions de vapeur sont très faibles (cf. Table 11), notamment pour les formules avec lactose et lactose/saccharose. Ces températures de condensation doivent correspondre à des teneurs en eau résiduelle inférieures à 0.5%. La formule avec mannitol a une température de condensation plus élevée, le mannitol doit tamponner l'eau libre dans la formule. Ceci peut être compatible avec une bonne stabilité, le mannitol peut « prendre en charge » les molécules d'eau libre provenant de l'extérieur ou des bouchons.

Les lyophilisats obtenus, possédant d'assez bonnes caractéristiques, sont analysés par **analyse thermique différentielle (ATD)**, ceci afin de déterminer leur température de transition vitreuse.

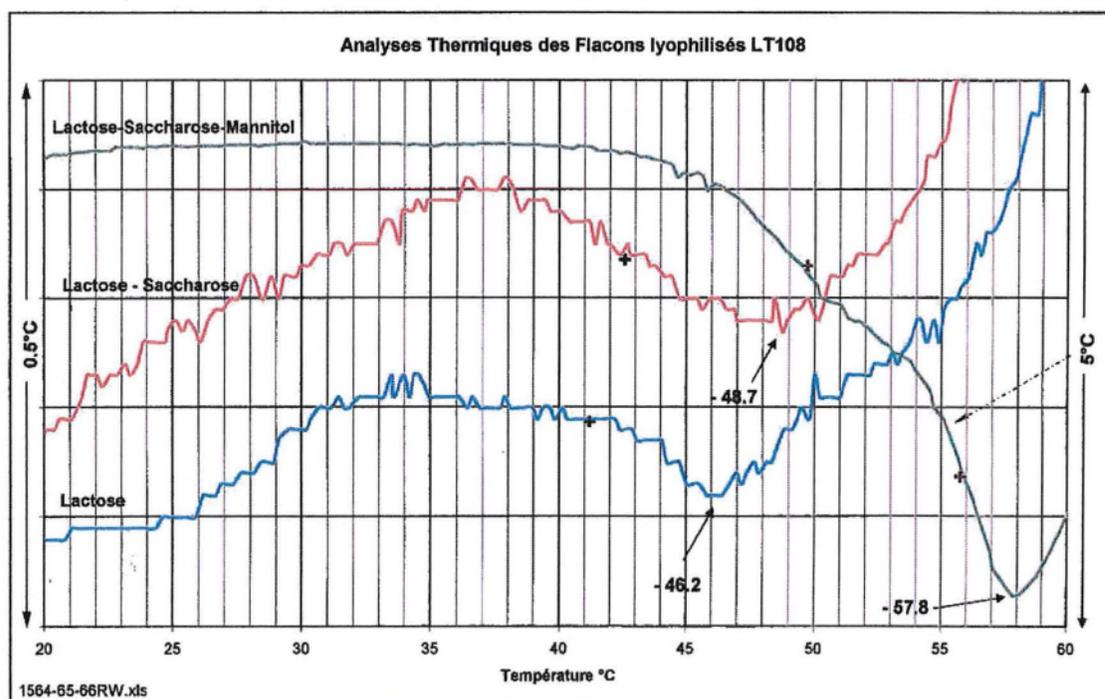


Figure 41 : Analyse thermique différentielle en cours de réchauffement sur les lyophilisats obtenus avec le cycle LT108. La croix correspond à la température mesurée de transition vitreuse

A noter la sensibilité pour le tracé des courbes (cf. Figure 41), pour les solutions BrHPP + lactose et BrHPP + lactose + saccharose est très bonne, de l'ordre de 0.5°C; pour la solution BrHPP + lactose + saccharose + mannitol, elle est de 5°C. Ceci explique le rendu visuel des courbes : plus lissé pour la formule BrHPP + lactose + saccharose + mannitol.

La transition vitreuse mesurée est plus élevée pour le lyophilisat BrHPP + lactose + saccharose + mannitol (cf. Table 12). Pour les trois cas un phénomène exothermique fait suite à la transition vitreuse.

Lyophilisats	BrHPP + lactose	BrHPP + lactose + saccharose	BrHPP + lactose + saccharose + mannitol
Température de transition vitreuse	41°C	42.5°C	Verre n°1 : 50°C Verre n°2 : 56°C

Table 12 : Température de transition vitreuse mesurée par ATD sur les lyophilisats du cycle LT108. Pour le lyophilisat « BrHPP +lactose + mannitol + saccharose » la transition est double, existence de deux système vitreux.

La transition vitreuse qui mène à des verres instables est alors suivie d'une relaxation exothermique rapide dans les trois cas. Sur la seule base thermodynamique, le système BrHPP – ballast est apparemment invariant jusqu'à +35°C est contient des verres qui se transforment entre 35°C et 45°C pour les lyophilisats BrHPP + lactose et BrHPP + lactose + saccharose ; et entre 45°C et 57°C pour les lyophilisats BrHPP + lactose + saccharose + mannitol, sans doute de façon réversible. Et pour étudier ce phénomène de **réversibilité des verres**, les lyophilisats BrHPP + lactose et BrHPP + lactose + saccharose + mannitol sont réchauffés jusqu'à 70°C puis refroidis à -60°C et enfin analysés en cours de réchauffement.

Tracé pour les lyophilisats BrHPP + lactose + saccharose + mannitol :

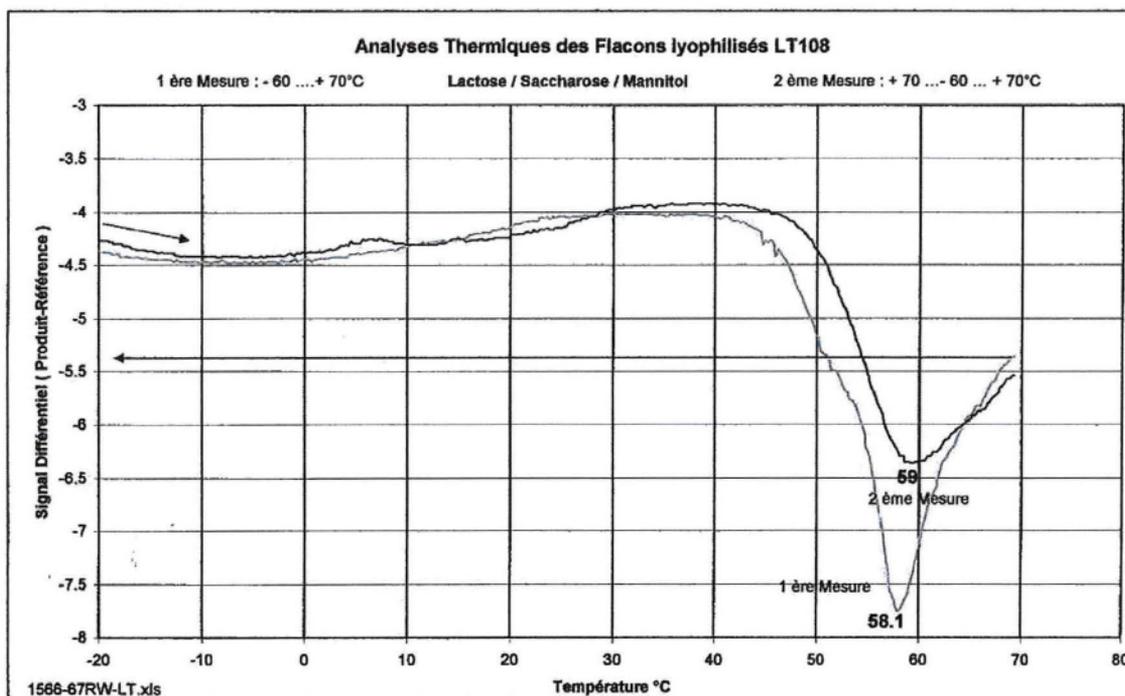


Figure 42 : Analyse thermique différentielle en cycle de réchauffement sur le lyophilisat « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% + saccharose 2.5% + mannitol 2.5% » ; tracé en vert : 1^{ère} mesure, tracé en noir : deuxième mesure après refroidissement.

Le verre n°2, à 56°C, semble avoir disparu ; mais il reste une masse vitreuse importante qui se transforme de façon réversible entre 45°C et 59°C (cf. Figure 42). Il apparaît également que le pic exothermique perdure mais de façon moins intense. Cela tendrait à faire penser qu'une partie du lyophilisat seulement, est resté sous forme de verre « liquide », état réversible, et une partie s'est stabilisée par cristallisation ou par un autre phénomène de relaxation exothermique irréversible. Ainsi au deuxième passage de la transition vitreuse seulement une partie du lyophilisat est modifié.

Tracé pour les lyophilisats BrHPP + lactose

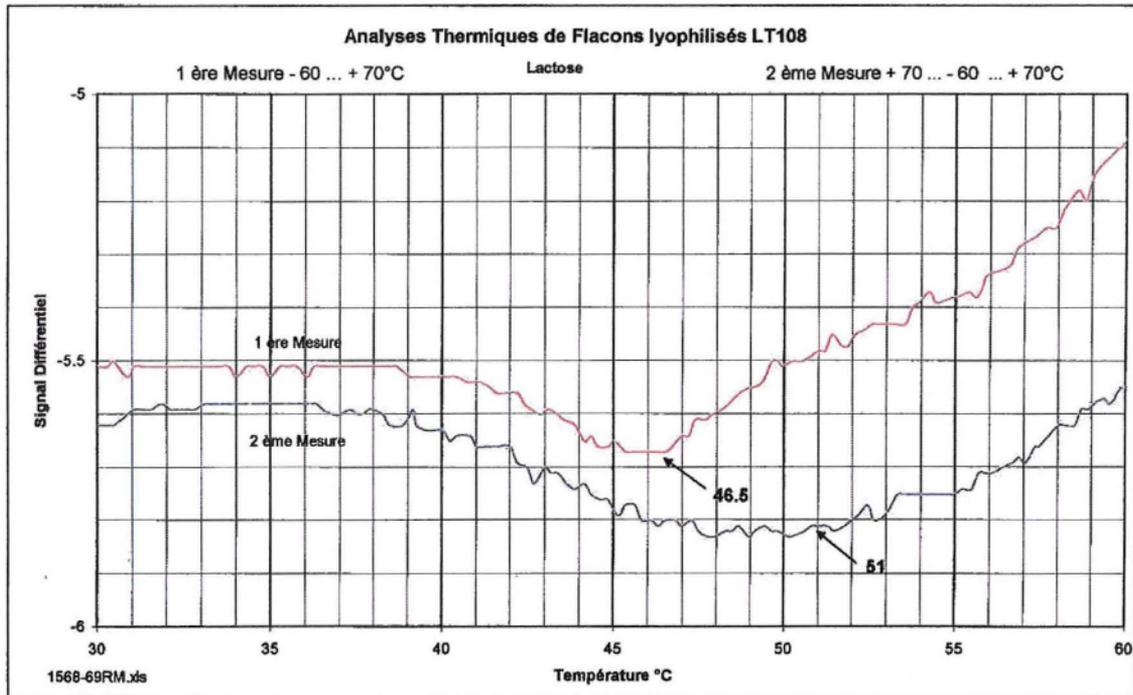


Figure 43 : Analyse thermique différentielle en cycle de réchauffement sur lyophilisat « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » ; tracé en rouge : première mesure, tracé en bleu : deuxième mesure après refroidissement.

Dans ce cas la transformation vitreuse est pratiquement inchangée pour la deuxième mesure. Le démarrage du phénomène exothermique se fait à 51°C au lieu de 46.5°C.

Ces résultats montrent tout d'abord, qu'il ne serait **pas prudent de conserver le produit au dessus de 40°C** pour les lyophilisats BrHPP + lactose et BrHPP + lactose + saccharose ; et au dessus de 50°C pour le lyophilisat BrHPP + lactose + saccharose + mannitol. Donc ces lyophilisats, et d'autant plus la formule avec mannitol dont la température de transition vitreuse est la plus élevée, devrait être stable d'un point de vue thermodynamique, à +25°C. Mais ces éléments doivent être complétés par des données de stabilité pour être confirmés.

Partie 2.4.2.3 : Transposition d'échelle

Aux vues des résultats obtenus avec le cycle LT106 et le cycle LT108 nous passons à l'étape de transposition d'échelle.

➤ Cycle de lyophilisation 113:

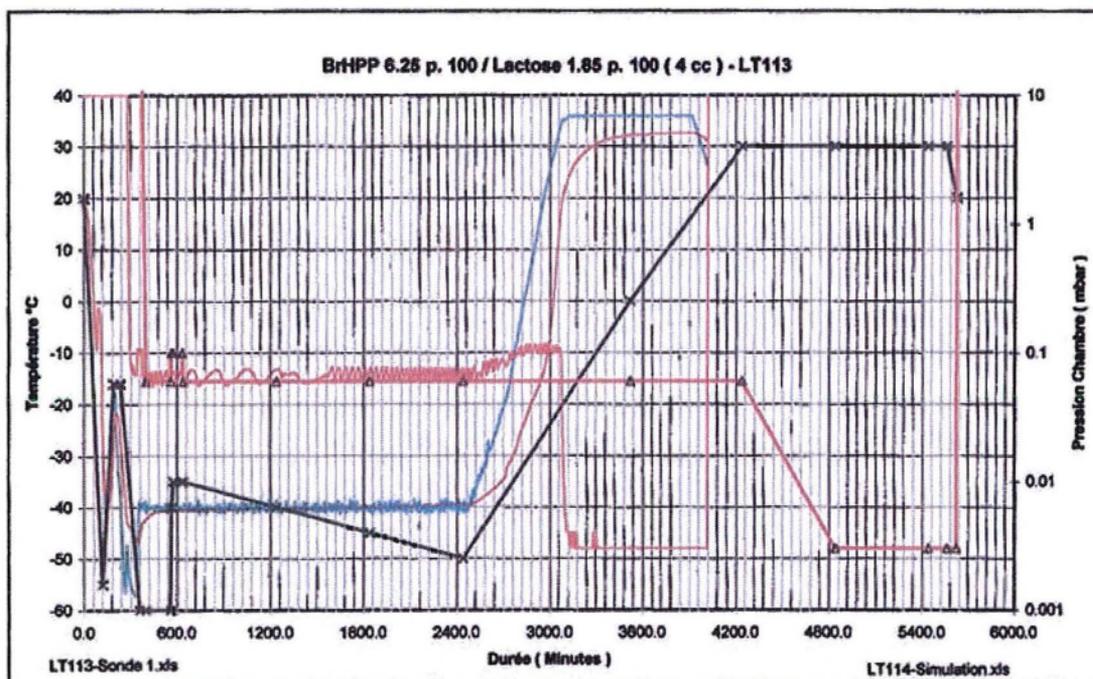


Figure 44 : Cycle de lyophilisation LT113 mis en œuvre par le Pr. Rey, concernant les pressions : tracé en rose : sonde de pression Baratron, en rouge : la consigne de pression, concernant la température : tracé en bleu : température des étagères, tracé en rouge : température du produit. Remarque : le trait épais noir ne correspond pas au cycle LT113.

Ce cycle a été mis en place pour lyophiliser **un plus grand nombre de flacons** environ une centaine. Ceci pour réaliser des études de stabilité et tester la recette en transposition d'échelle.

Une autre formule a été introduite : « BrHPP 12.5% + mannitol 10% ».

Le suivi de la température des produits lors de la sublimation permet de montrer que la température des produits n'excède plus la température des étagères. Ceci est dû au taux de remplissage beaucoup plus conséquent du lyophilisateur.

Résultats :

30% des flacons BrHPP 12.5% + lactose 3.7% ont **un aspect détérioré**. Une partie du lyophilisat a perdu sa structure ; il a fondu partiellement. La recette appliquée est strictement la même que celle utilisée pour les essais précédents. Les autres flacons, représentant 70% du lot sont bons. Ils ont strictement le même aspect que ceux analysés précédemment. Les lyophilisats avec mannitol ne sont pas bons, ils ont également partiellement fondus.

Comment expliquer cette **hétérogénéité de résultats** inter flacons ?

Les « mauvais flacons » se sont formés de manière **aléatoire** sur l'étagère. Aucun lien entre l'emplacement et l'aspect du lyophilisat ne peut être établi. L'équipement ne peut être remis en cause, le problème est donc **inhérent à la formule**, en l'occurrence au BrHPP. L'observation visuelle des lyophilisats lors du déroulement du cycle a montré que les lyophilisats perdaient leur structure lors de la phase finale de lyophilisation. Cette étape est critique. La sublimation est peut-être menée trop rapidement.

Les lyophilisats avec un aspect correct ont été analysés par microscopie électronique pour connaître leur structure et analyser leur fragilité qui justifie d'une telle sensibilité. L'analyse des lyophilisats jugés non-conformes n'apportait pas beaucoup d'éléments puisque l'observation visuelle suffit à les analyser comme fondus.

- Analyse en surface des échantillons



Figure 45 : Analyse par microscopie électronique de la surface des échantillons « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » obtenus avec le cycle LT113, réalisée par MICROSCAN.

Les espaces vides laissés par les molécules d'eau sublimées et désorbées sont de petites tailles et légèrement angulaires (cf. Figure 45). La surface n'est donc pas aérée, et l'étroitesse des espaces ne doit pas rendre la sublimation facile. Ceci pourrait expliquer la durée relativement longue de l'étape de sublimation.

- Analyse en coupe



Figure 46 : Analyse par microscopie électronique en coupe des échantillons « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » obtenus avec le cycle LT113, réalisée par MICROSAN.

L'analyse en coupe, Figure 46, révèle une structure filamenteuse amorphe et quelques régions de rassemblement d'un réseau aux formes angulaires qui pourrait laisser penser à une structure cristalline, mais cela est à confirmer par microscopie optique. La structure filamenteuse serait affiliée au lactose tandis que la structure cristalline au BrHPP. La présence d'une structure filamenteuse signifie que le produit n'a pas subi de fusion lors de la sublimation, sinon une structure aussi fine n'aurait pu être conservée.

- Zone articulaire arrondie

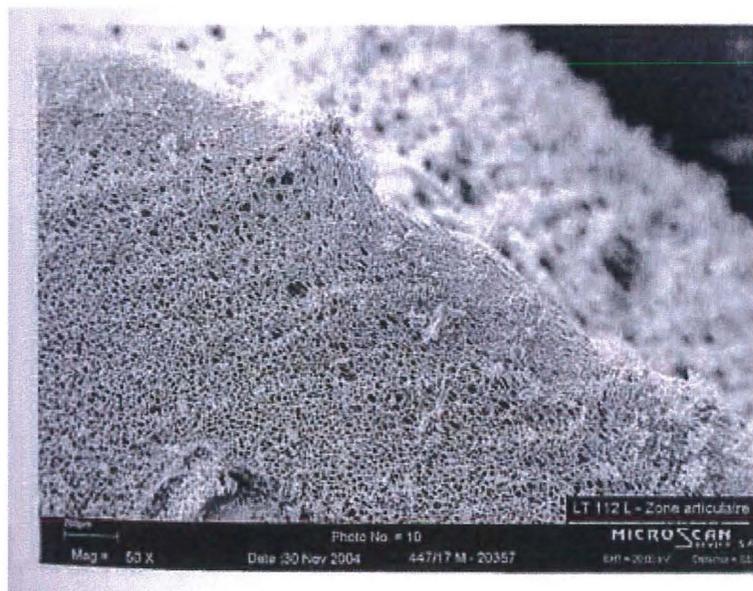


Figure 47 : Analyse par microscopie électronique de la zone articulaire des lyophilisats « BrHPP 12.5% + lactose 3.73 » obtenus avec le cycle LT113, réalisée par MICROSAN.

Cette zone correspond strictement à partie rétractée du lyophilisat en fond de flacon. L'analyse, Figure 47, montre en effet une structure différente de celle du milieu d'échantillon. Les espaces laissés libres par les molécules d'eau sont petits, ce qui signifie

que les cristaux étaient petits. La structure d'ensemble correspond à un empilement à organisation lamellaire.

Etant donné la taille des cristaux d'eau la vitesse de sublimation locale doit être très ralentie. Ces analyses révèlent deux points majeurs :

- la répartition intra flacon des cristaux d'eau est hétérogène,
- la vitesse de sublimation est nettement ralentie à l'approche de la partie basale des flacons.

Le Pr. Rey propose de mettre au point, d'une part, un cycle avec *un traitement thermique d'une durée plus élevée*, et d'autre part de maîtriser la vitesse de sublimation et l'apport de chaleur au produit par la mise en place d'une *sublimation inversée*. Cette dernière technique consiste à diminuer la température des étagères au cours de la sublimation, ceci de manière à ralentir la vitesse moyenne et à laisser le temps au produit de lyophiliser correctement. Quant à la durée prolongée du traitement thermique, cela pourrait améliorer l'homogénéité des cristaux de glace.

➤ Cycle de lyophilisation 114

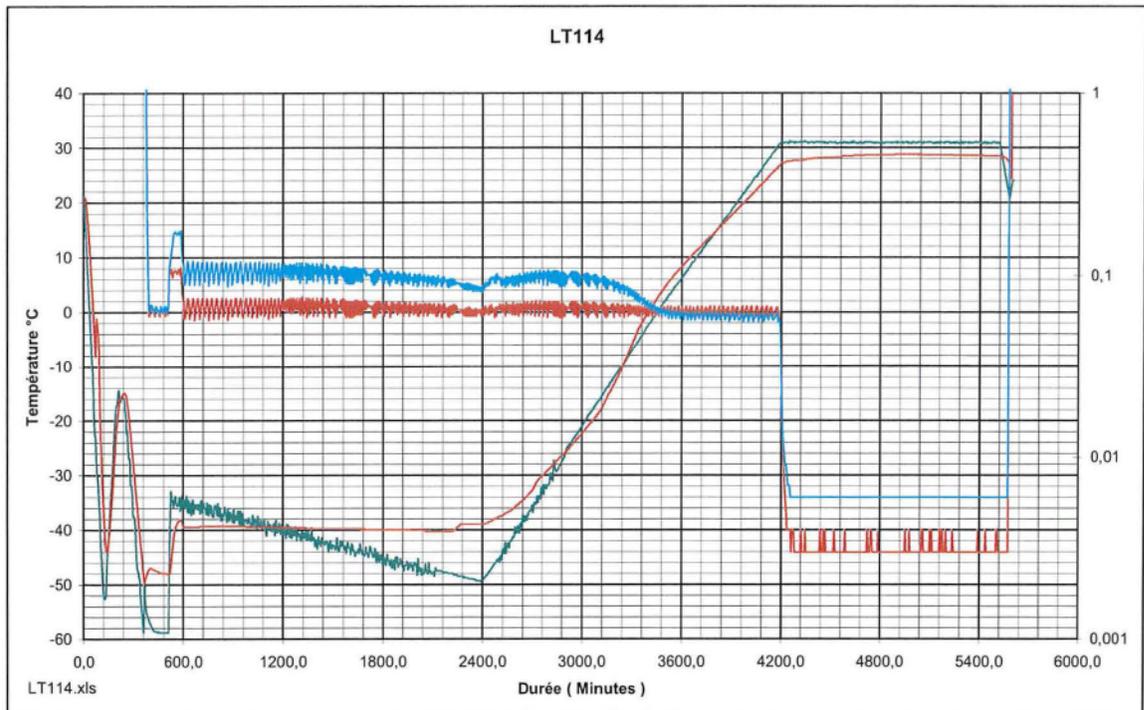


Figure 48 : Cycle de lyophilisation LT114 réalisé par le Pr. Rey

Les nouveautés apportées (cf. Figure 48) :

- Le palier du traitement thermique à -16°C est programmé sur 50 minutes, auparavant les étagères étaient portées à -18°C puis immédiatement refroidies.
- La température des étagères en début de sublimation est portée à -35°C pour atteindre -45°C en fin de sublimation.

Analyse des lyophilisats

Les lyophilisats sont bons. Ils ne sont **pas rétractés** dans leur partie basale (cf. Figure 49).

Ils sont **totalemt homogène** et ceci pour les formules lactose et les formules mannitol.

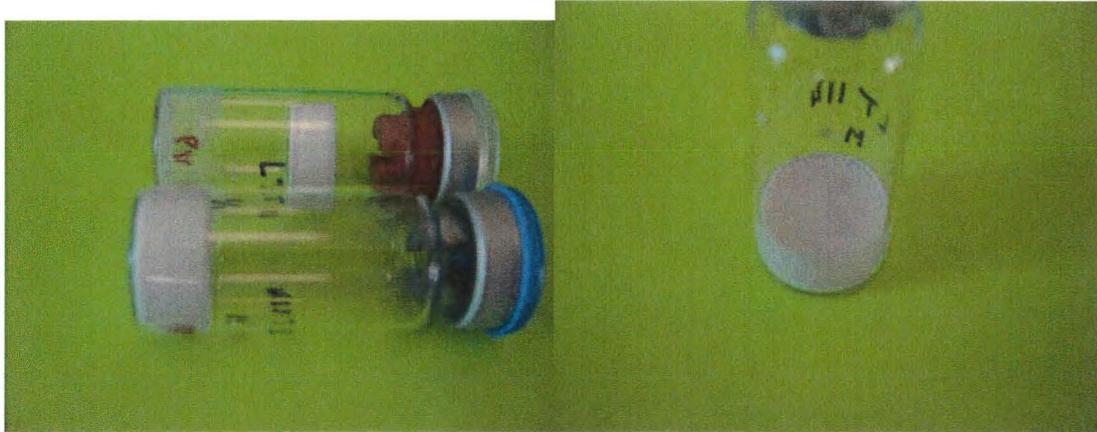


Figure 49 : Photographie des lyophilisats obtenus avec le cycle LT114, à gauche pastille bleu : BrHPP 12.5% + mannitol 10%, pastille transparente : BrHPP 12.5% + lactose 3.7%. A droite BrHPP 12.5 % + mannitol 10%

La formule BrHPP « 12.5% + mannitol 10% » colle aux parois du flacons, **aucune rétraction n'est observée** contrairement à la formule « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% ».

La formule « BrHPP 12.5%+ lactose 3.7% » a une humidité résiduelle très basse, nettement plus basse que la formule avec mannitol (cf. Table 13).

BrHPP 12.5% + mannitol 10%	BrHPP 12.5% + lactose 3.7%
+25°C : -23°C +40°C : -10°C	+40°C : -48°C

Table 13 : Analyse des pressions de vapeur sur les lyophilisats du cycle LT113

L'analyse des lyophilisats **par microscopie électronique** est présentée en suivant.

Remarque : Aucune analyse de la zone articulaire arrondie n'a été réalisée car cette partie était identique au reste du lyophilisat.

- Analyse en microscopie électronique de la surface des échantillons « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% »

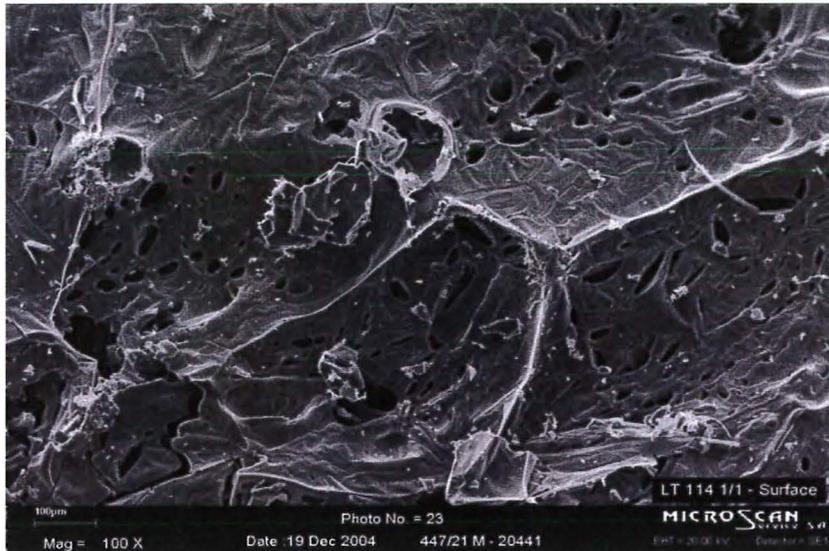


Figure 50 : Analyse par microscopie électronique de la surface des lyophilisats « BrHPP 12.5%+ lactose 3.7% » obtenus avec le cycle LT114, réalisée par MICROSCAN

Comme observé précédemment, les espaces laissés libres par les cristaux d'eau sont étroits (cf. Figure 50). L'épaisseur de la couche de surface paraît relativement importante. La distribution des cheminées n'est pas homogène. Cette structure est très proche de celle obtenue avec le cycle LT113.

- Analyse en microscopie électronique d'une coupe des échantillons « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% »



Figure 51 : Analyse par microscopie électronique en coupe des lyophilisats « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » obtenus avec le cycle LT114, réalisé par MICROSCAN

L'observation en coupe, Figure 51, ressemble de près à la structure observée avec le cycle LT113. Le produit est formé d'un mélange d'une structure filamenteuse et de quelques agglomérats aux formes angulaires qui laisseraient penser à une structure cristalline, mais cela est à confirmer par microscopie optique

- Analyse en microscopie électronique de la surface des échantillons « BrHPP 12.5% + mannitol 10% »

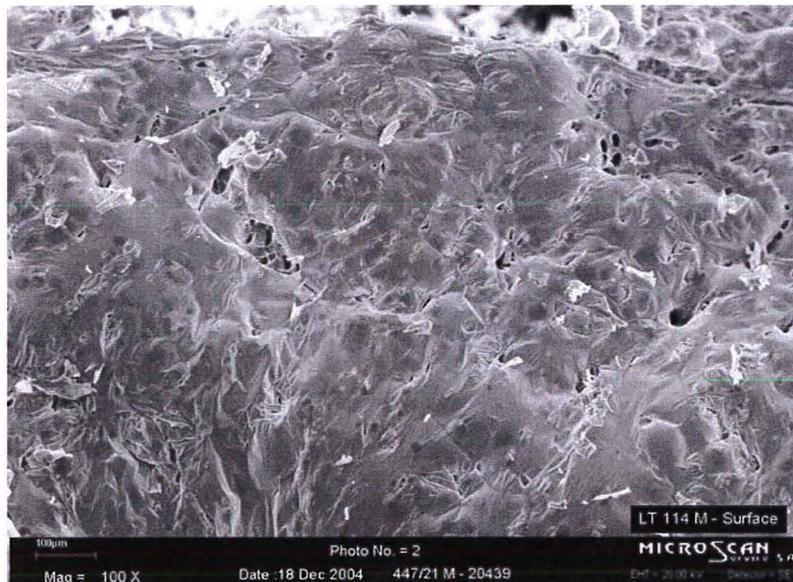


Figure 52 : Analyse par microscopie électronique de la surface des lyophilisats « BrHPP 12.5% + mannitol 10% » obtenus avec le cycle LT114, réalisée par MICROSCAN

La surface du lyophilisat présente une peau extrêmement fine sous laquelle se dessine les structures du mélange (cf. Figure 52). Cette peau semble perméable, peu de cheminées sont observées au grossissement $\times 100$.

- Analyse en microscopie électronique de la coupe des échantillons « BrHPP 12.5% + mannitol 10% »

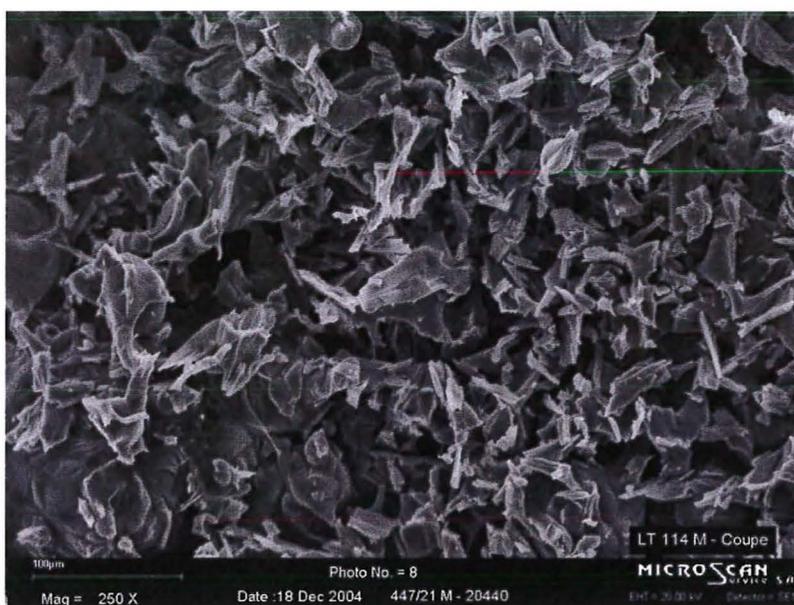


Figure 53 : Analyse par microscopie électronique en coupe des lyophilisats « BrHPP 12.5% + mannitol 10% » obtenus avec le cycle LT114, réalisée par MICROSCAN

L'observation du lyophilisat « BrHPP 12.5% + mannitol 10% » en coupe, Figure 53, met en évidence une structure frittée, agglomérée. Elle ressemble à un assemblage de « plaquettes » liées entre elles par des points de collage. MICROSCAN a précisé que lors de la manipulation du produit, ce dernier était très friable.

Cette structure est très homogène et aérée. La forme angulaire des agglomérats laisse imaginer l'obtention d'une structure cristalline pour le mannitol, tout au moins.

Pour conclure sur ces observations, **l'homogénéité de structure** entre le milieu et le fond du flacon (zone articulaire ou basale) obtenue grâce au cycle inversé représente une amélioration considérable pour notre formule.

Les résultats sur la microscopie optique ne pourront être fournis dans ce rapport car l'inclusion de l'échantillon dans la résine n'a pas, pour l'instant, pu être possible. L'échantillon ne reste pas figé, il faut donc élaborer une nouvelle matrice.

Finalement le cycle final LT114 **n'offre pas une durée de cycle plus courte** puisqu'il avoisine les 5600 minutes, presque 4 jours. Cependant les premiers résultats obtenus sont très encourageants : **les lyophilisats pour la première fois sont homogènes et ne présentent pas de trace de rétraction**. Ils laissent espérer, par conséquent, de meilleurs résultats de stabilité. Bien entendu tout cela doit être confirmé par des études thermodynamiques (ATD) et des études cinétiques (stabilité accélérée) des lyophilisats obtenus. Ces études ont été programmées pour le premier semestre 2005 et devraient finaliser notre première campagne de développement.

Quant aux études réalisées sur de nouvelles formules (plan de développement n°2) :

- la formule BrHPP 12.5% + lactose 5% + saccharose 2.5% + mannitol 2.5% (cycle LT108) présentant une température de transition vitreuse plus élevée devra faire l'objet d'études de stabilité à température accélérée.
- La formule BrHPP 12.5% + mannitol 10% (cycle LT114) présente de bons résultats visuels, et de bons résultats également par microscopie électronique. Ces lyophilisats devront également être analysés par ATD et suivi en étude de stabilité accélérée.

Le plan de développement n°2 devra inclure notamment des essais de formulations avec des concentrations en excipients nettement plus importantes.

Pour information : En parallèle de l'ensemble de ces résultats (données non présentées) STERILYO a fabriqué deux lots cliniques de produits finis avec la même matière première

et en appliquant la même recette de lyophilisation que précédemment (derniers résultats présentés de STERILYO). Dans le premier lot, 10 % de flacons ont dû être retirés du fait d'une perte de structure de la matière, sur le deuxième lot plus de 20 % des flacons ont dû être retirés pour les mêmes raisons. L'analyse de la pureté des produits retirés sur 20 flacons du premier lot a montré que le BrHPP se dégradait, de l'ordre de 5-6%.

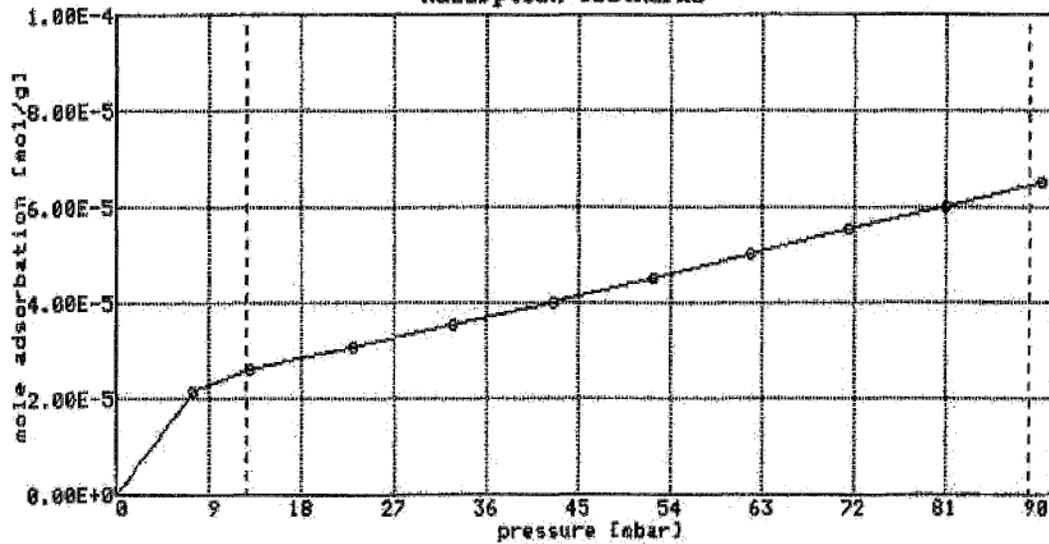
La structure était similaire à celle observée par le Pr. Rey, à la différence près que la structure était complètement bombée du certainement à la présence d'éthanol.

L'ensemble de ces résultats incite donc fortement à **continuer à travailler sur le cycle LT114** qui semble proposer des résultats bons et homogènes.

Partie 2.4.2.4 : Essais complémentaires

Les résultats BET présentés en suivant ne correspondent pas directement aux cycles et formules présentés ci-dessus. Ils sont présentés ici à **titre indicatif** mais ne seront pas discutés par la suite.

Ils ont été réalisés sur des lyophilisats obtenus avec des essais complémentaires de lyophilisation non présentés dans ce document. La formule était : BrHPP 12.5% + lactose 2.5% + mannitol 7.5%, le cycle appliqué correspondait au cycle LT108. L'équipement présentant quelques défaillances techniques, des essais sur les dernières formules n'ont pu être présentés.



file name:	denres.522	weight:	0.1000
first BET-Point:	3		
last BET-Point:	10		

Figure 54 : Analyse BET des lyophilisats « BrHPP 12.5% + lactose 2.5% + mannitol 7.5% » en adsorption

Les limites, définies sur le tracé de la Figure 54, de la zone BET sont définies par les traits en pointillés. La zone précédant la zone BET correspond à l'adsorption du gaz au niveau des micropores. La zone prolongeant la zone BET correspond à l'adsorption des gaz par les mésopores. Le calcul de la surface spécifique de l'échantillon à partir de cette courbe ne sera pas détaillé dans ce travail. Dans tous les cas la mesure se fait selon des équations à 2 ou 3 paramètres si les résultats de ces deux systèmes sont proches cela assure un résultat pertinent.

Résultats :

La densité est de 0.2922 g/cm^3 .

La surface spécifique pour cet échantillon est de:

- système à 2 paramètres : $3.8685 \text{ m}^2/\text{g}$

- système à 3 paramètres : 3.9884 m²/g

Partie 3 : Discussion

Cette partie a pour but de comparer les résultats de l'ensemble des recherches présentées précédemment, aux données de la littérature et de les discuter. Cela tendra à présenter ce travail à la fois comme une **synthèse** mais aussi comme une **analyse critique** des résultats obtenus. Cette discussion sera développée selon la chronologie des **étapes de lyophilisation**, i.e. congélation sublimation et désorption, puis sera clôturée par **l'analyse du lyophilisat** et les **données de stabilité**. Ce plan reprend le plan de la première partie à la différence près que les techniques de suivi du produit seront cependant directement intégrées dans chacune de ces parties et non détaillées à la fin.

Partie 3.1 : la congélation

Partie 3.1.1 : Comportement basse température du mélange solvant-soluté

L'étape de congélation a été appréhendée, au préalable, par une étude du comportement « *basse température* » des solutions. Ces études ont été réalisées à deux reprises sur un principe actif de pureté différente. Ces études ont permis de définir, :

- la température de cristallisation de l'eau en présence de soluté,
- la température de congélation du soluté (T_{cs}),
- et également la température d'effondrement du produit lors du réchauffement (T_{im}).

Les différentes méthodes exploitées étaient :

- l'analyse thermique :

1. ATD : l'analyse thermique différentielle qui mesure les différences de température entre un échantillon et un matériau de référence en cours de réchauffement ou de congélation à température contrôlée,
2. DSC ou MDSC: la microcalorimétrie différentielle classique ou modulée qui mesure les différences d'enthalpie entre un échantillon et un matériau de référence,
 - la résistance électrique mise en œuvre par le Pr. Rey qui mesure l'impédance électrique du produit au passage du courant alternatif à 1000Hz,
 - la cryomicroscopie utilisée par ARCHEMIS qui étudie les caractéristiques par microscopie électronique du produit.

Partie 3.1.1.1 : Cristallisation de l'eau

La température de cristallisation de l'eau a été estimée par la MDSC et l'ATD.

Cette température dépend de la **concentration initiale** en soluté (cf. Figure 3 & Figure 4).

Plus la concentration en soluté est élevée plus la température de cristallisation est basse.

Les résultats obtenus par le Pr. Rey et ARCHEMIS ne coïncident pas.

En prenant l'exemple du « BrHPP seul » en solution, la température mesurée par ARCHEMIS est de -19.6°C , tandis que le Pr. Rey a mesuré -8°C . Alors que la concentration de la solution est plus élevée pour les essais effectués par le Pr. Rey, i.e. 12.5% au lieu de 10%. Il est, néanmoins important de rappeler, pour interpréter ces résultats que les deux lots analysés de BrHPP n'avaient pas le même **profil physico-chimique**. Le lot utilisé par ARCHEMIS contenait autour de **1% d'éthanol**. Mais les estimations fournies par la MDSC d'ARCHEMIS ne coïncident pas non plus avec les données expérimentales obtenues et lues sur l'histogramme du cycle de lyophilisation (cf. Figure 55). En effet, ce dernier montre que l'eau en présence dans la solution de BrHPP

cristallise à partir de -12°C . Cet évènement est marqué par un pic de remontée de température durant la congélation qui correspond **au pic exothermique de cristallisation**.

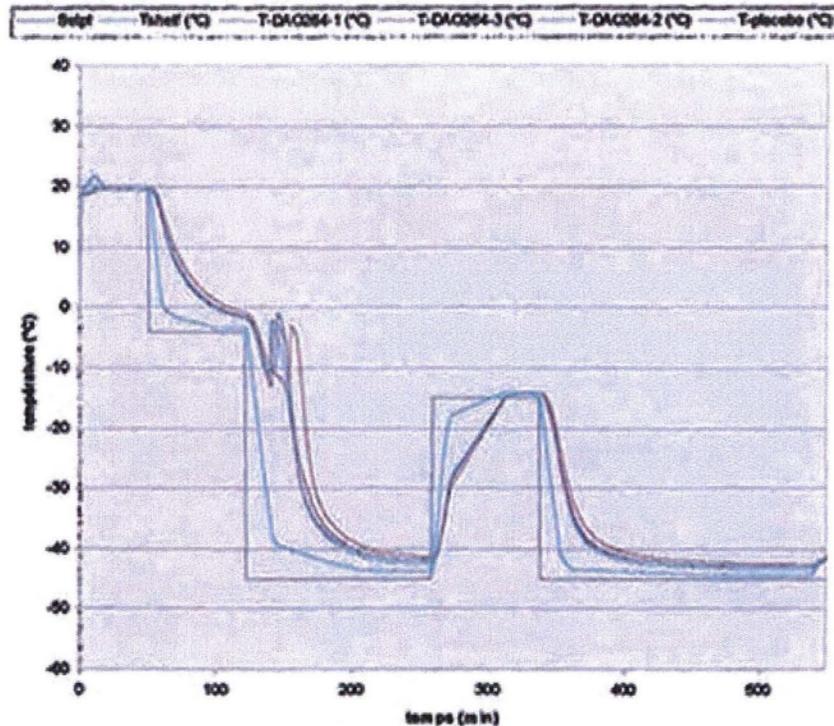


Figure 55 : Histogramme de la congélation du cycle de lyophilisation n°1 mis au point par ARCHEMIS. La cristallisation de l'eau marquée par la remontée en température des produits est autour de -12°C .

Les mesures effectuées par le Pr. Rey rejoignent les résultats obtenus sur le cycle de lyophilisation.

Les différences observées par ARCHEMIS pourraient s'expliquer par une **température de nucléation plus élevée**, du à la présence du thermocouple, dans le flacon suivi en lyophilisation. Ce phénomène a été mis en évidence par Roy et Pikal [35]. Ils ont observé que les flacons, contenant un thermocouple, nucléaient plus rapidement que les flacons n'en contenant pas. A la suite de cette observation Milton et *al.* [34] ont décrit un système de suivi de température barométrique qui permet de s'affranchir de l'utilisation de

thermocouples mais qui nécessite un équipement particulier, détaillé auparavant dans la partie bibliographique. Malgré ces arguments, la température de surfusion de l'eau s'approchant des -20°C n'est pas chose courante. La valeur de cristallisation de l'eau mesurée par ARCHEMIS est donc **remise en question**.

Quant à la différence de résultats obtenue sur les 2 diagrammes de lyophilisation entre ARCHEMIS (-12°C) et le Pr. Rey (-8°C), elle s'expliquerait très bien par la présence d'éthanol.

De la qualité particulière de la solution dépend également **la température de nucléation**. Plusieurs études ont démontré que la présence de particules dans la solution représente des supports qui permettent d'amorcer plus rapidement **la nucléation**. Searles et *al.* [9], notamment, ont comparé les températures de nucléation de solutions étudiées dans des flacons contenant peu ou beaucoup de particules. Ils ont constaté que les flacons contenant beaucoup de particules avaient une température de nucléation plus élevée comparés aux flacons contenant pas ou très peu de particules. En complément, de cette étude, ils ont remarqué que la température de nucléation avait une incidence sur la **vitesse de sublimation**.

En comparant les histogrammes fournis par ARCHEMIS et STERILYO utilisant le même cycle de lyophilisation avec la même formulation, à la différence près que **l'une est filtrée l'autre non**, on constate que les vitesses de sublimation sont différentes. La préparation de STERILYO, **exempt de particules**, se sublime beaucoup moins rapidement que celle d'ARCHEMIS. La présence de particules dans la solution préparée par ARCHEMIS favoriserait, dans ce cas, la formation de cristaux de glace de tailles plus importantes et permettrait, par conséquent, **une sublimation plus rapide**.

Partie 3.1.1.2 : Solidification du soluté

Contrairement au solvant, le BrHPP en congelant **ne cristallise pas**. Selon les analyses d'ARCHEMIS, il se solidifie à l'état de verre. La **température de transition vitreuse**, T_g , mesurée à l'aide du MDSC, est **basse** (autour de -50°C , -55°C). La présence d'éthanol doit abaisser cette température.

Sur le produit purifié, le Pr. Rey ne semble pas observer de transition vitreuse par ATD ni en congélation, ni en réchauffement. Par contre il observe **une solidification du soluté** autour de -40°C grâce à l'analyse de l'impédance électrique en congélation et en réchauffement.

Il en est de même pour le lactose, il ne met pas en évidence de température de transition vitreuse par ATD. Or de nombreuses publications décrivent une température de transition vitreuse pour le lactose (T_g) autour de -30°C . L'observation de la température de transition vitreuse par ATD ou DSC est délicate. Il est possible dans certains cas de la détecter par analyse de la résistance électrique mais non par ATD. Her et *al* [36] ont réalisé des essais comparatifs en cycle de réchauffement sur différents excipients : saccharose, tréhalose, FICOLL et dextran. Ils ont observé une température de transition vitreuse par ATD sur le dextran uniquement et une baisse de la résistance sur les 4 échantillons, alors qu'il est reconnu que les trois autres excipients se transforment également en verre lors de la congélation.

L'analyse de la température de transition vitreuse par ATD ou DSC dépend de plusieurs paramètres intrinsèques à la méthode. Pour exemples :

- En cycle de congélation , l'intensité des évènements thermiques diminue avec une **augmentation de vitesse** [37].
- En cycle de congélation et réchauffement, l'intensité des évènements thermiques dépend, également, de **la nature du soluté** étudié.

- En cycle de réchauffement, la température de transition vitreuse (T_g) mesurée dépend de **la vitesse de réchauffement** [37]. Généralement, la température mesurée est plus élevée avec une augmentation de la vitesse de réchauffement.

Ainsi, par les résultats obtenus par le Pr. Rey, il ne serait peut-être pas prudent d'affirmer avec conviction que le BrHPP « nouvelle génération » ne se solidifie pas sous forme de verre.

Sachant d'ailleurs que l'analyse thermique sur les lyophilisats, effectuée également et ultérieurement par le Pr. Rey a permis de détecter des températures de transition vitreuse pour les formules étudiées. Cela, par contre, donne la preuve que l'utilisation en parallèle de deux méthodes de mesures différentes pour caractériser le soluté à basse température est pertinente. D'ailleurs si l'ATD avait révélé un événement, sa valeur n'aurait pas été la même que celle observée par l'analyse de l'impédance électrique. En effet, il est important de rappeler que les deux méthodes ne mesurent pas le même événement. L'ATD mesure des **variations de températures** tandis que l'analyse de l'impédance électrique mesure la **résistance du produit au passage du courant**.

Ainsi, le Pr. Rey [2] décrit d'ailleurs clairement dans son ouvrage que la température à laquelle l'impédance s'effondre, dans un cycle de réchauffement, **précède** la température à laquelle l'endotherme apparaît. Il n'apparaît donc pas encore de relaxation endothermique mais le produit bouge d'ores et déjà. Or, d'après son expérience, la température de perte d'impédance électrique doit être **la limite supérieure** pour le traitement du produit lors de la sublimation pour éviter tout risque de perte de structure. Le suivi des propriétés électriques du soluté représente donc un élément majeur pour la mise au point d'un cycle de lyophilisation mais également pour son suivi au cours du cycle. Ce dernier élément a d'ailleurs été étudié et sera abordé ultérieurement lors de l'analyse du traitement thermique.

Cette technique permet également, beaucoup plus aisément que l'ATD, de comparer le comportement du soluté en congélation et en réchauffement :

- **L'intensité** de l'évènement de solidification en cycle de congélation (T_{cs}) et de perte de structure en cycle de réchauffement (T_{im}), est identique.
- Cela permet également de mettre en évidence, si tel est le cas, **un delta de température** entre la congélation du soluté et sa perte de structure. C'est-à-dire une hystérésis entre les courbes de congélation et de réchauffement (cf. Figure 7).

Les solutés congèlent, généralement, à une température plus basse qu'ils ne perdent leur structure. Cet écart permet donc de traiter le produit en sublimation à des températures plus élevées que la température de solidification totale. Mais malheureusement le BrHPP ne confirmera pas la « règle ». Le BrHPP se comporte **à l'identique** en cours de congélation et en cours de réchauffement.

L'apport d'excipients dans la formule ne diminue guère la température de congélation du soluté. Suivant l'équation de Couchman-Karasz [23],

$$T_g = \frac{w_1 T_{g1} + K w_2 T_{g2}}{w_1 + K w_2}$$

(w_1 et w_2 sont les fractions de pesées de chaque composé, 80%= ratio BrHPP et 20%= ratio lactose, K est une constante qui peut-être assimilée à T_{g1} / T_{g2} , et T_{g1} , T_{g2} sont les températures de transitions vitreuses de chaque composé)

la température de transition vitreuse attendue pour le mélange BrHPP+lactose avec les données d'ARCHEMIS aurait du être de :

$$Tg = \frac{80 \times -53,3 + (-53,3 / -30^*) \times 20 \times -30^*}{80 + (-53,3 / -30^*) \times 20} = -46^\circ C$$

* Correspond à la température de transition vitreuse du lactose définie dans la littérature

Alors qu'elle a été évaluée à -50°C par MDSC. Le BrHPP a donc un **fort pouvoir d'influence** sur le comportement basse température du soluté. L'utilisation de moyen d'évaluation prédictif pour la température de transition vitreuse du soluté en présence de BrHPP, comme l'équation exposée au dessus, serait donc obsolète pour la suite des travaux. Le comportement basse température du BrHPP est confirmé dans les travaux du Pr. Rey qui, en étudiant différentes compositions de soluté, pour rappel « BrHPP 12.5% », « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% », « BrHPP 12.5% + saccharose 2.5% + mannitol 5% », n'a pas noté de différences significatives de température de solidification pour l'ensemble des solutés.

Partie 3.1.1.3 : Traitement thermique

L'utilisation du traitement thermique (recuit) par ARCHEMIS mais également par le Pr. Rey a été développée à plusieurs reprises. ARCHEMIS l'a utilisé dès son premier cycle en espérant améliorer la structure du produit avant sublimation ; c'est-à-dire **augmenter et homogénéiser la taille des cristaux de glace** d'une part, et **s'affranchir de tout risque de cristallisation subite du mannitol**. Le mannitol dans certaines conditions peut cristalliser. Si en fin de congélation le mannitol se trouve à l'état amorphe, il peut y avoir un risque de cristallisation subite **lors de la dessiccation mais également lors du stockage**. Ceci est dommageable pour la stabilité du produit.

Le traitement thermique permet alors de provoquer la cristallisation, lorsque les conditions de cristallisation sont réunies. Pour le mannitol cela signifie qu'il soit en concentration suffisante et qu'il ne soit pas en présence de composés inhibant sa cristallisation. Kim et al. [28], ont noté qu'en dessous du ratio de 30% par rapport à la composition du lyophilisat, le mannitol ne cristallise pas.

Pour mémoire, le traitement thermique consiste dans un premier temps à congeler le produit en dessous de sa température de solidification totale (T_{cs}). Le produit est alors solidifié à l'état amorphe, si la congélation n'a pas permis sa cristallisation. Le produit est ensuite chauffé puis maintenu à une température au-dessus de la température de début de perte de structure, T_{im} et en-dessous de la température de fusion de la glace pendant un temps déterminé. Le produit est donc dévitrifié à cette température ; il est à l'état instable de verre liquide et va donc atteindre un état de meilleure stabilité. Ce dernier état peut correspondre à l'état cristallin, si le produit a l'aptitude de cristalliser.

Pour les essais d'ARCHEMIS, l'observation au cryomicroscope démontre que le mannitol, dans la formule BrHPP 10% + mannitol 2.5%, ne cristallise pas, même à la suite du traitement thermique. **La concentration en mannitol doit être trop faible.**

Pour les essais réalisés par le Pr. Rey, la confirmation de l'atteinte des états recherchés est donnée par l'analyse en directe de la résistance du produit. Lors du réchauffement du produit au delà de la température (T_{im}), la résistance diminue brusquement et ne remonte qu'après refroidissement et solidification du produit. Egalement, les premières formulations à base de mannitol préparées par le Pr. Rey ne semblent pas cristalliser. En effet, l'analyse des pressions de vapeur du lyophilisat montre que la formule « BrHPP 12.5% + saccharose 2.5% + mannitol 5% » a une humidité résiduelle plus élevée que la formule « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% », les températures de condensation sont de -28°C et -38°C respectivement. Ces données incitent à penser que le mannitol est amorphe dans la formule mise au point par le Pr. Rey, malgré l'application d'un traitement thermique.

Il n'en est certainement pas de même pour la formulation « BrHPP 12.5% + mannitol 10% » traitée sur le cycle LT114. L'analyse de cette dernière par microscope électronique semble montrer des **formations cristallines**. Cet état est à confirmer par analyse thermique différentielle. D'autre part l'observation visuelle des lyophilisats montrent que les gâteaux

sont collés à la paroi. Aucune rétraction n'a eu lieu, ce qui est assez caractéristique des produits cristallins qui, lors de la cristallisation augmentent de volume.

Le deuxième effet recherché lors du traitement thermique est **l'amélioration de l'homogénéité de taille des cristaux de glace**. En effet comme détaillé en première partie une perte de structure locale des cristaux de glace permet leur fusion et la formation de cristaux de glace de taille plus importante et plus homogène. L'observation par microscopie électronique des lyophilisats cycle LT113 ayant subi un traitement thermique montre cependant une discontinuité des cristaux de glace intra flacon. La zone articulaire est composée de petits espaces laissés libres par des petits cristaux de glace. L'échantillon prélevé au centre n'a pas la même structure, les espaces laissés libres par les cristaux d'eau sont nettement plus importants. La taille des cristaux de glace n'est pas homogène avec ce traitement thermique.

Comme l'a démontré Searles [14] en mesurant la vitesse de sublimation, l'importance du grossissement et de l'homogénéisation des cristaux de glace dépend de **la température du palier de traitement thermique ainsi que de sa durée**. Ainsi, la vitesse de dessiccation augmente avec la durée du traitement thermique pour atteindre ensuite un plateau. Ce plateau est atteint au bout de 5-10 h de traitement thermique. Les résultats obtenus avec le cycle LT114, dans lequel une durée de **50 minutes** est appliquée pour le palier, confirment ces recherches. Pour mémoire les traitements précédents consistaient à atteindre la température T_{im} et à diminuer immédiatement la température des étagères, ainsi aucun palier n'était appliqué.

Les lyophilisats obtenus avec le cycle LT114 sont **visuellement homogènes**, ils ne montrent aucune perte de structure locale. Ces résultats confirment donc, d'un point de vue visuel, les études menées par Searles.

Partie 3.2 : La dessiccation secondaire

La sublimation démarre au moment de la remontée en température des étagères et la diminution de la pression dans l'enceinte.

Partie 3.2.1 : Effets observés en transfert de chaleur– transfert de masse

Partie 3.2.1.1 : Introduction contrôlée d'air

Pour que l'augmentation de la température des flacons se fasse plus rapidement, le Pr. Rey a injecté, avec régulation de pression, de l'air (gaz incondensable) dans l'enceinte de manière à **augmenter la pression et favoriser l'effet convection - conduction des gaz**. En comparant les remontés en température des flacons traités par le Pr. Rey et ceux traités par ARCHEMIS et STERILYO, la pente de remontée de température est en effet plus raide avec introduction d'air. L'effet recherché est donc bien atteint. Par contre l'introduction progressive d'air, appliquée sur le cycle LT103 tout au long de la sublimation, a entraîné une augmentation de transfert de chaleur trop importante et une perte de structure des produits.

Des essais effectués antérieurement sur des solutions contenant uniquement des excipients démontrent de façon significative l'efficacité d'un tel procédé (cf. Figure 56 & Figure 57)

Figure 57 : Test de lyophilisation basse pression effectué par le Pr. Rey. La pression est mesurée par la sonde Baratron (tracé rouge), elle est maintenue au-dessous de 10^{-3} mbar en sublimation, la température des étagères (tracé vert) est de 0°C.

Ces essais démontrent clairement que l'utilisation d'une pression moins basse avec une température d'étagère moins élevée permet d'atteindre **plus rapidement** la température attendue pour amorcer la sublimation (-30°C). La durée du cycle est nettement diminuée : 1800 minutes au lieu de 2400 minutes.

Partie 3.2.1.2 : Evolution du front de sublimation

Le front de sublimation évolue horizontalement de la surface de la solution vers le bas du flacon. Mais il existe dans certains cas des **évolutions du front infiltrantes**, qui vont progresser plus rapidement sur les côtés ; phénomène favorisé par le transfert de chaleur par conduction – convection décrites notamment par Pikal et Shah [38]. Au regard des courbes de lyophilisation et de l'aspect final du produit PHOSPHOSTIM[®] 200, une sublimation de ce dernier type paraît s'être créée.

Les courbes de sublimation montrent des paliers, 3 au total ceci sur tous les cycles ou la température du produit excède la température des étagères (cf. Figure 26, Figure 37, Figure 38) ; alors qu'ils devraient y en avoir 2 :

- ✓ Le premier palier correspond classiquement à la sublimation du produit.
- ✓ Le deuxième palier correspond généralement à la fin de sublimation, quand l'énergie sous forme de chaleur n'est plus consommée pour la sublimation est permet donc de faire monter la température du produit.

Dans le cas de PHOSPHOSTIM[®] 200, l'hypothèse suivante peut-être évoquée, en sachant que la sonde de température pour le suivi du lyophilisat est positionnée dans le flacon au niveau du bord inférieur. Le front de sublimation doit descendre non pas selon une

évolution plane, mais plutôt infiltrante sur les côtés et notamment au niveau de la sonde (cf. Figure 58) ce qui signifie que la dessiccation primaire est plus rapide sur les côtés, la sonde va alors noter une **première augmentation de température**. Puis la sublimation progresse vers le bas jusqu'à sublimer l'ensemble du produit, la sonde note alors **une deuxième augmentation** de température. Enfin lorsque toute la glace s'est sublimée, la sonde note **une troisième montée**

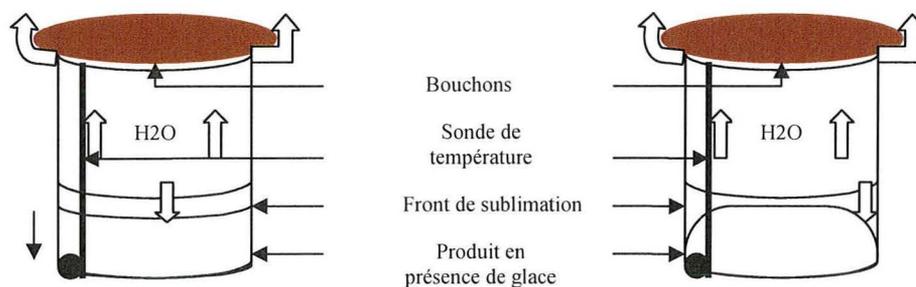


Figure 58 : Schéma décrivant le déplacement du front de sublimation dans le flacon. A gauche évolution horizontale du front de sublimation horizontale, à droite déplacement infiltrant du front de sublimation.

en température. D'autres observations vont dans le même sens. Tout d'abord les lyophilisats obtenus **sont rétractés** et ne collent pas aux parois des flacons. La rétraction est nettement visible à l'œil et laisse entrevoir un espace entre le lyophilisat et les parois du flacon. De plus, l'observation au microscope électronique montre clairement une **différence de structure** entre la partie basale ou zone articulaire et le reste du lyophilisat. Pour mémoire, la zone articulaire en fond de flacon est composée de cristaux de glace de nettement plus petites tailles que ceux situés au centre. Cet élément majeur justifierait une diminution, plus importante, de vitesse du front de sublimation à l'approche du bas du flacon. *Plus importante* car dans tous les cas, la vitesse de sublimation est toujours ralentie à l'approche du bas du flacon, la résistance au passage de la vapeur d'eau est proportionnelle à la quantité de matière sèche à traverser.

Ainsi la combinaison des deux éléments :

- ✓ transfert de chaleur par conduction-convection plus important au niveau des parois des flacons,
- ✓ et vitesse de sublimation ralentie à l'approche de la partie basale,

participeraient à l'évolution d'un front de sublimation non pas horizontale mais incurvée à l'intérieur du flacon.

Autant d'éléments qui justifiaient, d'une part la mise en œuvre d'un nouveau cycle pour permettre d'améliorer la congélation, notamment l'homogénéité des cristaux de glace, et d'autre part de maîtriser la vitesse de sublimation en fin d'étape.

Le cycle LT114 a apporté ces éléments en augmentant la durée du palier de traitement thermique, comme détaillé dans la partie congélation, mais également en appliquant une température des étagères décroissante au fur et à mesure du déroulement de la sublimation.

Aucune publication traitant des cycles inversés n'a été reportée. Ce **traitement très particulier** a été développé par le Pr. Rey et d'ores et déjà testé sur des formulations antérieures. Les résultats visuels et par microscopie électronique obtenus sur les lyophilisats sont nettement meilleurs. Le lyophilisat est homogène, aucune distinction de structure ne peut-être faite entre la partie basale et le reste du lyophilisat.

Partie 3.3 : La désorption

La désorption démarre une fois que l'ensemble de l'eau libre s'est sublimée. Le produit n'offre alors **plus de résistance** à l'apport d'énergie sous forme de chaleur. La température des produits augmente par conséquent. Cet évènement signe la fin de la sublimation.

Mais pour provoquer la désorption des molécules d'eau, la dessiccation secondaire a besoin d'une diminution de la pression dans l'enceinte et d'une augmentation de la température des étagères.

Le Pr. Rey initialise cette étape avec au départ une remontée rapide de pression par introduction contrôlée d'air dans l'enceinte, comme cela a été fait pour la sublimation. L'effet recherché est identique : remontée plus rapide de la température des produits.

Pour étudier l'effet de la durée de l'étape désorption sur la teneur en eau, il faut reprendre les données sur le cycle LT106 et LT108. La température de désorption pour les 2 cycles est de 40°C, la pression est de 0.01 mbar, la durée pour le cycle LT106 est de **1000 minutes**, la durée pour le cycle LT108 est de **1400 minutes**. Les étapes préliminaires de congélation et sublimation ont été menées à l'identique. La température de condensation sur la formule « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » est de -46°C avec le premier cycle et -42°C avec le second. Ces informations confirment les études menées par Pikal *et al.* [20] dans lesquelles ils concluent que la teneur en eau diminuent rapidement les premières heures pour atteindre un palier qui évolue, principalement, en fonction de la température appliquée aux étagères. Ce point est également confirmé par les résultats obtenus par le Pr. Rey en admettant que des températures de condensation, autour de -50°C, correspondent à des teneurs en eau réelles inférieures à 0.5%. En effet, les humidités résiduelles obtenues avec les cycles d'ARCHEMIS sont autour de 1% avec une température de désorption de 30°C, contre 0.5% sur les études du Pr. Rey avec une température de désorption de 40°C.

Partie 3.4 : La caractérisation du lyophilisat

Partie 3.4.1 : Dosage

La caractérisation du produit formulé a consisté, dans un premier temps, à s'assurer que le BrHPP ne se dégradait pas lors du procédé de lyophilisation. Après **dosage** des différentes formules, il en est ressorti que les formules avec excipients dont l'aspect était conforme **sont très peu dégradées**, de l'ordre de 1%. Mais il n'en est pas de même pour la formule avec « BrHPP seul », dégradation autour de 5-6%, et les formules « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » non conformes obtenues avec les cycles de STERILYO, dégradation autour de 5-6%.

Dans les deux cas de dégradation, les lyophilisats ont un aspect totalement fondu, ils ont perdu leur structure. Cette perte de structure observée également sur un essai du Pr Rey (cycle LT1113) apparaît en fin de sublimation. Dans un même lot, cette observation se retrouve sur tous les lyophilisats « BrHPP seul » et sur seulement une partie du lot pour la formule « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% ».

Aux vues des résultats d'analyse thermique différentielle sur le lyophilisat : « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% », la température de transition vitreuse était de 41°C. La littérature reporte une température de transition vitreuse pour le lactose monohydrate est de 63°C. En considérant que la transition vitreuse d'un mélange est fonction de la température de transition vitreuse des différents composants en présence [23], le lactose augmente la température de transition vitreuse du BrHPP puisqu'il abaisse la sienne. Mais nous devons être prudent et modérer l'effet du lactose sur la température de transition vitreuse. En effet, comme observé pour les études de transitions vitreuses des mélanges solidifiés, le BrHPP a un fort pouvoir d'influence ce qui rend d'ailleurs l'équation de Couchman-Karasz inexploitable pour prédire des différentes températures des mélanges. Ainsi tout comme

pour les solutions, les différences de température de transition vitreuse, sur produit sec, entre la formule BrHPP seul et la formule BrHPP + lactose doivent être très proches. Voilà pourquoi si le lactose protège en cours de lyophilisation le BrHPP d'un risque de transition vitreuse son effet est limité, et cette formule ne peut, donc, garantir à 100% de bons résultats visuels sur les lyophilisats.

Ces premiers résultats justifient donc la présence d'excipients d'une part, mais aussi la mise en route de la recette LT114 qui devrait apporter une solution à la perte de structure du mélange « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% » de manière aléatoire dans un lot de produit.

Partie 3.4.2 : Analyse de l'humidité résiduelle

L'analyse de l'humidité résiduelle a été menée par 2 techniques différentes :

- la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne : **la méthode Karl Fischer** qui mesure la totalité de l'eau dans l'échantillon : eau libre et eau liée.
- et également par la méthode développée par le Pr. Rey : **la méthode de pression de vapeur**. Cette deuxième méthode permet de mesurer l'humidité résiduelle dans le flacon en évaluant la température de condensation. La Figure 59 présente ces résultats *sur un produit testé par le Pr. Rey qui ne correspond pas au BrHPP*. Cette méthode permet de s'affranchir du risque d'erreur lié à la dispersion de la teneur en eau inter flacons, puisque l'analyse est toujours réalisée sur le même flacon (méthode non intrusive et donc non destructive).

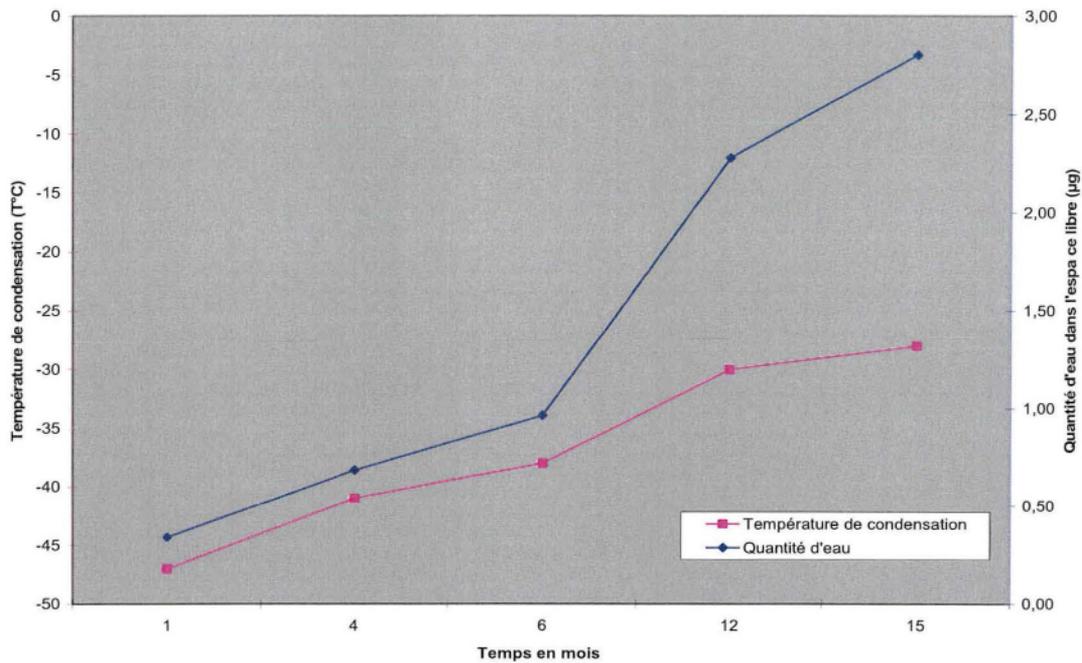


Figure 59 : Relation entre la température de condensation et la quantité d'eau mesurée dans l'espace libre en fonction du temps sur un produit autre que PHOSHOSTIM®

Le Pr. Rey a collecté, également des données qui mettent en relation les résultats obtenus par la méthode Karl Fisher avec des analyses pression de vapeur sur 5 analyses d'un même produit conservés pendant 15 mois à +4°C. Les résultats sont présentés dans la Figure 60.

Les résultats entre les deux méthodes coïncident.

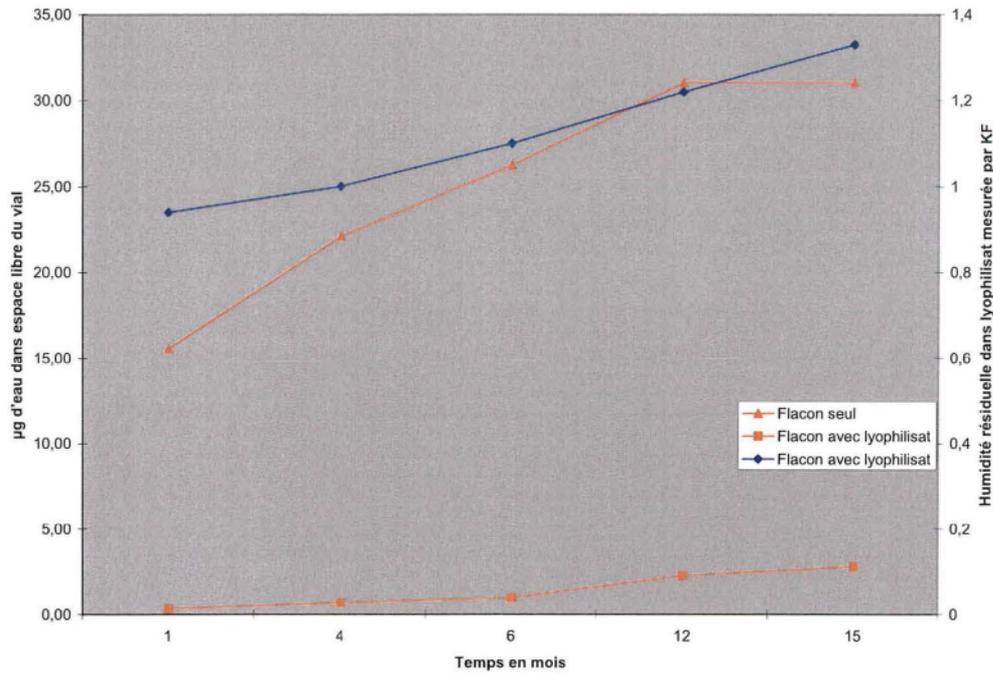


Figure 60 : Relation entre la mesure effectuée par la méthode de pression de vapeur sur un flacon vide et un flacon avec lyophilisat (mesure de la quantité d'eau dans l'espace libre) et l'humidité résiduelle dans le lyophilisat mesurée par Karl Fisher en fonction du temps, sur un produit autre que PHOSHOSTIM®

L'augmentation de la teneur en eau s'explique par la désorption des bouchons dans le temps. Pour étudier le phénomène de désorption des bouchons, le Pr. Rey a réalisé une étude comparative entre les comportements d'un lyophilisat conservé en flacon et en ampoules sur des produits autres que PHOSHOSTIM® 200. Les résultats sont présentés ci-dessous :

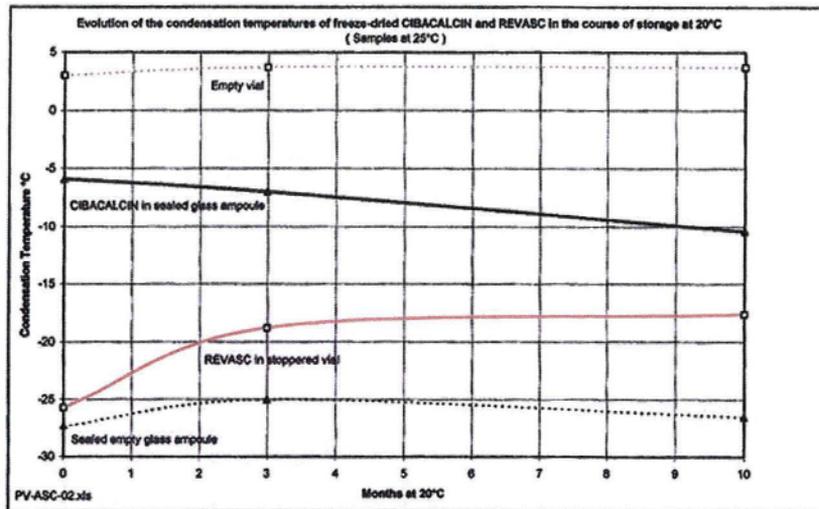


Figure 61 : Courbes d'évolution des pressions de vapeurs pour un flacon et une ampoule remplis et vides pour deux produits le REVASC et la CIBACALCIN sur 10 mois

Ces courbes apportent différentes observations. La première est déduite de la comparaison de la pression de vapeur d'un flacon vide avec un flacon contenant un lyophilisat ayant suivi le même cycle de lyophilisation. La pression de vapeur mesurée dans un flacon vide est nettement plus élevée que celle mesurée dans le flacon contenant le lyophilisat. Ceci s'explique par le fait que le lyophilisat prend en charge les molécules d'eau apportées par la présence du bouchon. Le lyophilisat joue le rôle de tampon d'humidité, le bouchon, quant à lui, représente une source d'humidité. Cette même analyse, mais effectuée dans des ampoules, apporte des informations totalement différentes. Les ampoules vides ont une pression de vapeur très basse puisque aucun élément ne peut relarguer des molécules d'eau. Par contre l'ampoule contenant le lyophilisat a une pression de vapeur plus élevée du à la présence du lyophilisat qui libère, lors de l'analyse des molécules d'eau libres. Dans aucun cas les augmentations de teneur en eau pour le lyophilisat ne peuvent être

attribuées à l'espace du flacon entre le lyophilisat et le bouchon. En effet, comme le souligne Pikal et Shah [39] après étude du transfert d'humidité du bouchon au produit, les espaces de tête des flacons mis sous azote avant bouchage ne contiennent pas d'humidité. D'autre part, si la teneur en eau du produit se stabilise au cours du temps, cela signifie que le passage de l'humidité provenant de l'environnement extérieur à travers le bouchon est inexistant. C'est en effet ce qui est noté, dans les courbes ci-dessus, pour les lyophilisats conservés dans des flacons. La pression de vapeur augmente sur 3 mois pour se stabiliser ensuite. L'augmentation est due à la désorption des bouchons. Le phénomène est différent pour les lyophilisats conservés en ampoule. Les équilibres entre eau liée et eau libre évoluent au sein du lyophilisat. La quantité d'eau libre diminue en faveur de la quantité d'eau liée. Ainsi la teneur en eau mesurée par pression de vapeur, qui correspond à la teneur en eau libre, diminue.

Les études de stabilité menées sur PHOSPHOSTIM[®] 200 montrent que la teneur en eau des lyophilisats, étudiée par la méthode Karl Fisher, évolue dans le temps. La teneur en eau augmente de façon relativement importante pour les études à +5°C et +25°C. Il est reconnu que la désorption des bouchons se fait généralement sur les trois premiers mois de stabilité. Mais cette règle ne peut s'appliquer sur les produits conservés à +5°C. En effet comme le note Pikal et Shah [39], la vitesse d'équilibration de la teneur en eau est dépendante de la température de conservation. Il est ainsi courant d'atteindre l'équilibre à +5°C après 12 mois de conservation. Dans le cas exposé par Pikal et Shah [39], la quantité d'eau absorbée par le produit amorphe, sur la période de mise en stabilité, n'est pas fonction de la température de conservation. Il faut noter que les produits étudiés ne subissent pas de transition vitreuse avant 15% de teneur en eau à 25°C. La teneur en eau à T_0 est autour de 1%. Il est donc improbable que le produit durant sa conservation subisse une transition

vitreuse. Ainsi la température de conservation a seulement un effet sur la vitesse d'absorption.

Il n'en est certainement pas de même pour les lyophilisats PHOSHOSTIM[®].200. En effet la **teneur en eau maximum tolérée est autour de 3-4% à 20°C**, au-delà le BrHPP subit une transformation vitreuse et devient nettement plus hygroscopique comme le montre les études DVS. Il est certain que cette donnée n'a été mesurée que pour le BrHPP seul et non avec les excipients. Cependant cette teneur en eau maximale tolérée à 20°C pour les lyophilisats est basse, il y a donc de forte chance de l'atteindre lors de la conservation des produits, et notamment à +25°C.

Partie 3.4.3 : Microscopie électronique

Cette analyse ayant déjà été discutée dans le chapitre sublimation, nous ne redévelopperons pas ce point.

Partie 3.5 : Les données de stabilité

Deux approches différentes ont été élaborées pour renseigner sur la stabilité des lyophilisats. La première a constitué à suivre la **teneur en BrHPP** à -20°C sur 1 an, +5°C sur 1 an, et +25°C sur 6 mois, de trois formules (« BrHPP seul », « BrHPP 10% + lactose 2.5% », « BrHPP 10% + mannitol 2.5% »). La deuxième a porté sur **l'analyse thermodynamique** de trois lyophilisats (« BrHPP 12.5% + lactose 3.7% », « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% + saccharose 2.5% », « BrHPP 12.5% + lactose 3.7% + saccharose 2.5% + mannitol 2.5% ») par recherche de la température de transition vitreuse.

Partie 3.5.1 : Etudes cinétiques

Pour mémoire :

- ✓ Pour la formule BrHPP 10%, k la constante de vitesse à +5°C est de 0.4 mg/semaine, et de 4 mg/semaine à +25°C. La teneur en eau est autour de 2% à 25°C après 6 mois
- ✓ Pour la formule BrHPP 10% + lactose 2.5%, aucune dégradation n'est observée à +5°C, k = 2.5 mg/semaine à 25°C. La teneur en eau est autour de 2% à 25°C après 6 mois
- ✓ Pour la formule BrHPP 10% + mannitol 2.5%, aucune dégradation n'est observée à +5°C, k = 2 mg/semaine à 25°C. La teneur en eau est autour de 2% à 25°C après 6 mois

Pour information la teneur en eau à T₀ était de l'ordre de 1-1.5%.

Ces études montrent que les formules avec excipients sont nettement plus stables que la formule BrHPP seul.

Pour mesurer l'effet de la température sur la vitesse de dégradation du BrHPP nous utiliserons la relation d'Arrhénius. Cette équation introduit la notion **d'énergie d'activation**.. L'énergie d'activation d'une réaction chimique correspond à l'énergie nécessaire pour permettre la redistribution des atomes entre réactifs et produits : c'est-à-dire à la rupture des liaisons des réactifs et à la formation de nouvelles liaisons dans les produits, après une collision efficace entre molécules et réactifs.

L'équation d'Arrhénius est la suivante

$$k = A.e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

La composante k représente la constante de vitesse, A représente le facteur de fréquence et E_a l'énergie d'activation exprimée en kJ.mol⁻¹. La constante de vitesse et le facteur de

fréquence ont les mêmes unités, c'est-à-dire pour le cas de PHOSPHOSTIM[®] 200, réaction d'ordre 0, unité mg/semaine.

Pour simplifier le calcul, nous utiliserons la méthode du Q10, méthode qui permet d'estimer approximativement l'effet de la température sur la vitesse de réaction.

Le Q10 est un facteur qui correspond à l'augmentation de la constante d'une réaction chimique lorsque la température augmente de 10°C.

Notre calcul devient donc :

$$Q_{\Delta T} = \left(\frac{k_{T_2}}{k_{T_1}} \right) \quad T_2 - T_1 = 20^\circ\text{K}$$

Pour notre calcul $Q_{20} = 4/0.4 = 10$

Et l'énergie d'activation peut-être estimée à :

$$Q_{\Delta T} = e^{\left(\frac{-Ea}{R} \left(\frac{1}{T+20} - \frac{1}{T} \right) \right)}$$

Dans notre cas,

$$10 = e^{\left(\frac{-Ea}{8.31} \left(\frac{1}{298} - \frac{1}{278} \right) \right)}$$

$$\mathbf{Ea = 80 \text{ kJ/mol}}$$

Pour une meilleure interprétation de ces résultats, revenons sur les études d'isothermes de sorption de l'eau (**étude DVS**), réalisée sur la poudre BrHPP à 20°C. Ces études ont montré que le BrHPP devait changer d'état et passer sa transition vitreuse lorsque sa teneur en eau atteignait 3-4%. En comparant les résultats DVS à 20°C et les teneurs en eau à +25°C pour le BrHPP seul nous pouvons aisément penser que celui-ci doit être très proche de sa température de transition vitreuse. Il ne doit pas forcément avoir passer sa transition vitreuse, sinon nous aurions certainement constaté une augmentation plus importante de sa teneur en eau au cours du temps. Mais par contre à l'approche de sa transition vitreuse sa **mobilité** doit être plus élevée.

Pour rappel, la stabilité d'un produit est liée à sa mobilité, plus le produit est mobile, plus il est susceptible de se dégrader. En effet, un produit amorphe est soumis à une certaine instabilité durant sa conservation, de ce fait le produit va évoluer vers une structure d'une plus grande stabilité comme l'état cristallin par exemple. Lors de cette transformation, le produit perd de l'énergie et voit sa masse volumique diminuer. Ces éléments là seront vus dans l'étude thermodynamique. Les formules avec excipients doivent avoir une mobilité moins importante à 25°C, ce qui entraîne de meilleurs résultats de stabilité.

Partie 3.5.2 : Etudes thermodynamiques

Nous avons principalement focalisé notre travail sur la recherche de la température de transition vitreuse. Le lien entre la mobilité d'une molécule et sa température de transition vitreuse est détaillé dans la partie bibliographique, nous ne redévelopperons donc pas ce point ici.

Les analyses thermiques différentielles réalisées sur trois formules ont fourni les résultats suivants :

- « BrHPP 12.5% + lactose 5% » ; $T_g = 41^\circ\text{C}$,
- « BrHPP 12.5% + lactose 5% + saccharose 2.5% » ; $T_g = 42.5^\circ\text{C}$,
- « BrHPP 12.5% + lactose 5% + saccharose 2.5% + mannitol 2.5% » ; $T_{g1} = 50^\circ\text{C}$,
 $T_{g2} = 56^\circ\text{C}$.

Comme exposé auparavant dans la discussion sur les résultats du dosage, les mélanges avec excipients doivent avoir une température de transition vitreuse plus élevée que celle du BrHPP seul. Ces résultats montrent également que la formule à base de mannitol a une température de transition vitreuse plus élevée.

Nous pouvons faire ressortir deux éléments majeurs. Tout d'abord les résultats cinétiques sont en adéquation avec les données thermodynamiques. Les formules avec excipients ont une température de transition vitreuse plus élevée que la formule BrHPP seul. Ainsi à la température de conservation +25°C, la mobilité des molécules BrHPP, dans la formule BrHPP seul, proche de leur Tg doit être assez élevée et permet la mise en œuvre de réactions de dégradation plus rapidement que pour les formules BrHPP avec excipients.

Comme le souligne Pikal [22], il est évidemment plus prudent de conserver un produit à une température $T \ll T_g$, pour assurer une meilleure stabilité, mais néanmoins la bonne conservation d'un certain nombre de produits ne dépend pas directement du rapport température de conservation -Tg.

Ainsi affirmer que la formule « BrHPP 12.5% + lactose 5% + saccharose 2.5% + mannitol 2.5% » sera plus stable que les formules « BrHPP 12.5% + lactose 5% » et « BrHPP 12.5% + lactose 5% + saccharose 2.5% » sur la seule base des résultats de détermination de la température de transition vitreuse serait incorrecte.

Les analyses thermiques fournissent également une information concernant l'endotherme de recouvrement. En effet, l'endotherme de recouvrement est nettement plus élevée pour la formule avec mannitol (cf. Figure 62).

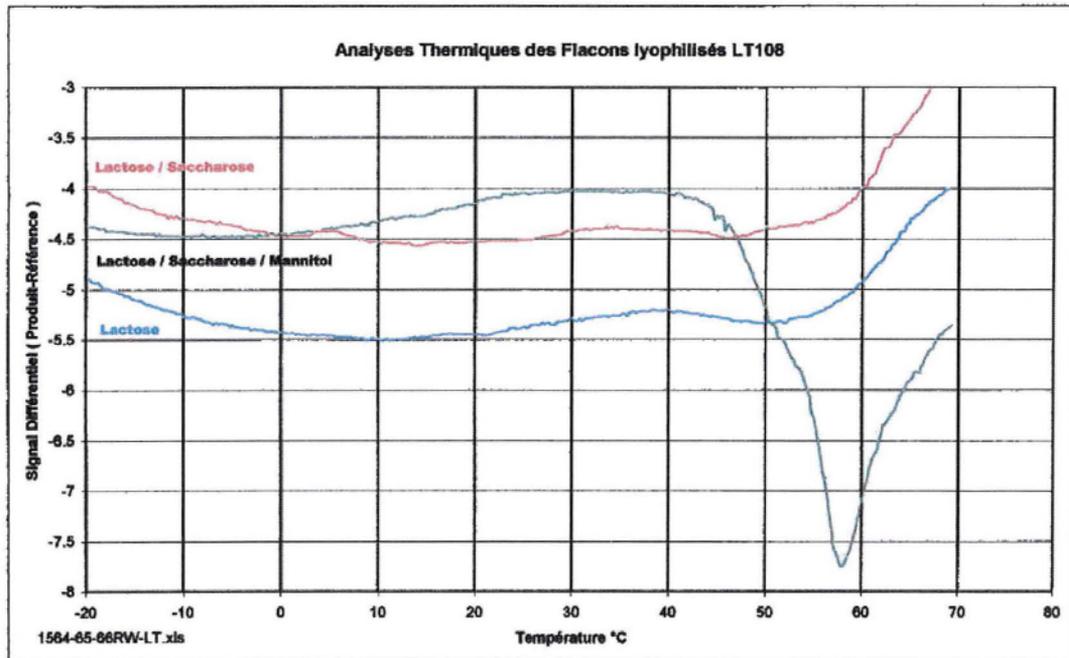


Figure 62 : Analyses thermiques en cours de réchauffement sur produit sec (cycle LT108) effectuées par le Pr. Rey

Cependant, il est difficile de comparer des valeurs d'endotherme entre des formulations différentes. Il est plus pertinent de comparer des vitesses de relaxation structurales et donc de libération d'enthalpie en fonction du temps.

Il serait très intéressant de comparer ces résultats de stabilité avec les nouvelles formules, obtenues grâce au cycle inversé, qui présentent de très bonnes caractéristiques physiques. Il est d'ailleurs programmé de mettre en œuvre des études thermodynamique et cinétique sur les formules mais les résultats ne pourront être présentés dans ce travail.

Conclusion

La lyophilisation est une méthode développée pour le séchage de solutions, suspensions, poudres à basse température. Le principe de la lyophilisation est d'éliminer le solvant, généralement l'eau, par sublimation après avoir solidifié le mélange par congélation et appliqué une très basse pression. Le principe physique est relativement simple. Toute la complexité du procédé réside dans l'adaptation des paramètres temps, température et pression, pour les trois étapes qui sont congélation, dessiccation primaire et dessiccation secondaire, au produit.

Le bromohydrine pyrophosphate (BrHPP), molécule de synthèse et principe actif du produit fini PHOSHOSTIM[®] 200, a **les caractéristiques physico-chimiques** des molécules qui justifient une formulation par lyophilisation. Le BrHPP est sensible à la température, sensible à l'humidité, et très hygroscopique.

Le développement des études de formulation de PHOSHOSTIM[®] 200 s'est déroulé en deux étapes avec deux objectifs distincts. Nous avons comme premier challenge de réaliser un **produit fini pour essai clinique de phase I stable et pharmaceutiquement acceptable**. Cette première partie a été menée dans ce seul but et le temps imparti à la réalisation de ces travaux a limité toutes études complémentaires. L'objectif a été atteint, l'approvisionnement en PHOSHOSTIM[®] 200, stable sur 1 an à -20°C, pour l'essai clinique s'est déroulé sans difficultés.

La deuxième partie du développement a été menée dans un contexte différent : BrHPP avec une meilleure pureté, et temps imparti conséquent. Notre objectif était alors de retravailler le cycle de lyophilisation avec la même formule pour améliorer la stabilité de notre produit mais également de tester de nouveaux mélanges d'excipients, en parallèle.

L'ensemble de ces travaux ont mis en exergue deux difficultés inhérentes à la molécule. Tout d'abord **la molécule se congèle à très basse température**, à cela s'ajoute son très fort pouvoir d'influence sur le comportement de l'ensemble de la formulation. Ceci rend donc l'étape de congélation difficile à mener et nécessite un lyophilisateur de haute technicité qui puisse assurer des températures extrêmement basses. L'identification de cette caractéristique n'a pas été sans difficultés. D'une part la présence de solvants comme l'éthanol, dans la poudre de BrHPP fournie pour les essais d'ARCHEMIS, ont perturbé l'interprétation des résultats. Ils étaient tenus tout d'abord comme principaux « responsables » d'une congélation aussi basse. De plus, leur présence a rendu la recherche de la température de perte de structure par cryomicroscopie impossible. Il aura donc fallu attendre les résultats du Pr. Rey par analyse thermique différentielle et analyse de l'impédance électrique, effectuées sur une poudre exempt de solvant, pour mettre à jour, avec certitude, le comportement basse température du BrHPP.

La deuxième difficulté réside dans le fait que le BrHPP souffre d'une certaine **fragilité à l'égard de l'étape de sublimation**. La recette de lyophilisation mise au point par ARCHEMIS pour la fabrication des lots cliniques, ainsi que les premières recettes de lyophilisation mises au point par le Pr. Rey ont vite prouvé leur limite : manque de robustesse dans les résultats (Table 14). De manière aléatoire, sur les étagères du lyophilisateur, des lyophilisats avec une structure effondrée, non-conforme, ont été retrouvés au milieu de lyophilisats « corrects ».

L'examen visuel des lyophilisats, obtenus dès les essais d'ARCHEMIS, montrait une rétraction dans leur partie basale. La microscopie électronique de ces mêmes lyophilisats, a révélé par la suite une hétérogénéité dans la taille des cristaux de glace ainsi qu'une perte de structure locale dans la partie basale du lyophilisat. Cette rétraction visible à l'œil pouvait être associée à cette perte de structure locale, et révélait la fragilité de la formule.

Le Pr. Rey a alors proposé un cycle avec deux adaptations majeures :

- ◆ **prolongation de la durée du traitement thermique**, dans le but d'homogénéiser la taille des cristaux de glace
- ◆ **abaissement de la température des étagères de manière régulière en cours de sublimation**, dans le but de limiter l'apport de chaleur au produit, notamment en fin de sublimation.

Le cycle LT114 qui réuni ces deux points a permis d'obtenir des lyophilisats dont la structure examinée en microscopie électronique présente de très bons résultats. La rétraction dans la partie basale a disparue. L'ensemble de ces résultats est synthétisé dans la Table 14.

Nous devons maintenant démontrer l'adéquation entre l'amélioration physique et l'amélioration de la stabilité pour PHOSHOSTIM[®] 200. Ces lyophilisats feront l'objet d'études cinétiques et thermodynamiques.

Essais lyophilisation ARCHEMIS – STERILYO				
	Nombre de flacons lyophilisés	Homogénéité des lyophilisats inter-flacons	Aspect visuel des lyophilisats	Etudes sur les formules
Essai échelle laboratoire ARCHEMIS	Une dizaine	Oui	Les lyophilisats présentent une couche sans matière au fond du flacon	Etude comportement basse température
Essai échelle pilote STERILYO	300	Non	L'éthanol semble prisonnier de la matrice BrHPP + lactose	Etude de stabilité
Essai échelle laboratoire ARCHEMIS	Une dizaine	Oui	L'ensemble des lyophilisats sont bombés	
Fabrication premier lot clinique STERILYO	1500	Oui	Rétraction du lyophilisat en partie basale	Etude de stabilité
Fabrication deuxième lot clinique STERILYO	1200	Non, 10 % des flacons ont été retirés	<u>Flacons retirés</u> : structure effondrée <u>Flacons corrects</u> : rétraction du Lyophilisat en partie basale	
Fabrication troisième lot clinique STERILYO	1200	Non, 20 % des lyophilisats ont été retirés	<u>Flacons retirés</u> : structure effondrée <u>Flacons corrects</u> : rétraction du Lyophilisat en partie basale	
Essais lyophilisation Pr. Rey				
	Nombre de flacons lyophilisés	Homogénéité des lyophilisats de même composition	Aspect visuel des lyophilisats	Etudes sur les formules
Cycle LT103	Une dizaine	Oui	L'ensemble des lyophilisats ont perdu leur structure	Etude comportement basse température
Cycle LT104	Une dizaine	Oui	Rétraction du lyophilisat en partie basale	
Cycle LT105	Une dizaine	Oui	Rétraction du lyophilisat en partie basale	
Cycle LT106	Une dizaine	Oui	Rétraction du lyophilisat en partie basale	
Cycle LT108	Une dizaine	Oui	Rétraction du lyophilisat en partie basale	Etude ATD sur produit sec
Cycle LT113	Une centaine	Non, 30% des flacons sont retirés	<u>Flacons retirés</u> : structure effondrée <u>Flacons corrects</u> : retraction du lyophilisat en partie basale	Etude microscopie électronique
Cycle LT114	Une centaine	Oui	Aucune retraction observée	Etude microscopie électronique

Table 14 : Tableau récapitulatif reprenant l'ensemble des essais élaborés sur la formule « BrHPP + lactose »

Ces essais nous ont permis également de **tester d'autres formules** pour PHOSPHOSTIM[®]

200. Tout d'abord par ARCHEMIS, qui a testé la formule « BRHPP 10% + mannitol

2.5% » en concomitance avec la formule actuelle. Cette formule n'a pas été retenue au profit de la formule actuelle.

Essais lyophilisation ARCHEMIS – STERILYO			
	Formule	Résultats	
Essai échelle laboratoire ARCHEMIS	« BrHPP seul » « BrHPP 10% + mannitol 2.5% »	Formule BrHPP seul : dégradation importante pendant la lyophilisation Formule mannitol : Résultats équivalents à la formule BrHPP 12.5% + lactose 2.5%	Etude comportement basse température
Essai échelle pilote STERILYO	« BrHPP seul » « BrHPP 10% + mannitol 2.5% »	Formule BrHPP seul : pas stable, mauvais résultats visuels Formule avec mannitol : Résultats visuels moins bon que la formule BrHPP + lactose, stabilité équivalente	Etude de stabilité
Essai échelle laboratoire ARCHEMIS			
Fabrication premier lot clinique STERILYO			Etude de stabilité
Fabrication deuxième lot clinique STERILYO			
Fabrication troisième lot clinique STERILYO			
Essais lyophilisation Pr. Rey			
	Nouvelles formules testées	Résultats	
Cycle LT103	“BrHPP 12.5% +mannitol 5% +saccharose 2.5%”	Cycle à adapter	Etude comportement basse température
Cycle LT104	“BrHPP 12.5% +mannitol 5% +saccharose 2.5%”	Cycle à adapter	
Cycle LT105	“BrHPP 12.5% +mannitol 7.5% +saccharose 2.5%”	Cycle à adapter	
Cycle LT106	“BrHPP 12.5% +mannitol 7.5% +saccharose 2.5%”	Pas de bons résultats en pression de vapeur, lyophilisats rétractés	
Cycle LT108	“BrHPP 12.5% +lactose 5% +saccharose 2.5%” « BrHPP 12.5% +lactose 5% +saccharose 2.5%+ mannitol 2.5%”	Bons résultats pour la formule avec mannitol : aucune rétraction n'est observée, T _g relativement élevée	Etude ATD sur produit sec
Cycle LT113	BrHPP 12.5% + mannitol 10 %	L'ensemble des lyophilisats ont perdu leur structure	Etude microscopie électronique
Cycle LT114	BrHPP 12.5% + mannitol 10 %	Très bon résultats visuels + bon résultats en microscopie optique	Etude microscopie électronique

Table 15 : Tableau récapitulatif des essais sur de nouvelles formules pour PHOSHOSTIM® 200.

D'autre part une série d'essais effectués en parallèle par le Pr. Rey ont permis de retenir 2 nouvelles formules sur la base de résultats d'études de caractérisation. Ces deux formules sont « BrHPP 12.5%+ lactose 5% + saccharose 2.5% + mannitol 2.5% » obtenue avec le cycle LT108, et « BrHPP 12.5% + mannitol 10% » obtenue avec le cycle LT114. Reste également à comparer les résultats cinétiques et thermodynamiques que peuvent offrir ces formules et comparées ces dernières avec ceux de la formule actuelle.

L'objectif étant de pouvoir proposer une formule pour PHOSPHOSTIM 200 stable à +5°C, voir +25°C sur 18 mois.

Bibliographie

1. Hir, A.L., *Pharmacie galénique Bonnes pratiques de fabrication des médicaments*. Huitième édition ed. Abrégés. 2000, Paris: Masson.
2. Rey, L., *Glimpse into the Realm of Freeze-Drying: Fundamental Issues*, in *Freeze-Drying / Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products*, J.C.May. Louis Rey, Editor. 2004, Marcel Dekker: New-York. p. 1-32.
3. Edwards, R.T.S.J., *Freeze-Drying Handbook*. Edwards High Vacuum. 1978, Sussex: Crawley.
4. Hauduroy, P., *Histoire de la technique de lyophilisation*. Traité de Lyophilisation. 1964, Paris: Hermann.
5. Rey, L., [*A new development in lyophilization: cryodesiccation of nonaqueous systems*]. *Experientia*, 1965. **21**(5): p. 241-6.
6. S. Falson, D.G., *La lyophilisation appliquée aux formes pharmaceutiques et parapharmaceutiques*. 1992, Boulogne-Billancourt: Institut de formation de l'Industrie Pharmaceutique.
7. Rey, L.R., *Thermal analysis of eutectics in freezing solutions*. *Ann N Y Acad Sci*, 1960. **85**: p. 510-34.
8. Steven L. Nails, S.J., Suchart Chongprasert, Shawn A. Knopp, *Fundamentals of Freeze-Drying*, in *Development and Manufacture of Proteins Pharmaceuticals*, N.a. Akers, Editor. 2002, Kluwer Academic / Plenum: New-York.
9. Searles, J.A., J.F. Carpenter, and T.W. Randolph, *The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf*. *J Pharm Sci*, 2001. **90**(7): p. 860-71.
10. Hatley, R.H.M., Franks, F., Day, H. and Byth, B., *Subzero temperature preservation of reactive fluids in the undrecooled state. II. The effect on the oxidation of ascorbic acid of freeze concentration and undercooling*. *Biophys. Chem.*, 1986. **24**: p. 187-192.
11. Rey, L.R., *Glimpses into the fundamental aspects of freeze-drying*. *Dev Biol Stand*, 1976. **36**: p. 19-27.
12. Herman, B.D., et al., *The effect of bulking agent on the solid-state stability of freeze-dried methylprednisolone sodium succinate*. *Pharm Res*, 1994. **11**(10): p. 1467-73.
13. Tang, X. and M.J. Pikal, *Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice*. *Pharm Res*, 2004. **21**(2): p. 191-200.

14. Searles, J.A., J.F. Carpenter, and T.W. Randolph, *Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine $T(g)'$ in pharmaceutical lyophilization*. J Pharm Sci, 2001. **90**(7): p. 872-87.
15. Rey, L., *Aspects industriels et théoriques de la lyophilisation*, ed. A.s.e. industrielles. 1964, Paris: Hermann.
16. Knaus, J.T.P., *Advanced Glassware for Freeze-Drying*, in *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, L.R.J.C. May, Editor. 2004, Marcel Dekker: New-York. p. 299-308.
17. Willemer, H., *Experimental Freeze-Drying: Procedures and Equipment*, in *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, L. Rey, Editor. 1999, Marcel Dekker: New-York.
18. Pikal, M.J., M.L. Roy, and S. Shah, *Mass and heat transfer in vial freeze-drying of pharmaceuticals: role of the vial*. J Pharm Sci, 1984. **73**(9): p. 1224-37.
19. DeGrazio, F.L., *Closure and Container Considerations in Lyophilization*, in *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, J.C.M. Louis Rey, Editor. 2004, Marcel Dekker: New-York. p. 277-298.
20. M.J. Pikal, S.S., M.L. Roy and R. Putman, *The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure*. International Journal of Pharmaceutics, 1990. **60**(3): p. 203-207.
21. Liu, J., et al., *Dynamics of pharmaceutical amorphous solids: the study of enthalpy relaxation by isothermal microcalorimetry*. J Pharm Sci, 2002. **91**(8): p. 1853-62.
22. Pikal, M.J., *Mechanisms of Protein Stabilization During Freeze-Drying and Storage: The Relative Importance of Thermodynamic Stabilization and Glassy State Relaxation Dynamics*, in *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, J.C.M. Louis Rey, Editor. 2004, Marcel Dekker: New-york. p. 63-108.
23. Kakumanu, V.K. and A.K. Bansal, *Enthalpy relaxation studies of celecoxib amorphous mixtures*. Pharm Res, 2002. **19**(12): p. 1873-8.
24. Jouppila, K., J. Kansikas, and Y.H. Roos, *Crystallization and X-ray diffraction of crystals formed in water-plasticized amorphous lactose*. Biotechnol Prog, 1998. **14**(2): p. 347-50.
25. Joshi, M. and A. Misra, *Dry powder inhalation of liposomal Ketotifen fumarate: formulation and characterization*. Int J Pharm, 2001. **223**(1-2): p. 15-27.
26. Ward, K.R., et al., *Protection of the enzyme L-asparaginase during lyophilisation-- a molecular modelling approach to predict required level of lyoprotectant*. Int J Pharm, 1999. **187**(2): p. 153-62.

27. S. Chongprasert, S.A.K., S.L. Nail, *Characterization of Frozen Solutions of Glycine*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **90**(11): p. 1720-1728.
28. Kim, A.I., M.J. Akers, and S.L. Nail, *The physical state of mannitol after freeze-drying: effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute*. J Pharm Sci, 1998. **87**(8): p. 931-5.
29. Cavatur, R.K., et al., *Crystallization behavior of mannitol in frozen aqueous solutions*. Pharm Res, 2002. **19**(6): p. 894-900.
30. Royall, P.G., D.Q. Craig, and C. Doherty, *Characterisation of the glass transition of an amorphous drug using modulated DSC*. Pharm Res, 1998. **15**(7): p. 1117-21.
31. Hancock, B.C., S.L. Shamblin, and G. Zografi, *Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures*. Pharm Res, 1995. **12**(6): p. 799-806.
32. Yoshioka, S., Y. Aso, and S. Kojima, *Prediction of glass transition temperature of freeze-dried formulations by molecular dynamics simulation*. Pharm Res, 2003. **20**(6): p. 873-8.
33. Johnson, S.L.N.a.W., *Methodology for in-process determination of residual water in freeze-dried products*. Development Biological Standard, 1991. **74**: p. 137-151.
34. Milton, N., et al., *Evaluation of manometric temperature measurement as a method of monitoring product temperature during lyophilization*. PDA J Pharm Sci Technol, 1997. **51**(1): p. 7-16.
35. Roy, M.L. and M.J. Pikal, *Process control in freeze drying: determination of the end point of sublimation drying by an electronic moisture sensor*. J Parenter Sci Technol, 1989. **43**(2): p. 60-6.
36. Her, L.M., et al., *Measurement of glass transition temperatures in freeze concentrated solutions of non-electrolytes by electrical thermal analysis*. Pharm Res, 1994. **11**(7): p. 1023-9.
37. Her, L.M. and S.L. Nail, *Measurement of glass transition temperatures of freeze-concentrated solutes by differential scanning calorimetry*. Pharm Res, 1994. **11**(1): p. 54-9.
38. Pikal, M.J. and S. Shah, *Intravial distribution of moisture during the secondary drying stage of freeze drying*. PDA J Pharm Sci Technol, 1997. **51**(1): p. 17-24.
39. Shah, M.J.P.a.S., *Moisture transfer from stopper to product and resulting stability implications*. Development Biological Standard, 1991. **74**: p. 165-179.





Serment des Apothicaïres

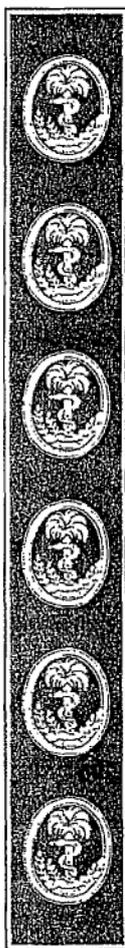
Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

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

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque.



CONCLUSION

Document officiel de Conclusion

Mémoire confidentiel soutenu par : Florence Lhospice

Titre :

PHOSPHOSTIM[®] 200 : Stabilisation par Lyophilisation

Conclusion :

La lyophilisation est une méthode développée pour le séchage de solutions, suspensions, poudres à basse température. Le principe de la lyophilisation est d'éliminer le solvant, généralement l'eau, par sublimation après avoir solidifier le mélange par congélation et appliquer une très basse pression. Le principe physique est relativement simple. Toute la complexité du procédé réside dans l'adaptation des paramètres temps, température et pression, pour les trois étapes qui sont congélation, dessiccation primaire et dessiccation secondaire, au produit.

Le bromohydrine pyrophosphate (BrHPP), molécule de synthèse et principe actif du produit fini PHOSPHOSTIM[®] 200, a les caractéristiques physico-chimiques des molécules qui justifient une formulation par lyophilisation. Le BrHPP est sensible à la température, sensible à l'humidité et très hygroscopique. Le développement des études de formulation de PHOSPHOSTIM[®] 200 s'est déroulé en deux étapes avec deux objectifs distincts. Nous avons comme premier challenge de réaliser un produit fini pour essai clinique de phase I stable et pharmaceutiquement acceptable. Cette première partie a été menée dans ce seul but et le temps imparti à la réalisation de ces travaux a limité toutes études complémentaires. L'objectif a été atteint, l'approvisionnement en PHOSPHOSTIM[®] 200 pou l'essai clinique s'est déroulé sans difficulté.

La deuxième partie du développement a été menée dans un contexte différent : BrHPP avec une meilleure pureté, et un temps imparti conséquent. Notre objectif était alors de retravailler le cycle de lyophilisation avec la même formule pour améliorer la stabilité de notre produit mais également de tester de nouveaux mélanges d'excipients, en parallèle. Ces travaux ont mis en exergue deux difficultés inhérentes à la molécule. Tout abord, ils ont permis d'identifier un comportement atypique du BrHPP aux basses températures : il se congèle à des températures très basses. Par la suite ils ont démontré la fragilité du mélange BrHPP/excipients à l'état solide lors de la sublimation. Cet ensemble d'observations ont participés à la mise en œuvre d'un cycle de lyophilisation particulier avec une congélation à très basse température combiné à un traitement thermique et une diminution progressive de la température en cours ^{de} sublimation afin de conserver une structure solidifiée jusqu'à la fin de l'opération. L'adéquation entre l'amélioration physique et l'amélioration de la stabilité pour PHOSPHOSTIM® 200, est actuellement en cours.

Vu et permis d'imprimer

Grenoble, le

Le doyen

Le président du mémoire

P. DEMENGE



A. BAKRI

07/01/05

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. Bakri', is written over the date '07/01/05'.

PHOSHOSTIM®200 :
Stabilisation par lyophilisation

Thèse soutenue publiquement à la Faculté de Pharmacie de Grenoble le 21 janvier 2005

Composition du jury :

Monsieur le Professeur Aziz Bakri, Président du jury, Directeur de Thèse

Monsieur le Professeur Louis Rey,

Monsieur Jean-Luc Barnoux, Directeur de recherche

Résumé :

La lyophilisation est une technique permettant la dessiccation sous vide de produits liquides préalablement congelés à basse température. Toute la complexité du procédé réside dans l'adaptation des paramètres temps, température et pression, pour les trois étapes qui sont congélation, dessiccation primaire et dessiccation secondaire, au produit.

Le BrHPP, principe actif du produit fini PHOSHOSTIM® 200, a les caractéristiques physico-chimiques des molécules qui justifient une formulation par lyophilisation.

Le développement des études de formulation de PHOSHOSTIM® 200 au sein de la société INNATE PHARMA® s'est déroulé en deux étapes avec deux objectifs distincts. Le premier challenge consistait à réaliser un produit fini pour essai clinique de phase I stable et pharmaceutiquement acceptable.

Le deuxième objectif était de retravailler le cycle de lyophilisation avec la même formule et d'envisager de nouveaux mélanges d'excipients dans le but d'améliorer la stabilité du produit.

Mots clefs :

Stabilisation

Formulation

Lyophilisation

Florence Lhospice

[Données à caractère personnel]

