

**UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES
INSTITUT DE PHARMACIE**

**Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie
Professeur K. AMIGHI**

**DEVELOPPEMENT ET EVALUATION DE MINI-
COMPRIMES FLOTTANTS A LIBERATION
PROLONGEE**

par

JONATHAN GOOLE

**Pharmacien
Assistant à l'Université**

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

Bruxelles, Mai 2008

Je tiens à remercier chaleureusement monsieur le Professeur Karim Amighi pour la confiance qu'il m'a témoigné en me donnant la chance d'effectuer mon doctorat au sein de son service. Il a su percevoir l'envie qui m'habitait alors d'approfondir mon apprentissage dans ce domaine qui me passionne toujours autant, celui de la Pharmacie Galénique et Biopharmacie. Après deux années de recherche, le Professeur Amighi m'a réitéré sa confiance en me permettant d'assurer l'encadrement d'étudiants lors des séances de travaux pratiques. Le poste d'assistant m'a permis d'élargir mes connaissances et de m'épanouir dans la diversité des compétences à acquérir. Le Professeur Amighi m'a également fait découvrir l'envers du décor en m'encourageant à participer activement aux diverses commissions régissant la vie institutionnelle. Sa disponibilité permanente, sa patience et ses conseils judicieux ont contribué au dynamisme de recherche que je me suis efforcé de maintenir pendant ces quatre années. La reconnaissance de ses hautes qualités scientifiques ayant largement dépassé les frontières de l'Institut, de nombreux contrats extérieurs nous ont permis d'obtenir les fonds nécessaires pour parfaire notre formation au cours de divers congrès, séminaires et autres colloques internationaux de qualité. Et comme si cela ne suffisait pas, le Professeur Amighi me donne maintenant l'opportunité d'effectuer un séjour post-doctoral de six mois à Purdue University, aux Etats-Unis.

Pour tout cela, je lui adresse aujourd'hui mes plus sincères remerciements et lui témoigne ma plus profonde gratitude.

Mais comme chacun le sait, il est impossible de construire sans fondation solide. Je remercie donc tous les Professeurs qui, au cours de mon cursus universitaire, se sont efforcés de nous prodiguer un enseignement de qualité, évoluant avec l'air du temps. Je tiens à remercier spécialement le Professeur Henri Alexandre, Professeur de Biologie Générale à l'Université de Mons-Hainaut, pour m'avoir ouvert les yeux sur ce qu'étaient réellement les études universitaires, m'insufflant ainsi la volonté de rechercher toujours le mieux dans ce que j'ai entrepris depuis lors.

Mes remerciements se tournent également vers le Professeur Kauffmann, chef du Service de Chimie Analytique Instrumentale et Bioélectrochimie. Il a été le premier à me faire confiance en me proposant la charge d'élève-assistant à l'ISEPK lors de ma dernière année d'étude. Grâce à ses relations internationales, il est également l'artisan initiateur de mon départ pour les Etats-Unis.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Nève, chef du Service de Chimie Pharmaceutique Organique, pour son soutien quotidien et pour la chance qu'il m'a donné d'élargir mon horizon scientifique en devenant l'un des assistants de ses travaux pratiques.

Parmi mes collègues et amis, je remercie le docteur Jamila Hamdani pour m'avoir soutenu et guidé pendant les premiers mois de mon doctorat ; le docteur Jérôme Hecq, pour son amitié, sa gentillesse, sa patience lors des relectures d'articles et pour l'aide apportée lorsque j'ai repris la charge d'assistantat qu'il assumait jusqu'alors ; Laurance Durand et Flore Depreter qui, malgré l'heure très matinale, m'ont soutenu lors de l'étude clinique réalisée à l'hôpital Erasme ; Nancy Van Aelst et Nathalie Wauthoz pour leur aide lors des séances de travaux pratiques ; le docteur Pierre Van Antwerpen qui, au cours des années est devenu mon modèle d'humilité, pour son soutien, ses conseils et son amitié ; Marie-Louise Faes et Patrick Moreau qui, par leurs compétences, leur courage et leur amitié, m'ont souvent apporté le coup de pouce dont j'avais besoin.

Je terminerai ce paragraphe en citant deux personnes qui ont largement contribué à la réussite de ce travail. Premièrement notre chef technicien, monsieur Philippe Deleuze. Sans son humanité, ses connaissances pratiques et sa débrouillardise légendaire, mes travaux n'auraient pu avancer aussi bien et aussi vite. Pendant quatre ans, il m'a fait partager son expérience technique, me permettant d'harmoniser mes connaissances théoriques avec les compétences pratiques indispensables au bon déroulement d'une thèse de doctorat. Merci pour son amitié. Et enfin, Gabrielle Pilcer, dont les nerfs ont souvent été mis à rude épreuve en me côtoyant depuis tant d'année. Toutefois, jamais elle ne m'a tourné le dos, faisant preuve d'une patience presque unique lorsqu'elle devait supporter mon humour « un peu » lourd ou mes périodes de stress où je devenais invivable. Sa culture littéraire et scientifique a souvent été le point de départ de discussions enrichissantes et constructives. Merci pour son amitié.

Merci au Professeur Viviane Henschel pour le temps passé à superviser et à enrichir ce travail de ses conseils pertinents.

Merci au Service des Radioéléments de l'hôpital Erasme, dirigé par le docteur Serge Goldman, pour avoir pu si bien gérer les analyses scintigraphiques et la prise en charge des volontaires. Je voudrais aussi adresser un remerciement tout particulier au Pharmacien Bernard Van Gansbeke pour sa compétence, sa patience et l'enseignement qu'il m'a prodigué.

Je tiens aussi à remercier la firme SMB-Galéphar pour avoir mis gracieusement ses équipements à ma disposition. Et à travers elle, le Docteur Francis Vanderbist, Directeur du Département Recherche et Développement, pour m'avoir fait partager son expérience et ses connaissances scientifiques au cours des nombreux échanges qui ont jalonné mon parcours doctoral. Je tiens également à remercier chaleureusement Madame Renilde Sibenaler et monsieur Fabrice Van Kerkhoven, pour l'extrême compétence et le professionnalisme dont ils ont fait part lors des analyses plasmatiques consécutives à l'étude clinique.

Merci à Laetitia qui, par sa seule présence, me permet de retrouver le sourire et une joie de vivre quand les moments se font plus pénibles.

Une pensée chargée d'émotion se tourne vers mes grands-parents et ma marraine, partis beaucoup trop tôt.

Enfin, je terminerai par remercier et rendre hommage à mes parents. Leur droiture, leur courage et leurs qualités humaines ont imprégné l'éducation sans laquelle je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui. Ils sont mes modèles et les architectes de ma vie. J'espère qu'en ce jour je pourrai leur rendre la fierté que je ressens d'être leur fils.

« La bougie ne perd rien de sa lumière en la
communiquant à une autre bougie. »

Anonyme

ABREVIATIONS.....	6
RESUME.....	8
PARTIE INTRODUCTIVE.....	13
I. Introduction.....	14
I.1. Facteurs physicochimiques.....	15
I.2. Physiologie et anatomie du système gastro-intestinal.....	16
I.2.1. L'œsophage.....	17
I.2.2. L'estomac.....	18
I.2.3. L'intestin grêle.....	21
I.2.4. Le colon.....	22
I.2.5. Le rectum.....	22
I.3. Les formes orales.....	23
I.3.1. Libération immédiate.....	24
I.3.2. Libération contrôlée.....	24
I.3.3. Libération retardée.....	24
I.3.4. Libération prolongée.....	25
I.3.4.1. Conception des formes à libération prolongée.....	29
I.3.4.2. Les systèmes matriciels.....	32
I.3.4.3. Les systèmes enrobés.....	37
I.3.4.4. Les résines anioniques échangeuses de cations.....	44
I.3.4.5. Les pompes osmotiques.....	44
I.4. Formes monolithiques vs. formes divisées.....	46
I.4.1. Les formes monolithiques.....	46
I.4.2. Les formes divisées.....	47
I.5. Formes à rétention gastrique.....	47
I.5.1. Utilisation d'agents chimiques ralentissant la motilité gastrique.....	49
I.5.2. Les systèmes magnétiques.....	49
I.5.3. Les formes à haute densité.....	49

I.5.4. Les formes bioadhésives.....	50
I.5.5. Les systèmes gonflants et expansibles.....	52
I.5.6. Les formes flottantes.....	53
I.5.6.1. Les formes flottantes sans génération de dioxyde de carbone.....	54
I.5.6.2. Formes flottantes générant du gaz.....	60
II. Approche retenue pour notre recherche.....	65
PARTIE EXPERIMENTALE.....	68
I. Matériel et méthodes.....	69
I.1. Matériel.....	69
I.2. Granulation thermoplastique.....	72
I.3. Analyse de distribution de taille des granulés.....	73
I.4. Compression des mini-comprimés.....	73
I.5. Préparation des mini-comprimés enrobés.....	74
I.6. Mise en gélule.....	75
I.7. Essais de dissolution.....	76
I.8. Evaluation des propriétés de flottaison.....	76
I.9. Analyses par chromatographie liquide haute performance.....	79
I.10. Dosages fluorimétriques.....	81
I.11. Mesure de la radioactivité.....	82
I.12. Analyses LC/MS.....	84
I.13. Outils statistiques.....	85
II. Démarche expérimentale.....	86
III. Synthèse des travaux de recherche publiés.....	89
III.1. Développement et évaluation d'une nouvelle forme flottante divisée permettant la libération prolongée de la levodopa.....	89
III.1.1. Introduction.....	90
III.1.2. Résultats et discussion.....	91

III.1.2.1. Influence de la formulation	91
III.1.2.2. Influence du diamètre.....	93
III.1.2.3. Influence de la force de compression.....	94
III.1.2.4. Influence du pH sur les profils de dissolution.....	95
III.1.2.5. Influence de la vitesse d'agitation.....	96
III.1.2.6. Comparaison des propriétés de flottaison obtenues avec les mini-comprimés flottants et la spécialité commerciale Prolopa [®] HBS 125.....	97
III.1.3. Conclusion et perspectives.....	98
III.2. Evaluation <i>in vitro</i> de mini-comprimés flottants à libération prolongée contenant de la riboflavine, suivi d'une étude <i>in vivo</i> réalisée sur des sujets volontaires sains.....	99
III.2.1. Introduction.....	100
III.2.2. Résultats et discussion.....	101
III.2.2.1. Evaluations <i>in vitro</i>	101
III.2.2.2. Evaluations <i>in vivo</i>	102
III.2.3. Conclusion et perspectives.....	106
III.3. Développement de nouveaux mini-comprimés flottants assurant la libération prolongée de la levodopa grâce à un enrobage acrylique insoluble.....	107
III.3.1. Introduction.....	108
III.3.2. Résultats et discussion.....	108
III.3.2.1. Conception des mini-comprimés enrobés flottants.....	108
III.3.2.2. Influence de la teneur en agents effervescents.....	109
III.3.2.3. Influence du diamètre	112
III.3.2.4. Influence de la teneur en enrobage.....	112
III.3.2.5. Influence du plastifiant.....	114
III.3.2.6. Influence de la quantité de PA incorporé dans le noyau.....	114
III.3.3. Conclusion et perspectives.....	116

III.4. Evaluation et optimalisation des propriétés de flottaison de mini-comprimés flottants contenant de la levodopa et enrobés par un polymère acrylique insoluble.....	117
III.4.1. Introduction.....	118
III.4.2. Résultats et discussion.....	118
III.4.2.1. Influence de la mise en gélule.....	118
III.4.2.2. Effet du pH.....	120
III.4.2.3. Effet de la vitesse de rotation des pales.....	120
III.4.2.4. Influence du pH sur les propriétés de flottaison.....	121
III.4.3. Conclusion et perspectives.....	121
III.5. Evaluation <i>in vitro</i> de deux concepts de mini-comprimés flottants à libération prolongée en fonction du principe actif incorporé.....	123
III.5.1. Introduction.....	124
III.5.2. Résultats et discussion.....	127
III.5.2.1. Retard de libération.....	127
III.5.2.2. Influence du pH sur la dissolution du PA.....	128
III.5.2.3. Evaluation des propriétés de flottaison.....	130
III.5.3. Conclusion et perspectives.....	131
III.6. Etudes scintigraphique et pharmacocinétique sur volontaires sains de mini-comprimés flottants à libération prolongée contenant de la levodopa et de la carbidopa.....	132
III.6.1. Introduction.....	133
III.6.2. Résultats et discussion.....	136
III.6.2.1. Essais <i>in vitro</i>	136
III.6.2.2. Evaluation <i>in vivo</i>	141
III.6.3. Conclusion.....	146

IV. Etudes de stabilité.....	148
IV.1 Introduction.....	148
IV.2. Résultats et discussion.....	150
IV.2.1. Détermination de la teneur en PA.....	150
IV.2.2. Essais de dissolution.....	153
IV.2.3. Evaluation des propriétés de flottaison.....	159
IV.3. Conclusion.....	162
Conclusions générales.....	163
Bibliographie.....	168
Annexes.....	183
Publications.....	210

Abréviations

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

ASC : Aire sous la courbe

ATBC : Acétyltributyl citrate

ATEC : Acétyltriéthyl citrate

°C : Degré Celsius

C_{\max} : Concentration maximale

C_S : Concentration à saturation

cm : Centimètre

cpm : Coups par minute

Ci = Curie

CMC : Carboxyméthylcellulose

CS : Choper Speed (vitesse de rotation du couteau)

DBP : Dibutylphtalate

DEP : Diéthylphtalate

DIP : Diisopropylphtalate

DMP : Diméthylphtalate

DOP : Dioctylphtalate

DOS : Dioctyl sulfosuccinate de sodium

DS : Déviations standards

F: Force

g : Gramme

GABA : Acide gamma-amino butyrique

GI : Gastro-intestinal

h : Heure

HBL : Balance hydrophile-lipophile

HBS : Hydrodynamically Balanced System

HEC : Hydroxyéthylcellulose

HPC : Hydroxypropylcellulose

HPMC : Hydroxypropylméthylcellulose

HR : Humidité relative

CMMI : Complexe myoélectrique migrant interdigestif

IS : Impeller Speed (vitesse de rotation du bras du mélangeur)

l : litre

keV : Kilo électron-volt

m : Mètre

ml : Millilitre

mm : Millimètre

µm : Micromètre

m/m : Rapport masse/masse

mM : Milli mole

M : Molaire

MC : Mini-comprimé(s)

TMF : Température minimale de formation du film

N : Newton / Normal

Pa : Pascal

PA : Principe actif

PEG : Polyéthylène glycol

PR : Poids résultant

PVA : Alcool de polyvinyl

rpm : rotation par minute

s : Seconde

TA : Tensioactif

TAC : Triacétine

TAM : Triméthylaminoéthyl méthacrylate

TBC : Tributyl citrate

TEC : Triéthyl citrate

T_{max} : Temps correspondant à la concentration maximale

TPP : Tripolyphosphate de sodium

v = Volume

VEU : Vitesse d'excrétion urinaire

RESUME

Résumé

Parmi toutes les voies d'administration, la voie orale a toujours suscité un grand intérêt. Les formes prises par voie orale présentent une grande facilité d'administration pour le patient, tandis que pour les chercheurs, la physiologie du système gastro-intestinal peut être facilement modélisable. Malheureusement, son importante variabilité, liée principalement au temps de vidange gastrique, peut conduire à une mauvaise reproductibilité des effets thérapeutiques et à une diminution de la biodisponibilité. Ce problème est surtout rencontré dans le cas des principes actifs présentant une fenêtre d'absorption étroite au niveau de l'intestin supérieur [Deshpande et col., 1996]. Une solution a été de développer des formes galéniques à libération prolongée caractérisées par un temps de résidence gastrique accru. Ainsi, le principe actif est libéré progressivement en amont de sa fenêtre d'absorption. Dans cette optique, plusieurs systèmes ont été développés : des formes bioadhésives, expansibles, gonflantes ou à hautes densités [Singh et Kim, 2000]. Mais parmi toutes ces formes, ce sont les systèmes flottants qui semblent offrir la protection la plus efficace contre une vidange gastrique précoce [Moës, 1989]. Seth et Tossounian ont ainsi développé une gélule flottante à libération prolongée, basée sur le gonflement d'un dérivé cellulosique. Etant une forme monolithique, sa vidange gastrique était soumise au phénomène de tout ou rien. De plus, cette forme présentait un inconvénient majeur puisqu'elle était sujette à des fractionnements intra-gastriques, diminuant de ce fait la reproductibilité inter- et intra-individuelle [Seth et Tossounian, 1984].

Afin de résoudre ces problèmes de variabilité, des mini-comprimés flottants à libération prolongée ont été développés. Notre but était donc de développer des mini-comprimés capables de flotter dans l'estomac pendant une période de temps prolongée tout en assurant la délivrance progressive du principe actif. Ces mini-comprimés devaient fournir une bonne flottaison et une libération prolongée pour diverses substances actives. Nous avons également essayé d'augmenter au maximum la teneur en principe actif afin de faciliter l'administration de la gélule contenant les mini-comprimés en réduisant le volume nécessaire pour contenir la dose désirée. L'utilisation de la granulation thermoplastique [Hamdani et col., 2002] suivie d'une compression

directe a permis d'obtenir un procédé de fabrication simple, rapide et peu coûteux. Les mini-comprimés contenaient au minimum un agent actif, un agent liant et un mélange effervescent. La levodopa a d'abord été sélectionnée comme modèle de principe actif hydrosoluble.

La première forme développée renfermait un agent gélifiant cellulosique capable de retenir le dioxyde de carbone généré tout en assurant la libération prolongée du principe actif. En incorporant 17% (m/m) d'agents effervescents et 25% (m/m) d'agent gélifiant au sein des mini-comprimés matriciels, la libération de la levodopa s'est étendue sur une période de 8 heures. Contrairement à la Prolopa® HBS 125, ils n'ont jamais présenté de problème de fragmentation ou de « désintégration » lors des essais de dissolution. Les mini-comprimés matriciels étaient caractérisés par un faible délai de flottaison (± 1 min.) quel que soit le pH (1.2 ou 3.0), des forces de flottaison élevées et une durée totale de flottaison supérieures à 13 heures. Une évaluation par la technique du poids résultant a montré qu'ils généraient des forces de flottaison supérieures - *ex. PR_{max} = 70mg/100mg* - à la spécialité commerciale Prolopa® HBS 125 - *ex. PR_{max} = 45mg/100mg*.

Suite aux bons résultats obtenus *in vitro*, une étude préliminaire *in vivo* a été effectuée sur des sujets volontaires sains. La riboflavine a été préférée à la levodopa comme modèle hydrosoluble en raison du caractère non invasif des prélèvements. L'hypothèse selon laquelle les mini-comprimés flottants offraient une rétention gastrique supérieure à celle obtenue avec les mini-comprimés non flottants semblait avoir été vérifiée. En effet, la quantité totale de riboflavine excrétée après administration concomitante des mini-comprimés flottants et d'un repas était supérieure à celle excrétée avec une forme flottante prise à jeun, ainsi qu'à celle excrétée lors de l'administration de la forme non flottante prise en même temps que le repas. De plus, quel que soit le régime alimentaire, la vitesse d'excrétion urinaire maximale et le temps nécessaire pour l'atteindre ont toujours été supérieurs après administration de la forme flottante.

Une seconde technologie a ensuite permis de remplacer l'agent gélifiant par un enrobage capable de maintenir le dioxyde de carbone à l'intérieur de la forme tout en assurant la libération prolongée de la levodopa. Le but de cette substitution était de pouvoir augmenter le pourcentage de principe actif contenu dans la forme. Un dérivé acrylique insoluble - *Eudragit® RL30D* - a été utilisé comme agent filmogène. Un agent plastifiant peu hydrosoluble - *ATEC* - a permis d'obtenir un film élastique résistant aux tensions engendrées par la génération du dioxyde de carbone. En appliquant une teneur équivalente à 20% (m/m) d'enrobage autour du noyau, la libération de la levodopa n'a pas été retardée et s'est prolongée pendant plus de 20 heures. Ces mini-comprimés enrobés ont flotté en 20 minutes à pH 1.2 et ont conservé leurs propriétés de flottaison pendant plus de 13 heures.

L'incorporation de lactose (10% m/m) au sein de l'enrobage a permis de libérer l'entièreté de la levodopa en 18 heures. De plus, en augmentant la teneur en acide tartrique dans le mélange permettant de générer le dioxyde de carbone (de 3 à 15 % m/m), le délai de flottaison, identique quel que soit le pH (1.2 ou 3.0), a été réduit de 20 à 8 minutes.

L'influence des propriétés physico-chimiques de la levodopa et de la ciprofloxacine sur les profils de dissolution et de flottaison obtenus à partir des mini-comprimés matriciels et enrobés a ensuite été évaluée. En l'absence de ciprofloxacine dans la composition de l'enrobage, un retard de libération d'une heure est apparu. Il n'a pu être supprimé qu'en incorporant 10% (m/m) de principe actif au sein de l'enrobage. Aucun problème de ce type ne s'est présenté avec la levodopa.

Quel que soit le principe actif incorporé, les mini-comprimés matriciels et enrobés ont flotté en moins de 10 minutes et pendant plus de 13 heures. Toutefois, les valeurs maximales de poids résultant obtenues ont été supérieures en présence de ciprofloxacine - 220 mg/100mg - qu'après incorporation de levodopa - 90 mg/100mg.

Une étude pharmacocinétique sur volontaires sains a finalement été réalisée sur les mini-comprimés matriciels et enrobés contenant une association de levodopa et de carbidopa. Le but de cette investigation était de comparer les profils

pharmacocinétiques de la levodopa et des inhibiteurs de décarboxylases périphériques obtenus à partir des mini-comprimés avec ceux relevés après administration de la spécialité commerciale Prolopa® HBS 125. Une étude scintigraphique a également été réalisée afin d'évaluer le temps de résidence gastrique des 3 formes flottantes. Cette étude a démontré que les mini-comprimés – *matriciels et enrobés* – présentaient un temps de rétention gastrique supérieure à 4 heures. Ils ont également fourni des concentrations plasmatiques soutenues en levodopa et carbidopa pendant plus de 12 heures. La courbe plasmatique de la levodopa obtenue à partir des mini-comprimés enrobés était similaire à celle obtenue après administration de la Prolopa® HBS 125. Dans les 2 cas, les concentrations plasmatiques en levodopa ont augmenté rapidement après 3 heures. Ce phénomène est sans doute dû aux phénomènes de désintégration observés *in vitro* et par scintigraphie. Les mini-comprimés matriciels ont fourni des résultats moins variables en fonction du sexe. Ils n'ont présenté aucune désintégration intra-gastrique, ce qui a évité l'apparition d'effet de pic au niveau des concentrations plasmatiques en levodopa. Comparativement à la carbidopa, les concentrations plasmatiques en benserazide étaient inférieures et présentaient d'importantes variations en fonction du sexe.

Le développement de ces nouveaux types de mini-comprimés a également requis l'examen de leur stabilité temporelle. Pour ce faire, ils ont été conservés à différentes conditions de température et d'humidité relative ($25\pm 2^\circ\text{C} / 60\pm 5\% \text{ HR}$; $30\pm 2^\circ\text{C} / 65\pm 5\% \text{ HR}$; $40\pm 2^\circ\text{C} / 75\pm 5\% \text{ HR}$). A 25°C et 30°C , aucune diminution significative des teneurs en levodopa et carbidopa n'a été observée à partir des 2 types de mini-comprimés. De même, le profil de dissolution des 2 principes actifs sont restés similaires à celui relevé au temps zéro. Après 12 mois de stockage, les mini-comprimés matriciels et enrobés flottaient endéans 10 min et pendant plus de 13 heures. A 40°C , le profil de dissolution de la levodopa et de la carbidopa, ainsi que les propriétés de flottaison des mini-comprimés matriciels et enrobés sont restés similaires à ceux relevés juste après production. Par contre, après 6 mois de stockage, les teneurs en PA ont diminué de façon significative ($p < 0.05$) lorsqu'ils étaient contenus dans les mini-comprimés matriciels.

PARTIE INTRODUCTIVE

I. Introduction

La voie orale constitue de nos jours la principale voie d'administration des médicaments [Deshpande et col., 1996]. Les formes prises par voie orale présentent en effet une grande facilité d'administration pour le patient, tandis que pour les chercheurs, la physiologie du système gastro-intestinal (GI) est facilement modélisable [Soppimath et col., 2001]. Une absorption complète, uniforme et reproductible du médicament administré est recherchée afin d'optimiser l'efficacité thérapeutique, en obtenant les concentrations plasmatiques désirées endéans, et pendant un laps de temps déterminé. Malheureusement, il arrive très souvent que l'importante variabilité inhérente à la physiologie du système GI ne permette pas d'atteindre cet objectif.

Le passage d'un principe actif (PA) de la forme pharmaceutique à la circulation systémique peut être décrit comme un processus incluant quatre étapes (**Figure 1**) :

- Délivrance du médicament ;
- Libération et dissolution du PA ;
- Passage de la substance active dissoute à travers les membranes d'absorption ;
- Transition entre la membrane biologique lipophile et la circulation sanguine.

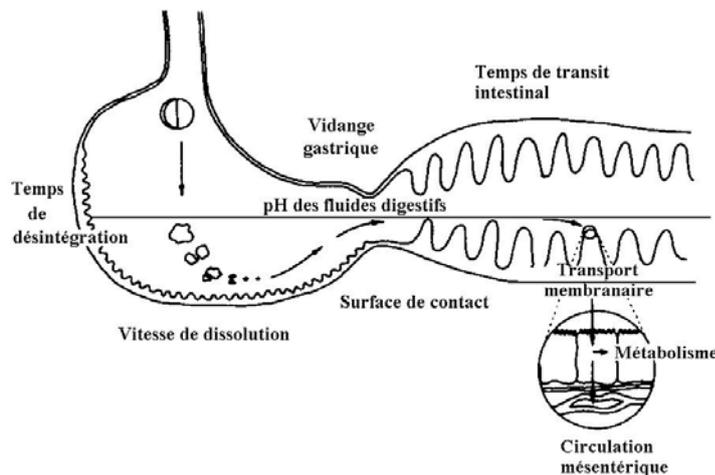


Figure 1: Facteurs influençant la vitesse de libération et de résorption d'un principe actif administré par voie orale [Modifié de Hoener et Benet, 2002]

L'étape caractérisée par la cinétique la plus lente sera celle qui limitera et contrôlera l'ensemble du processus de libération et de résorption de la substance active à partir de la forme orale [Hoener et Benet, 2002].

Mais la résorption n'est pas le seul phénomène rencontré au niveau du tractus GI. Un PA peut aussi être dégradé ou métabolisé avant d'être absorbé. Les dégradations chimiques, essentiellement pH-dépendantes, peuvent s'effectuer sur les substances exogènes dissoutes – *ex. réactions d'hydrolyse dans l'estomac*. En outre, la flore intestinale, composée de microorganismes, peut métaboliser les PA avant leur résorption [Hoener et Benet, 2002]. De plus, les peptides, les nucléotides et les corps gras sont particulièrement sensibles aux dégradations enzymatiques [Pinder et col., 1976]. Ces mécanismes de dégradation étant généralement saturables et/ou inhibables, il est possible de développer des formes capables de les éviter [Jantzen et Robinson, 2002].

De ce fait, il est important de connaître et d'étudier l'ensemble des processus physiologiques et pathologiques pouvant intervenir au niveau du système digestif lors du développement d'une forme orale.

Ainsi, les principales variables influençant la résorption d'un médicament pris oralement peuvent être classées en trois catégories : les variables physiochimiques, physiologiques et celles issues de la forme pharmaceutique ; l'efficacité thérapeutique étant majoritairement conditionnée par des interactions complexes entre ces différentes variables [Mayersohn, 2002].

I.1. Facteurs physicochimiques

La résorption d'un PA dépend fortement de son environnement immédiat – *ex. pH, surface de contact, motilité*. Pour qu'une molécule soit résorbée, elle doit entrer en contact avec la membrane biologique et atteindre la circulation sanguine par diffusion passive ou transport spécialisé. La diffusion passive représente le mécanisme d'absorption le plus fréquemment rencontré. La dissolution du PA étant étroitement liée à sa solubilité en milieu aqueux, mais les membranes biologiques étant de nature lipidique, un des premiers facteurs influençant ce processus est le coefficient de partage eau/huile de la molécule considérée. Ainsi, les composés faiblement solubles étant naturellement caractérisés par une cinétique de dissolution lente, leur incorporation dans des formes à libération prolongée devient moins appropriée. Il faudra également prendre en considération le pKa du PA car il influencera sa solubilité à un pH donné.

Or, seule une molécule non ionisée peut franchir une barrière biologique. Notons encore l'importance de la masse moléculaire et de l'encombrement stérique sur le transport d'une substance donnée à travers une membrane biologique [Jantzen et Robinson, 2002 ; Mayersohn, 2002].

I.2. Physiologie et anatomie du système gastro-intestinal

Le système GI est une région du corps hautement spécialisée dont les fonctions principales impliquent des processus de sécrétion, de digestion et d'absorption [Mayersohn, 2002]. De nombreuses variations anatomophysiologiques complexes apparaissent tout au long du tractus – *ex. pH, motilité, cellules différenciées* (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Caractéristiques anatomiques et physiologiques des différentes sections du tractus GI [Russell et col., 1993 ; Deshpande et col., 1996; Hörter et Dressman, 2001]

Sections	pH moyen		Longueur (cm)	Surface (m ²)	Temps de résidence moyen (h)	
	A jeun	Après repas			A jeun	Après repas
Estomac	1.7	3.5	20	0.1	1.5	3.5
Duodénum	6.1	6.5	30	0.1	< 60 sec	
Jéjunum	6.6	5.6	240	60		
Iléon	7.4	7.5	360	60		3.5
Colon Ascendant		7.1				11.0
Colon Transverse		7.6	120	0.75		12.0
Colon Descendant		7.4				11.0

En se basant sur des critères physiologiques et anatomiques, il convient de diviser le tractus GI en cinq parties distinctes : l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le colon et le rectum (**Figure 2**).

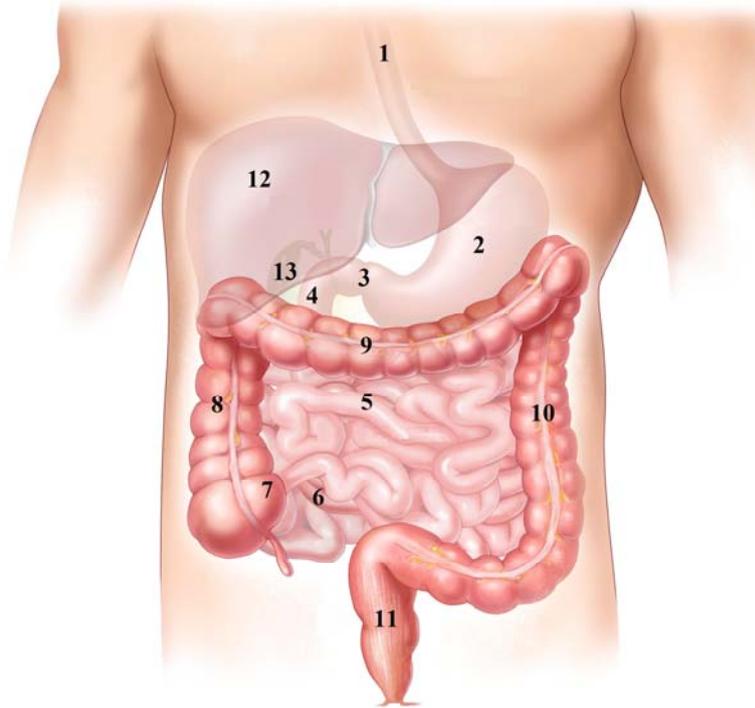


Figure 2 : Représentation schématique du tractus GI :

1. œsophage ;
2. estomac ;
3. pylore ;
4. duodénum ;
5. jéjunum ;
6. iléon ;
7. valve iléo-caecale ;
8. colon ascendant ;
9. colon transverse ;
10. colon descendant ;
11. rectum ;
12. foie ;
13. vésicule biliaire

[Modifié du National Cancer Institute, 2006].

I.2.1. L'œsophage

L'œsophage débute en tant qu'extension du larynx à l'arrière de la cavité buccale. Il se prolonge ensuite le long de la trachée et traverse le diaphragme où il se connecte à l'estomac dans la cavité abdominale. D'un point de vue anatomique et fonctionnel, l'œsophage est la composante la moins complexe du tube digestif. Son rôle est uniquement d'acheminer la nourriture, ou le médicament, du pharynx à l'estomac. Chez l'adulte, l'œsophage fait 25 cm de long. Le transit s'effectue normalement en 5 à 15 secondes mais peut varier légèrement suivant la posture [Wilson, 2000].

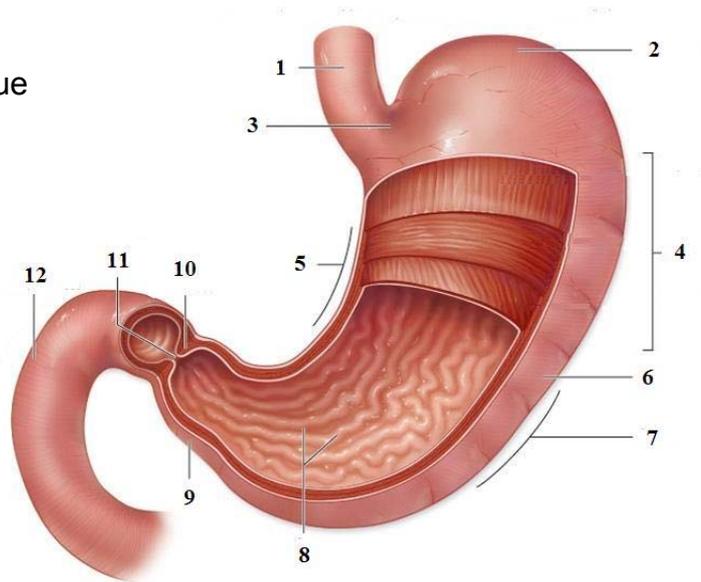
L'œsophage ne joue pas de rôle dans l'absorption des médicaments et ne devrait pas, dans les conditions physiologiques normales, interférer dans le transport des formes pharmaceutiques. Toutefois, certains désordres pathologiques – *ex. dysphagie, élargissement cardiaque gauche, ulcères* – peuvent gêner, voire empêcher la déglutition, altérant ainsi l'ingestion du médicament [Wilson, 2000]. C'est notamment le cas dans la maladie de Parkinson où les patients peuvent présenter de graves difficultés à avaler. La déplétion dopaminergique engendre en effet un dérèglement sévère du réflexe de la déglutition et de la motilité de la langue [Fuh et col., 1997].

I.2.2. L'estomac

L'estomac, situé sur le côté gauche de la cavité abdominale, est situé entre l'œsophage et le duodénum. Son volume varie entre 1500 ml après repas et 25-50 ml en phase interdigestive [Bannister, 1995]. Anatomiquement, il est divisé en trois parties principales: le fundus, le corps et l'antré (**Figure 3**).

Figure 3 : Représentation schématique de l'estomac :

1. œsophage ;
2. fundus ;
3. cardia ;
4. muscles lisses ;
5. courbe antérieure ;
6. corps ;
7. courbe postérieure ;
8. antré ;
9. cavité pylorique ;
10. sphincter pylorique ;
11. orifice pylorique ;
12. duodénum



[Modifié de McGraw-Hill compagnie, 2007]

Le fundus et le corps servent de réservoir aux substances ingérées. L'antré, site principal du brassage, déverse le chyme digestif dans l'intestin toutes les 20 secondes. L'estomac produit ainsi 2 des 8 litres de liquides sécrétés quotidiennement par l'ensemble du système GI [Mayersohn, 2002].

Le pH gastrique, très acide à jeun, augmente en présence de nourriture, fluctuant ainsi en général de 1 à 3,5 (**Tableau 1**). Il varie en fonction de l'âge et de l'état de santé du sujet, du type de nourriture ingérée et d'une éventuelle thérapie médicamenteuse – *ex. anti-acides et inhibiteurs de la pompe à protons* [Russell et col., 1993 ; Mayersohn, 2002].

La vidange gastrique est un paramètre particulièrement important à étudier. La majorité des molécules étant absorbée au niveau de l'intestin grêle, toute modification du temps de résidence gastrique d'une forme pharmaceutique peut engendrer des fluctuations dans la dissolution, l'absorption et les concentrations plasmatiques d'un PA

donné. Le processus de vidange gastrique résulte de contractions péristaltiques distales, dont la force dépend essentiellement du contenu stomacal [Moës, 1993 ; Hwang et col., 1998].

En phase interdigestive, le péristaltisme est contrôlé par le complexe myoélectrique migrant interdigestif (CMMI), résultant de contractions prenant source au niveau du fundus et se terminant à hauteur de l'iléon [Minami et col., 1984].

Le CMMI se décline en 4 phases successives :

- phase I : période sans activité motrice. Elle dure environ 1 heure ;
- phase II : contractions irrégulières d'intensité croissante s'étalant sur une période comprise entre 30 et 45 minutes ;
- phase III : phase de vidange gastrique caractérisée par un péristaltisme intense (« Housekeeper »). Elle dure 5 à 15 minutes et permet d'évacuer les substances non digestibles ;
- phase IV : phase de transition entre la 3^{ième} et la première.

Un cycle complet résultant de l'activité du CMMI dure environ 2 heures et permet d'évacuer totalement de l'estomac vers l'intestin toute substance ingérée [Hwang et col., 1998]. Toutefois, il ne se déclenche qu'après vidange presque complète de l'estomac [Hoener et Benet, 2002].

Kamba et al. ont montré, qu'à jeun, l'estomac pouvait produire des forces de contractions capables de broyer des comprimés dont la dureté s'élevait à 1.5 N [Kamba et col., 2000].

Le processus de vidange gastrique après repas est plus complexe car influencé par de nombreux facteurs mécaniques - *motilité* - hormonaux - *présence de récepteurs* - et neurologiques - *système vagal*. Ainsi, la vitesse de vidange gastrique post prandiale est notamment conditionnée par ces principales variables [Moës, 1993 ; Singh et Kim, 2000 ; Hoener et Benet, 2002] :

- Le volume du bol alimentaire : la dystonie stomacale engendrée par un volume important provoque une vitesse de vidange gastrique initiale élevée.
- Le type de repas : en général, plus l'apport calorique est important, plus la vitesse de vidange gastrique est lente.
 - Acides gras : diminution de la vitesse de vidange proportionnellement à leur concentration et à la longueur des chaînes carbonées ;
 - Triglycérides : diminution de la vitesse de vidange ;
 - Acides aminés : diminution de la vitesse de vidange proportionnellement à leur concentration.
- La pression osmotique : diminution proportionnelle à son élévation.
- Etat physique du contenu gastrique : vidange plus rapide pour les liquides.
- Acides : diminution inversement proportionnelle à leur concentration et masse moléculaire.
- Alcalis : augmentation à faible concentration (1% du total), diminution à concentration élevée (5% du total).
- Médication : certains médicaments influencent la motilité gastrique - *ex. dompéridone, métoclopramide, les antagonistes 5HT₃*.
- Divers :
 - Position du corps : diminution de la vitesse en position couché sur le côté gauche ;
 - Viscosité : légère diminution de la vidange dans le cas des liquides visqueux ;
 - Etat émotif : augmentation de la vitesse en cas de stress, diminution lors d'une dépression [Munk et col., 1978] ;
 - Activité physique : diminution de la vitesse lors d'exercices violents ;
 - Cigarettes : augmentation de la vitesse de vidange ;
 - Sexe : la vitesse de vidange gastrique est plus élevée chez les hommes [Moës, 1993] ;
 - Age : diminution de la vitesse avec l'âge.

En phase digestive, le diamètre du sphincter pylorique n'est que de 2 à 3 mm alors qu'en phase interdigestive, il s'élève à 12.8 ± 7.0 mm [Dressman et col., 1990]. C'est pourquoi, au cours de la digestion, seules les particules possédant un diamètre inférieur à 5 mm peuvent passer le pylore et atteindre ainsi le duodénum [Hwang et col., 1998; Mayersohn, 2002]. Il est donc communément admis que la prise concomitante de nourriture retarde la vidange gastrique en même temps que le transit de la forme pharmaceutique ingérée [Hoener et Benet, 2002]. Le brassage gastrique engendre alors des forces de contraction capables de broyer des formes présentant une dureté inférieure ou égale à 1.89 N, pour autant que leur taille le permette [Kamba et col., 2000].

I.2.3. L'intestin grêle

Comprenant le duodénum, le jéjunum et l'iléon, l'intestin grêle représente plus de 60% de la longueur totale du tractus GI. Il est le principal site de digestion et de résorption des substances ingérées. Les processus de résorption sont, par ailleurs, grandement facilités par la surface de son lumen tout à fait particulière. La muqueuse de ce dernier est constitué de villosités - $0.5 - 1.5$ mm de hauteur et densité de 10 à $40/\text{mm}^2$ - et de microvillosités - ± 0.08 μm de diamètre, 1 μm de hauteur et densité de $600/\text{mm}^2$ - sur toute la longueur, ce qui permet d'augmenter sa surface d'un facteur 600 par rapport à un cylindre lisse [Mayersohn, 2002].

Son pH est largement supérieur au pH gastrique (**Tableau 1**) en raison des sécrétions pancréatiques fortement concentrées en bicarbonates [Mayersohn, 2002].

L'intestin grêle est caractérisé par deux mouvements primaires : la propulsion et le brassage. Les mouvements péristaltiques (propulsion), s'étendant sur une distance de 20 à 25 cm [Hörter et Dressman, 2001], sont à la base du transit intestinal. Leur fréquence ($\sim 1-2$ par seconde) et leur intensité déterminent donc le temps de résidence des différentes substances en cours de digestion. Ce temps de résidence, compris entre 1 et 6 heures (**Tableau 1**), n'est pas influencé par la présence de nourriture. A l'inverse, le brassage s'effectue par des contractions annulaires du muscle lisse localisées sur une distance de 1 à 4 cm [Hörter et Dressman, 2001]. Ce brassage permet principalement d'augmenter encore davantage la surface de contact entre la muqueuse et les substances dissoutes [Mayersohn, 2002].

I.2.4. Le colon

Le colon est la partie du tractus GI se situant entre la fin de l'iléon et le rectum. Sa structure, bien que similaire à celle de l'intestin grêle, se différencie principalement par une importante diminution du nombre de villosités et de microvillosités [Minko, 2004]. Le colon est également appelé gros intestin en raison de son diamètre plus important que celui de l'intestin grêle (~ 6 cm vs. 3 cm). Les fonctions principales du colon sont la résorption de l'eau et des électrolytes (Na^+ et Cl^-) ainsi que le stockage et l'élimination des matières fécales [Mayersohn, 2002].

Comme montré au **Tableau 1**, le pH varie légèrement tout au long du tractus colonique en fonction de la flore bactérienne résidente [Mayersohn, 2002]. Ce pH peut même descendre à 6.4 au niveau de la valve iléo-caecale [Amighi, 2007a].

Le temps de résidence colonique est considérablement plus long que dans les autres sections du tractus GI (**Tableau 1**) et varie de quelques heures à 50, voire 60 heures, selon les sujets [Mayersohn, 2002]. En effet, des problèmes de stagnation peuvent survenir, notamment à l'entrée du colon. Ainsi, le temps de résidence d'une forme pharmaceutique sera influencé par la taille de cette dernière - *ex. formes monolithiques/divisées*.

I.2.5. Le rectum

Segment terminal du tractus GI, terminé par l'ampoule rectale. Il ne possède pas de villosité et ses parois sont fortement irriguées par les veines hémorroïdales inférieures (évite le premier passage hépatique), moyennes et supérieures [Amighi, 2007a].

Comme nous venons de le voir, les variabilités physiologiques caractéristiques du système GI se concentrent essentiellement au niveau de l'estomac. Les principaux sites de résorption étant localisés à hauteur du duodénum, il apparaît qu'une vidange gastrique imprévisible peut poser des problèmes de biodisponibilité et limiter ainsi l'usage de divers médicaments.

Par exemple, une vidange gastrique trop rapide peut conduire à une libération incomplète du PA, engendrant une absorption et des concentrations plasmatiques trop faibles.

Ceci est surtout vrai pour les molécules présentant une fenêtre d'absorption étroite au niveau de l'intestin supérieur (duodénum, jéjunum) – ex. *levodopa*, *ciprofloxacine*, *furosémide*, *riboflavine* (**Figure 4**) [Rouge et col., 1996].

Les formes orales permettant une importante flexibilité conceptuelle, le développement de formes à libération prolongée possédant un temps de résidence gastrique accru a permis de résoudre ce type de problème. Plus le transit sera long, c'est-à-dire plus longtemps la forme restera en amont de son site d'absorption, plus la quantité de PA résorbée sera élevée [Moës, 1989].



Figure 4 : Fenêtre d'absorption étroite au niveau du duodénum. [Cipla[®], 2007]

I.3. Les formes orales

La majorité des formes pharmaceutiques orales se présentent sous forme de comprimés ou de gélules. Ces formes peuvent être caractérisées par une libération immédiate ou modifiée.

Ainsi, en contrôlant la vitesse de libération du PA (k_l) à partir de la forme pharmaceutique, les concentrations plasmatiques obtenues seront directement déterminées par les caractéristiques de libération imposées par la forme galénique (**Figure 5**).

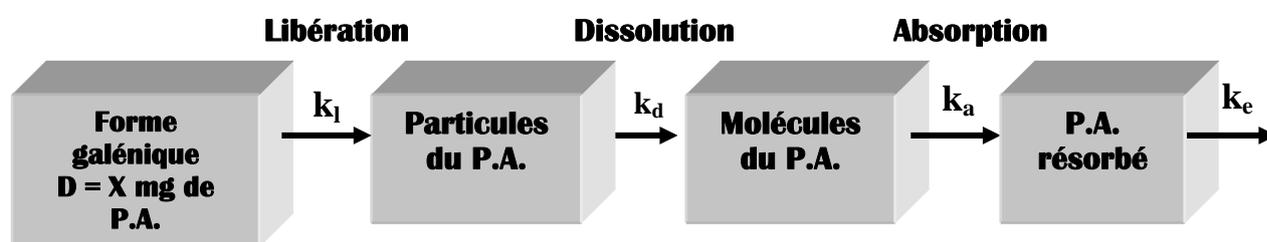


Figure 5 : Représentation schématique de la cinétique de libération d'un PA incorporé dans une forme pharmaceutique – k_l : constante de libération ; k_d : constante de dissolution ; k_a : constante de vitesse d'absorption ; k_e : constante d'élimination ; [Amighi, 2007b].

I.3.1. Libération immédiate

Des formes à libération immédiate doivent être capables de libérer le ou les PA dans le tractus GI, sans délai ni prolongation de sa dissolution ou de son absorption. En outre, il est spécifié qu'une forme à libération immédiate doit pouvoir libérer au moins 85% (m/m) du PA incorporé endéans l'heure [FDA CDER Guidance, 1997].

Un système à libération immédiate implique un $k_l > k_a, k_e$ (Figure 5). Dans ce cas, c'est l'absorption du PA à travers la membrane biologique qui constitue l'étape limitante et non pas la libération du PA à partir de la forme pharmaceutique [Li et col., 1987]. Lorsque le PA présente une action pharmacologique et un temps de demi-vie plasmatique court, ce type de forme nécessite des prises répétées de médicament à intervalle régulier tout au long de la journée. Les concentrations plasmatiques en PA n'atteindront alors la fenêtre thérapeutique que pendant un laps de temps relativement étroit, engendrant une efficacité peu soutenue et des risques de toxicité plus importants en cas de non respect de la posologie (Figure 6).

I.3.2. Libération contrôlée

Une forme pharmaceutique à libération contrôlée peut être définie comme étant un système capable de délivrer une substance active au niveau d'une cible fixée, à une vitesse et pendant une durée prévue pour obtenir l'effet thérapeutique désiré [Sangalli et col., 2001]. Elle contrôle la vitesse de libération du PA afin d'obtenir des taux plasmatiques constants compris dans la fenêtre thérapeutique pendant une période de temps déterminée [Jantzen et Robinson, 2002].

I.3.3. Libération retardée

Les systèmes à libération retardée présentent un temps de latence entre l'administration de la forme pharmaceutique et la libération du PA - *ex. formes gastro-résistantes* [Rouge et col., 1996]. La cinétique de libération ne peut d'ailleurs être altérée et doit être immédiate une fois le processus enclenché [Jantzen et Robinson, 2002]. Un

cas particulier de la libération retardée concerne la libération ciblée. Le PA est alors libéré uniquement au niveau des tissus, de la population de cellules ou de récepteurs ciblés, en laissant les autres sites vierges de toute substance active [Li et col., 1987] - *ex. formes coloniques* [Sangali et col., 2001].

Les formes gastro-résistantes ont été développées principalement pour préserver la muqueuse gastrique de contact direct avec des substances irritantes susceptibles de provoquer des inflammations, voire des ulcérations - *ex. AINS*. Elles préservent également les PA présentant une dégradation accrue en milieu acide.

L'activité enzymatique étant fortement réduite à hauteur du colon, les formes coloniques sont particulièrement intéressantes en cas d'administration de composés sensibles à l'hydrolyse comme les dérivés peptidiques - *ex : protéines, anti-corps monoclonaux*. De plus, une délivrance colonique permet de traiter plus efficacement des pathologies locales comme les colites ulcéreuses ou la maladie de Crohn [Sangali et col., 2001, 2004].

I.3.4. Libération prolongée

Ce type de système libère le PA de façon prolongée dans le temps selon une cinétique déterminée [Venkatraman et col., 2000]. Entre deux prises, ils maintiennent ainsi la concentration plasmatique en PA dans la fenêtre thérapeutique. Leur fréquence d'administration s'en trouvant réduite, les systèmes à libération prolongée apportent un réel avantage par rapport aux formes conventionnelles. En effet, le non respect du schéma posologique est plus courant pour des formes nécessitant des prises journalières multiples, et ceci d'autant plus que la fréquence d'administration est élevée. Des prises quotidiennes répétées réduisent la compliance du patient, augmentant le risque d'erreur et donc de toxicité (**Figure 6**) [Jantzen et Robinson, 2002].

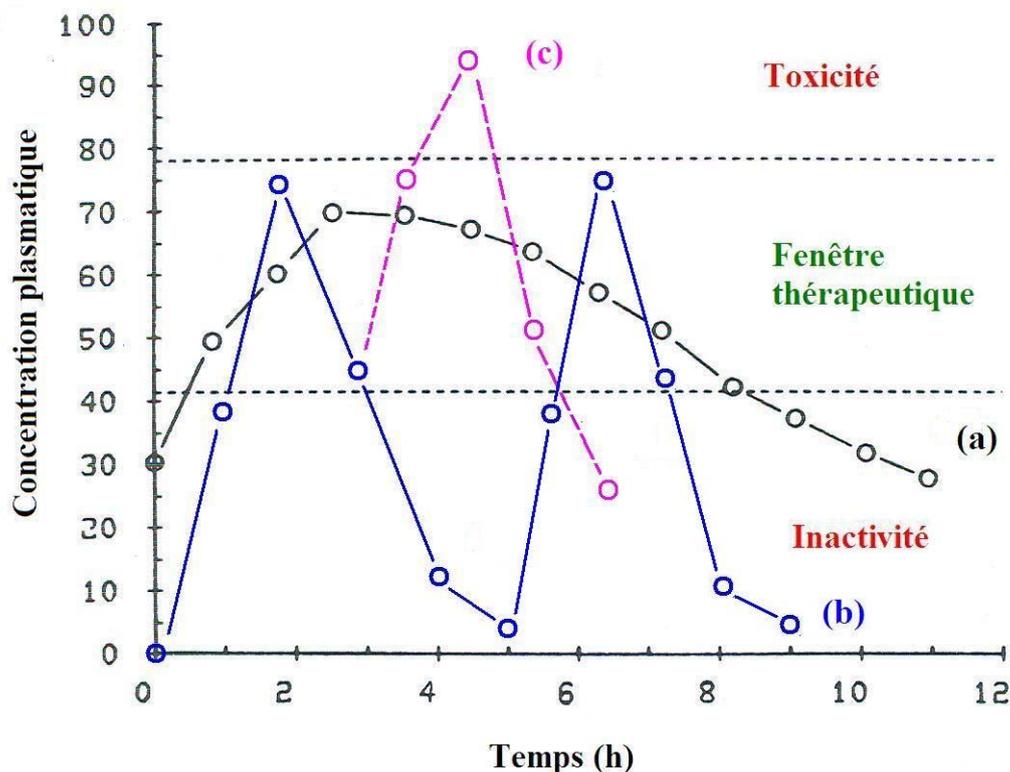


Figure 6 : Exemples de profils pharmacocinétiques obtenus après administration d'une forme à libération prolongée (a) et immédiate avec respect (b) ou non (c) de la posologie. [Modifiée de Skelly et Barr, 1987].

Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire de diminuer la constante de vitesse de libération du PA à partir de la forme galénique. En effet, si $k_l < k_a$, c'est la libération du PA qui devient alors l'étape limitante (**Figure 5**).

En contrôlant la vitesse de libération du PA à partir de la forme pharmaceutique, les formes à libération prolongée offrent plusieurs avantages par rapport aux formes à libération immédiate. Inversement, elles possèdent également quelques inconvénients dont il est parfois important de tenir compte (**Tableau 2**) [Skelly et Barr, 1987 ; Welling et Dobrinska, 1987 ; Qiu et Zhang, 2000] :

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des formes à libération prolongée

Avantages	Inconvénients
Diminution de la fréquence d'administration. Elle permet d'augmenter la compliance du patient en facilitant la posologie – <i>ex. Suppression d'éventuelle prise nocturne</i>	Plus de difficulté à adapter la posologie
Réduction des fluctuations des taux plasmatiques en principe actif et des effets de pics et vallées (Figure 6)	Difficulté de prédire l'efficacité de la forme <i>in vivo</i> à partir des résultats obtenus <i>in vitro</i>
Effet thérapeutique plus uniforme. Un apport continu et homogène en principe actif réduit considérablement les éventuels effets oscillatoires caractérisant les profils de concentration plasmatique obtenus après administrations répétées d'une forme à libération immédiate	Augmentation des risques d'obtenir un éventuel effet de premier passage hépatique plus important puisque ce dernier est très souvent un phénomène saturable. Or, la saturation est généralement évitée lors de l'administration de formes à libération prolongée.
Diminution de l'incidence et/ou de l'intensité des effets secondaires	
Meilleure sélectivité de l'activité pharmacologique	
Coût de production peu élevé	

Toutefois, il est important de savoir que la durée d'action d'un PA dépend essentiellement d'un certain nombre de paramètres pharmacocinétiques et pharmacologiques qui lui sont propres [Skelly et Barr, 1987 ; Welling et Dobrinska, 1987 ; Qiu et Zhang, 2000]. C'est pourquoi toutes les molécules ne sont pas destinées à être incorporées dans une forme à libération prolongée :

- Les molécules caractérisées par un temps de demi-vie plasmatique inférieur à 2h. A l'inverse, celles dont le temps de demi-vie est supérieur à 8h n'ont également aucune raison d'être incorporée dans une forme à libération prolongée car elles sont suffisamment maintenues dans l'organisme pour fournir naturellement une action prolongée ;
- Les PA dont la stabilité est fortement dépendante du pH, des réactions enzymatiques et de la flore microbienne ;
- Les PA nécessitant un dosage élevé (0,5-1,0g) [Jantzen et Robinson, 2002]. Les formes à libération prolongée, nécessitant généralement l'incorporation de PA en quantité 2 à 3 fois supérieure à celle requise pour une forme à libération immédiate, deviennent trop volumineuses pour être ingérées sans difficulté par le patient ;
- Les substances actives possédant une fenêtre thérapeutique étroite ;
- Lorsqu'il n'existe pas de relation entre la concentration plasmatique en PA et son effet thérapeutique ;
- Les PA faiblement solubles dans l'eau. Une faible solubilité freine le processus de dissolution, et par conséquent, l'absorption du PA (**Figure 5**) ;
- Les molécules présentant un premier passage hépatique saturable verront leur biodisponibilité diminuée.

I.3.4.1. Conception des formes à libération prolongée

La libération prolongée d'un PA est essentiellement obtenue par des mécanismes de dissolution, de diffusion, ou par association de ceux-ci.

La dissolution est la mise en solution d'une substance soluble dans un solvant.

La diffusion à travers un film est une composante de la perméabilité représentant les contraintes géométriques rencontrées par l'espèce diffusante à travers un réseau polymérique [Venkatraman et col., 2000]. Elle ne doit pas être confondue avec la diffusion d'une substance mise en solution ou dispersée dans une matrice.

Ainsi, la diffusion d'un PA à travers une membrane d'enrobage dépendra de nombreux facteurs liés au film et/ou aux propriétés physico-chimiques de la substance incorporée (**Tableau 3**). De même, la diffusion d'une substance à travers un système matriciel - *hydrophile ou lipidique* - sera influencée non seulement par les propriétés physico-chimiques inhérentes au PA - *ex. solubilité, poids moléculaire* - mais également par celles caractérisant le réseau matriciel - *ex. hydrophilie, degré de polymérisation, vitesse de gélification, érosion*.

Tableau 3 : Facteurs influençant la diffusion d'une substance dissoute à travers un réseau polymérique (membrane d'enrobage ou système matriciel).

Facteurs d'influence	Effet sur la diffusion
Plastifiant (uniquement systèmes enrobés)	+
Coalescence (uniquement systèmes enrobés)	-
Interaction	-
Mobilité	+
Poids moléculaire du PA	-
Cristallinité	-
Copolymérisation	+/-
Température	+

Le système idéal voudrait que l'on obtienne une cinétique de libération d'ordre zéro (**Figure 7**). Or ce n'est pratiquement jamais le cas car les conditions de diffusion varient généralement au cours du temps avec l'apparition de phénomènes d'érosion, de gonflement ou la création de canaux engendrés par la dissolution progressive du PA à l'intérieur de la matrice ou à la surface de l'enrobage [Hui et col., 1987].

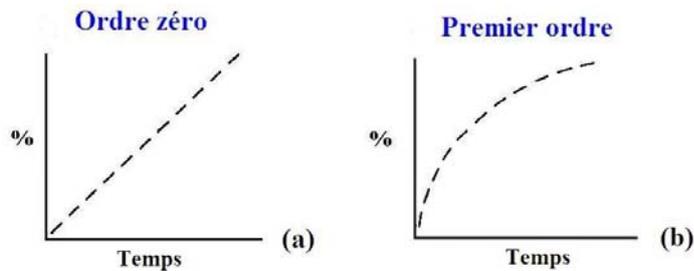


Figure 7 : Cinétiques de libération d'ordre 0 (a) et d'ordre 1 (b) après administration orale d'une forme à libération prolongée [Welling et Dobrinska, 1987].

Lorsque la quantité de PA diffusant à travers la matrice ou l'enrobage est directement proportionnelle au gradient de concentration, la libération est régie par un *ordre 1* (Eq. 1a). Si la diffusion devient indépendante du gradient de concentration, la cinétique peut évoluer vers un ordre 0. Dans le cas des matrices, lorsque apparaissent les phénomènes de relaxation liés à l'érosion et/ou au démantèlement des chaînes de polymère, la libération est régie par une loi exponentielle non-Fickienne - *ordre 1/2* (Eq. 1b). Le même phénomène se produit dans le cas des formes enrobées en cas de dissolution progressive de l'enrobage ou d'apparition éventuelle de fissures en surface [Siepmann et Peppas, 2001 ; Jantzen et Robinson, 2002].

$$\text{Loi Fickienne :} \quad dQ/dt = (D.S.C_p/L).\Delta C \quad (\text{Eq. 1a})$$

$$\text{Diffusion non Fickienne :} \quad Q = kt^n \quad (\text{Eq. 1b})$$

dQ/dt = quantité de PA diffusée au temps t (g/s)

S = Surface de diffusion (m^2)

C_p = Coefficient de partage du PA entre le réseau polymérique et la phase aqueuse

L = Distance (épaisseur) de diffusion (m)

D = coefficient de diffusion (m^2/s)

k = constante de dissolution

ΔC = gradient de concentration (g/l)

n = facteur exponentiel de diffusion

Dans certains cas, la libération initiale ne suit jamais une cinétique d'ordre 1. Comme illustré à la **Figure 8**, il arrive qu'une importante quantité de PA soit libérée dès que la forme entre en contact avec le liquide de dissolution. Cette importante libération initiale est alors suivie d'une diffusion prolongée du PA.

Ce phénomène s'appelle le « burst effect ». Se produisant essentiellement en présence des formes matricielles, il peut être à l'origine d'un échec lors du développement d'une forme à libération prolongée. Même si ce phénomène reste difficilement contrôlable, il est possible de réduire ses effets en augmentant, par exemple, la force de compression, en incorporant des corps gras, des polymères gélifiants de haut poids moléculaire ou en évitant l'utilisation d'agents désintégrant.

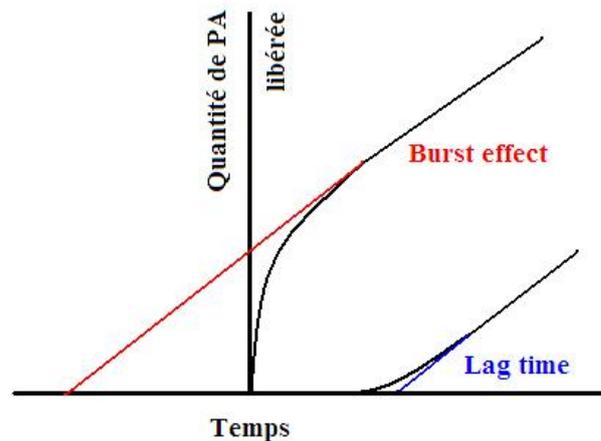


Figure 8 : Représentations graphiques du « burst effect » et d'un délai de libération [d'après Jantzen et Robinson, 2002]

Les causes provoquant un burst effect peuvent être attribuées à de nombreux phénomènes physicochimiques :

- Conditions de fabrication : le PA peut se concentrer en surface lors de la fabrication ou du stockage de la forme matricielle, surtout lorsqu'il est incorporé en concentration importante. Dans le cas des formes enrobées, de mauvaises conditions de préparation peuvent conduire à une non homogénéité de l'enrobage – *ex. coalescence incomplète des chaînes de polymère* ;
- Manque de cohésion de la matrice : force de compression trop faible, teneur en agent liant insuffisante ;
- Hétérogénéité de la matrice : un burst effect peut apparaître si des pores ou des fissures apparaissent à l'intérieur et/ou en surface de la matrice lors de fabrication ;

➤ Propriétés physico-chimiques de la substance active : les petites molécules présentant une solubilité aqueuse importante favorisent l'apparition d'un burst effect.

Certains systèmes peuvent également présenter un délai de libération de la substance active (**Figure 8**). Dans les systèmes matriciels, ce phénomène se produit lorsque la matrice gélifie trop rapidement ou en cas d'une hydrophobicité trop importante. Dans les deux cas, la dissolution du PA est ralentie consécutivement à une diffusion aqueuse moins importante au sein de la matrice. Ce type de phénomène peut également se produire avec les formes enrobées – *ex. un film trop épais ralentit la diffusion de l'eau à travers l'enrobage* [Jantzen et Robinson, 2002].

A ce jour, quatre technologies permettent d'obtenir une libération prolongée du PA à partir d'une forme pharmaceutique prise par voie orale : les systèmes matriciels [Bugarelli et col., 2000 ; Hamdani et col., 2002], enrobés [Ichikawa et col., 1991 ; Iannuccelli V. et col., 1998a], les résines échangeuses d'ions [Atyabi et col., 1996] et les pompes osmotiques [Qiu et Zhang, 2000].

I.3.4.2. Les systèmes matriciels

Les systèmes matriciels peuvent être définis comme étant des dispersions uniformes de PA dans un support matriciel (**Figure 9**). La vitesse de dissolution du PA est influencée par la vitesse de pénétration de l'eau à travers la matrice. La libération du PA dépendra essentiellement de la diffusion [Hui et col., 1987]. Toutefois, dans le cas des PA peu solubles, la dissolution peut devenir un facteur limitant.

Ainsi, il est possible de moduler cette diffusion en fonction de la nature de la matrice – *ex. hydrophile, hydrophobe, inerte*.

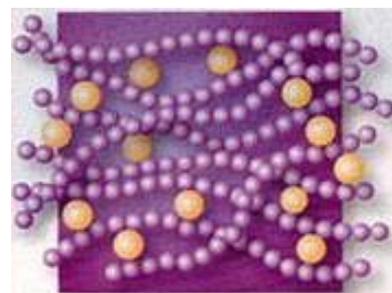


Figure 9 : Schématisation d'un système matriciel [Cipla®, 2007]

Matrices hydrophiles

Les matrices hydrophiles sont composées de polymères capables de retenir le PA pendant un laps de temps prolongé en formant une gangue gélativeuse au contact du milieu de dissolution. Le gonflement de la matrice, issu du phénomène de gélification, se produit par hydratation des chaînes de polymère (ponts hydrogènes entre les molécules d'eau et les chaînes de polymère) [Kiil et col., 2003]. La diffusion de l'eau à l'intérieur de la matrice s'effectue dès contact avec le milieu de dissolution. La présence d'eau entre les chaînes de polymère augmente leur mobilité, facilitant ainsi le transport du PA à l'intérieur de la matrice. Le PA est donc libéré par diffusion à travers la couche visqueuse gélifiée mais également par érosion des chaînes de polymère (**Figure 10**). Cette dernière est engendrée par le démantèlement des chaînes lorsque la concentration hydrique devient trop importante. Elle correspond à un changement brusque des propriétés rhéologiques du gel [Colombo et col., 2000].

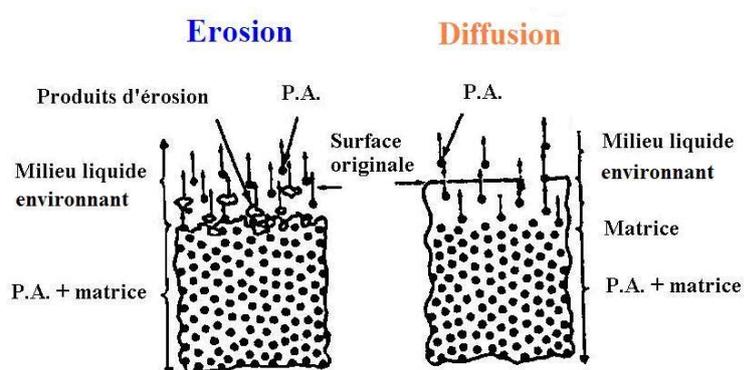


Figure 10 : Représentation schématique de la libération d'un PA incorporé dans un système matriciel par les mécanismes d'érosion et de diffusion [Modifié de Dandelot, 1990]

Les matériaux hydrophiles les plus couramment utilisés sont sélectionnés parmi [Qiu et Zhang, 2000] :

- Les dérivés cellulosiques : les celluloses sont des dérivés ioniques - *ex.* CMC Na - ou non ioniques - *ex.* : HPMC, HPC, HEC - solubles dans l'eau. Ils diffèrent les uns des autres par leur degré de substitution et de polymérisation qui leur confèrent des viscosités différentes ;

- Les polymères polyoxyéthylénés : dérivés non ioniques - *ex. Huile de ricin polyoxyéthylénée* - solubles dans l'eau dont la structure générale se compose de groupements $-(OCH_2CH_2)_n-OH$;
- La gomme xanthane : gomme polysaccharidique soluble dans l'eau. Des trisaccharides - *résidus d'acide glucuronique* - sont greffés latéralement sur la chaîne cellulosique principale ;
- Les alginates : polysaccharide - *acides mannuronique et glucuronique* - gélifiant soluble dans l'eau ;
- Des copolymères d'acide acrylique : gélifient dans les milieux tamponnés mais sont insolubles en milieu acide. Ils sont anioniques en raison de leurs groupements acryliques $-(CH_2-CH)_n-COOH$.

De tous ces dérivés, l'HPMC est le souvent utilisé en raison de son important potentiel de gélification et de ses bonnes propriétés rhéologiques qui lui confèrent de meilleures caractéristiques de granulation et de compression [Ferrero Rodriguez et col., 2000]. L'HPMC est un dérivé cellulosique non toxique (Figure 11).

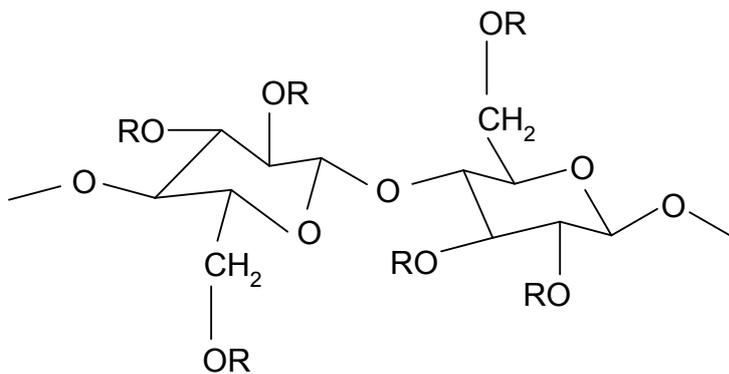


Figure 11 : Structure chimique de l'HPMC

[Siepman et Peppas, 2001].

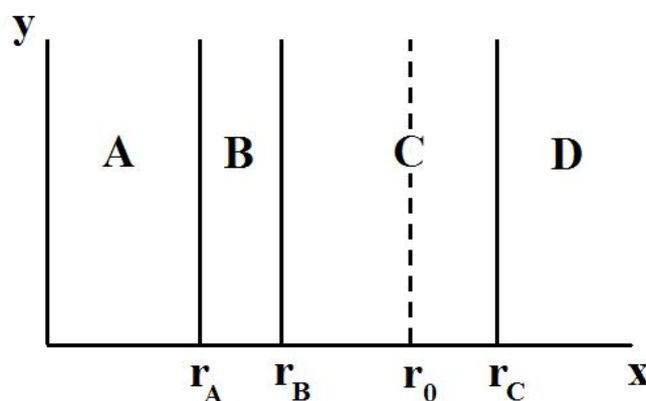
R = $-CH_3$ R = $-CH_2-CH-(CH_3)-OH$ R = $-H$

Ses propriétés physico-chimiques - *ex. gélification, rétention, hydratation* - sont déterminées par sa teneur en groupements (i) méthoxy, (ii) hydroxypropyl et (iii) son poids moléculaire [Kiortsis et col., 2005]. Ainsi, Lee et Peppas ont démontré qu'il était possible de prévoir l'épaisseur de la couche gélifiée en fonction du temps mais

également les vitesses de gélification et d'érosion [Lee et Peppas, 1987]. Harland et al. ont ainsi constaté que l'épaisseur de la couche gélifiée était directement proportionnelle au carré du temps aussi longtemps que le phénomène de gélification était plus rapide que l'érosion [Harland et col., 1988].

Schématiquement, un système matriciel hydrophile mis en solution est composé de trois fronts dynamiques distincts, de nature et de comportement différent vis-à-vis de la libération du PA (Figure 12) [Kiil et col., 2003].

Figure 12 : Représentation schématique du front de gélification r_A , du front de diffusion r_B , de la surface initiale de la matrice r_0 et du front d'érosion r_C . L'abscisse X représente la distance radiale de la forme matricielle. (A) le corps de forme non gélifié contenant le PA non dissous; (B) couche gélifiée contenant le PA non dissous; (C) couche gélifiée contenant le PA dissous; et (D) milieu de dissolution [de Ferrero Rodriguez et col., 2000].



Avant immersion, la surface initiale de la forme matricielle est représentée par r_0 . Lorsque la forme entre en contact avec le milieu de dissolution, le polymère s'hydrate pour former une gangue gélatineuse en surface.

Ainsi, le **front d'érosion (r_C)**, est directement en contact avec le milieu de dissolution. Il est constitué des chaînes de polymère en cours de démantèlement. Il constitue le facteur principal régissant la dissolution des PA peu solubles.

Le front de diffusion (r_B) constitue l'interface entre les couches de polymère gélifié contenant le PA dissous et non dissous. La diffusion du PA dans la zone r_B - r_0 est caractérisée par une cinétique d'ordre 0. Au niveau de la zone r_0 - r_C , la diffusion du PA est alors conditionnée par le phénomène d'érosion. Une diffusion constante du PA ne s'effectue donc que lorsque le polymère gélifie plus vite qu'il ne s'érode.

Le déplacement du front de solvant en **zones B et C** est significativement plus élevé qu'en zone A ($\sim 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$), ce qui facilite la diffusion radiale du PA dissous vers le front d'érosion.

Le front de gélification (r_A) sépare la matrice non gélifiée de l'espace où la pénétration de l'eau a déjà provoqué l'hydratation des chaînes de polymère, engendrant le gonflement de la matrice.

L'HPMC présente en **zone A** se trouve sous forme non gélifiée puisque le milieu de dissolution n'a pas encore diffusé à travers la matrice. La mobilité des chaînes de polymère est très faible, ce qui ralentit fortement le déplacement du front de solvant ($\sim 10^{-16} \text{ m}^2/\text{s}$ à 37°C).

L'épaisseur de la couche gélifiée évolue donc selon 3 phénomènes :

- Elle augmente lorsque la pénétration de l'eau est le phénomène dominant ;
- Elle reste constante lorsque le gonflement du polymère compense l'érosion ;
- Elle diminue au moment où l'entièreté de la matrice est gélifiée et est alors influencée uniquement par le phénomène d'érosion.

La cinétique de libération du PA est étroitement liée à cette évolution dynamique de la couche gélifiée [Colombo et col., 2000 ; Kiil et col., 2003].

Matrices lipidiques

Ce type de matrice libère le PA par diffusion et/ou érosion de la matrice lipidique par les lipases digestives [Hui et col., 1987]. S'agissant de corps gras, l'érosion de la matrice sera influencée par la présence de tensioactifs et la valeur du pH. La libération du PA dépend alors essentiellement de la diffusion du liquide de dissolution à travers la matrice lipophile. Cette dernière sera fonction de la nature et de la concentration de l'agent hydrophobe utilisé ainsi que des caractéristiques de la matrice - *ex. épaisseur, présence d'agents hydrosolubles* - et de la couche stagnante de diffusion [Venkatraman et col., 2000]. Les matrices lipidiques sont principalement constituées d'excipients hydrophobes tels que les cires, les alcools gras, les glycérides, les esters d'acides gras et de glycérol et les huiles. Généralement, le PA est mélangé au(x) corps gras liquide(s) ou ramolli(s). Ce mélange est ensuite refroidi, granulé, comprimé [Goole et col., 2007] ou pelletisé [Hamdani et col., 2002].

Matrices inertes

Les matrices inertes, également appelées matrices insolubles, constituent un édifice poreux formé par des particules polymériques inertes, non digestibles et insolubles dans les fluides du tractus intestinal - *ex. l'éthylcellulose, les polyméthacrylate de méthyl, les acétate de polyvinyl ou les Eudragit® RS, RL et NE*. Ces matrices inertes sont théoriquement indéformables. La libération de la substance active s'effectue par diffusion à travers un réseau de canalicules dont l'importance augmente au cours de la dissolution du PA [Ingani, 1987a].

I.3.4.3. Les systèmes enrobés

Dans le cas des systèmes enrobés, la dissolution du PA est essentiellement dépendante de sa solubilité et des caractéristiques du film d'enrobage - *ex. épaisseur, perméabilité, solubilité* [Hui et col., 1987]. Il s'agit de systèmes réservoirs impliquant des processus de diffusion et de dissolution.

La diffusion d'une substance à travers une membrane est fonction du gradient de concentration (Eq. 2) [Porter et Hogan, 1984]:

$$dQ/dt = (S.D.C_p/h).(C_i - C_m) \quad (\text{Eq. 2})$$

dQ/dt = Quantité de PA diffusée au temps t (g/s)

S = Surface diffusion (m^2)

D = Coefficient de diffusion (m^2/s)

C_p = Coefficient de partage du PA entre le réseau polymérique et la phase aqueuse

h = Epaisseur du film (m)

$C_i - C_m$ = Gradient de concentration entre le noyau et le milieu de dissolution (g/l)

Si tous les paramètres présents à droite de l'équation restent constants, la diffusion du PA sera caractérisée par une cinétique d'ordre zéro. Les coefficients de diffusion et de partage étant des constantes caractéristiques du système, il est possible

d'obtenir une libération d'ordre zéro en gardant la surface de contact, l'épaisseur du film et le gradient de concentration constants.

Les formes monolithiques étant sujettes aux fragmentations, les formes divisées offrent l'avantage de fournir une surface de contact constante pendant un laps de temps supérieur. De plus, pour obtenir une surface de contact régulière et homogène, la compression sera préférée au procédé de pelletisation. En effet, les microbilles ne possèdent jamais une surface identique dépourvue de rugosités.

Une épaisseur constante de film peut essayer d'être conservée en appliquant une teneur suffisamment élevée pour limiter une éventuelle solubilisation de l'enrobage [Seitz et col., 1986].

Idéalement, la forme pharmaceutique doit pouvoir réguler le gradient de concentration afin de le maintenir constant ($C_i = C_s$). *In vitro*, C_m devrait rester très faible afin de se maintenir dans les conditions SINK.

La cinétique d'ordre zéro peut alors être conservée jusqu'à dissolution presque complète du PA à l'intérieur de la forme. Par après, la libération du PA sera régie par une cinétique d'ordre 1.

Quatre principaux mécanismes régissent la libération des substances actives à partir de formes enrobées par un polymère insoluble [Ozturk et col., 1990 ; Jantzen et Robinson, 2002] :

➤ Solubilisation / diffusion à travers une phase homogène du polymère plastifié

Ce type d'enrobage ne contient aucun pore. Le plastifiant et les autres additifs sont distribués de façon homogène. Le liquide diffuse à travers l'enrobage et dissout le PA au niveau du noyau. Le PA dissous diffusera alors du noyau vers le liquide de dissolution (**Figure 13**). La diffusion sera régie par un coefficient de partage de la substance entre le polymère et la phase aqueuse au sein du noyau [Qiu et Zhang, 2000].

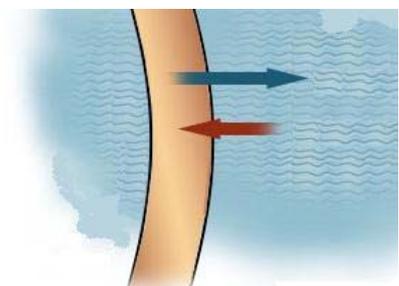


Figure 13 : Diffusion à travers un film d'enrobage

➤ Solubilisation / diffusion à travers des canaux de plastifiant

Le plastifiant n'est pas distribué de façon homogène au sein de l'enrobage. Il se trouve alors sous forme de canalicules permettant la diffusion du PA dissous. La diffusion dépendra toujours d'un coefficient de partage, mais cette fois entre le plastifiant et la phase aqueuse.

➤ Diffusion à travers des pores aqueux

Ce type de système peut être développé à partir d'un agent filmogène insoluble associé à un polymère présentant une solubilité pH-dépendante - ex. *Eudragit® L* - ou à des substances hydrosolubles dispersées au sein de l'enrobage - ex. *lactose, PEG, HPMC*. La libération du PA est alors dépendante de la dissolution de l'agent capable de générer ces pores de diffusion.

➤ Libération sous l'impulsion d'une pression osmotique

Le PA et l'excipient hydrosoluble génèrent une différence de pression osmotique facilitant la pénétration de l'eau à l'intérieur de la forme. Le PA dissous, diffusera à travers la membrane d'enrobage.

Composition des dispersions d'enrobage

Les dispersions d'enrobage organiques sont de moins en moins valorisées en raison du risque encouru par l'expérimentateur et des coûts importants pour l'industriel [Hogan, 1982]. Ainsi, les dispersions aqueuses ont connu un succès croissant dû au développement de dispersions colloïdales de polymères insolubles et entérosolubles [Pondel, 1984 ; Amighi, 1995].

Le terme «latex» désigne les dispersions colloïdales de polymères dans l'eau. La taille des particules dispersées est généralement comprise entre 10 et 1000nm. Les latex sont caractérisés par une viscosité faible. Les dispersions aqueuses disponibles sur le marché contiennent généralement 30 à 40% (m/m) de substance solide. La vitesse de

sédimentation des particules du polymère doit être inférieure à 1mm/24h [Amighi, 1995].

De nos jours, les dispersions aqueuses constituent un premier choix pour l'enrobage des formes solides en raison de leurs excellentes propriétés filmogènes [Lehmann, 1993].

Les dérivés poly(méth)acryliques : les Eudragit®

Les premiers copolymères d'acide méthacrylique étudiés étaient gastro-résistants (solubilité intestinale pH-dépendante) – *ex. protection de la muqueuse gastrique*. Par la suite, cette gamme de produits a été élargie en introduisant sur le marché des dérivés poly(aminoalkyl)méthacrylate gastrosolubles et insolubles – *ex. libération prolongée*. Les dérivés poly(méth)acrylates utilisés en pharmacie sont plus connus sous leur dénomination commerciale d'Eudragit® [Lehmann, 1996].

La résistance de ces dérivés poly(méth)acryliques est due à la structure moléculaire rigide du polymère [Fukumori et col., 1988]. Ce dernier est composé d'une chaîne centrale carbonée stabilisée par des groupements «méthyl». Les groupes esters des dérivés polyacrylates et poly(méth)acrylates sont très résistants à l'hydrolyse (Figure 14) [Lehmann, 1996].

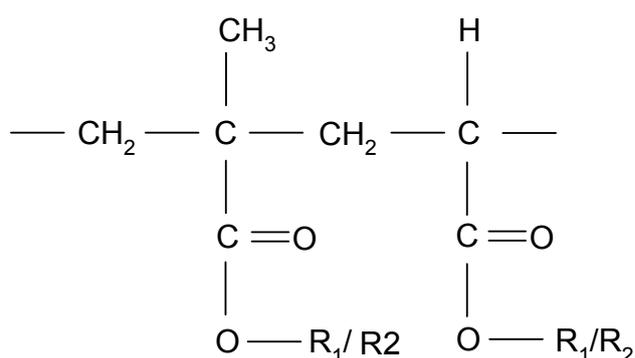


Figure 14 : Structure chimique générale des dérivés acryliques (Eudragit®) [Lehman, 1996]

Les polymères sont obtenus à partir de monomères de type (R1 et R2 cf. pages 41-42) :

- Méthylméthacrylate (MM)
- Ethylacrylate (EA)
- Acide méthacrylique (MA)

➤ Les polymères gastrosolubles mais insolubles au dessus de pH 5.0

Ces polymères sont souvent utilisés en tant qu'agents isolants afin de masquer un goût ou une odeur désagréable [Lehmann, 1989].

● Eudragit® E

Copolymères cationiques de diméthylaminoéthyl méthacrylate et d'esters neutres d'acide méthacrylique.



➤ Les polymères entérosolubles

Leur caractéristique gastro-résistante permet d'éviter tout contact entre la muqueuse gastrique et des PA irritants pour cette dernière - *ex. AINS*. Ces dérivés peuvent également entrer dans la fabrication de formes à libération ciblée lorsque le PA doit être délivré préférentiellement au niveau intestinal (Eudragit® L et S) ou colonique (Eudragit® FS) - *ex. PA sensibles en milieu acide, médicaments de la maladie de Crohn*.

● Eudragit® L, S et FS

Copolymères anioniques de l'acide méthacrylique (AMa) et d'éthylacrylate (EA) ou de méthylméthacrylate (MM).



Poly(AMa-EA) 1 :1 = Eudragit® L 100-55

Poly(AMa-MMa) 1 :2 = Eudragit® S

Poly(AMa-MMa) 1 :1 = Eudragit® L 100

Poly(AMa-EA) 1 :2 = Eudragit® FS

➤ Les polymères insolubles quel que soit le pH

Vu leur caractère insoluble, ces polymères entrent majoritairement dans la composition des formes à libération prolongée.

● Eudragit® NE 30D (Neutral Ester)

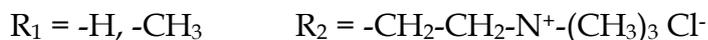
Copolymère d'éthylacrylate et de méthylméthacrylate (2:1)



L'Eudragit® NE 30D étant caractérisé par une température de transition vitreuse faible, il est utilisé sans plastifiant afin d'éviter la formation de films collants [Bindschaedler et col., 1983].

● Eudragit® RL / RS

Les Eudragit® RS (Schwerdurchlässig ou peu perméable) et RL (Leichtdurchlässig ou très perméable) sont des copolymères légèrement cationiques d'ester d'acide acrylique et méthacrylique de teneur faible en groupements ammonium quaternaire.



Leur masse moléculaire moyenne est d'environ 150000 (g/mol). La proportion en groupements triméthylaminoéthyl méthacrylate (TAM) influence fortement la perméabilité des films obtenus. Le dérivé RL en contient le double du dérivé RS.

La valeur de température minimale de formation de film (TMF) de ces dérivés étant comprise entre 40 et 50°C, la formation d'un film homogène, au cours du procédé d'enrobage, nécessite généralement l'addition de 10 à 20% (m/m) de plastifiant par rapport au poids du polymère filmogène [Bodmeier et Paeratakul, 1993].

Les plastifiants les plus efficaces sont principalement les esters citriques : le triéthyl citrate (TEC), l'acétyltriéthyl citrate (ATEC), le tributyl citrate (TBC) et l'acétyltributyl citrate (ATBC), la triacétine (TAC) et le diéthylphtalate (DEP) [Lehmann, 1989 ; Guo, 1994]. D'autre part, l'addition d'un plastifiant permet également d'améliorer les propriétés de résistance mécanique des films obtenus – *ex. augmentation de la flexibilité*.

La structure chimique variable des dérivés acryliques engendre des solubilités et des comportements différents en fonction du pH. Ainsi, il est possible de contrôler la cinétique de libération du PA et/ou le site de dissolution du polymère filmogène au niveau du tractus gastro-intestinal (**Figure 15**).

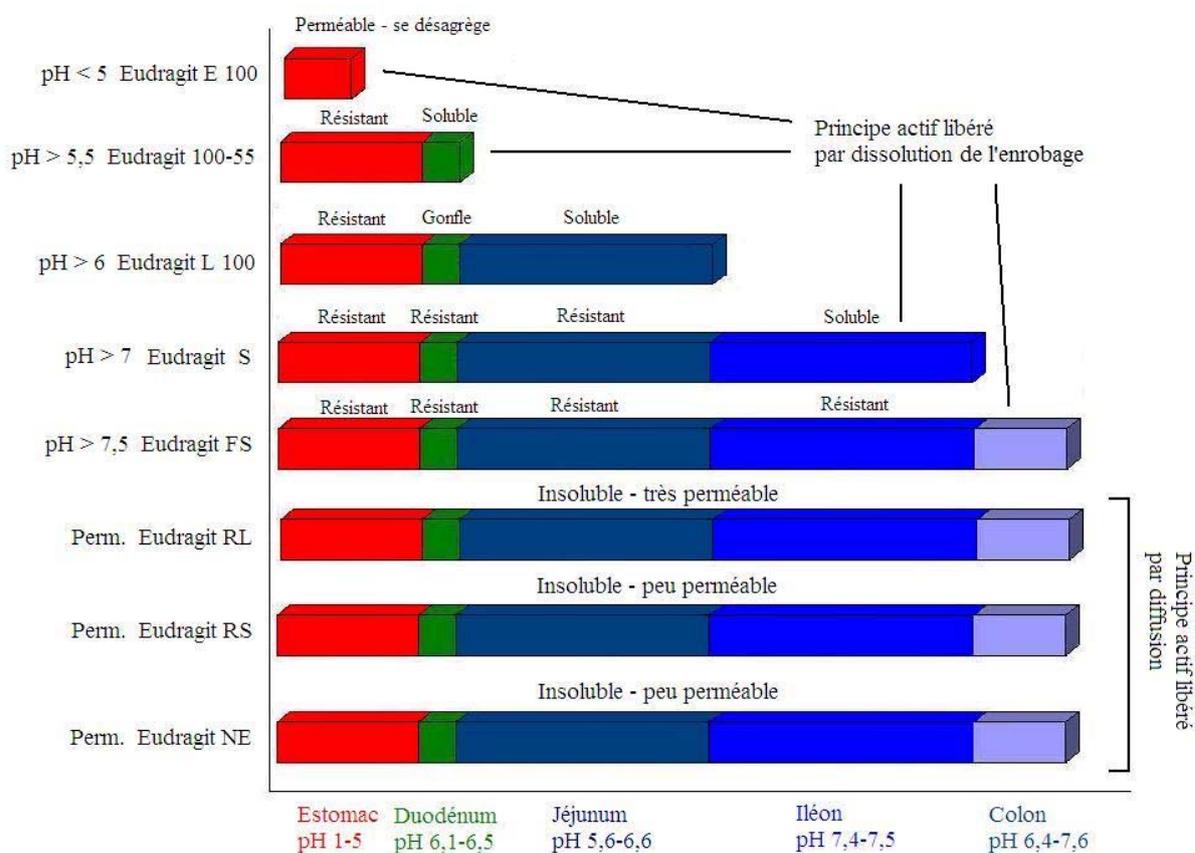


Figure 15 : Solubilité et comportement des polymères acryliques filmogènes en fonction du pH, au niveau du tube GI [Modifié de Lehmann, 1996].

Il semble raisonnable de libérer la quasi totalité de la substance active endéans 12 à 16 heures, ce qui correspond approximativement à la durée moyenne du transit effectué par une forme pharmaceutique de la bouche au colon transverse.

I.3.4.4. Les résines anioniques échangeuses de cations

Ces systèmes libèrent le PA par échange ionique. La résine, insoluble dans l'eau, est chargée en groupements anioniques - *ex.* COO^- , SO_3^- - capables de retenir le PA. Lorsqu'elle entre en contact avec une solution ionique de nature et de concentration adéquate, le PA est échangé et libéré (Eq. 3) [Hui et col., 1987].



Z^+ = cations échangeables (H^+ , Na^+ , K^+)

La vitesse de diffusion dépendra de la surface, de la longueur et de la rigidité de la résine [Jantzen et Robinson, 2002]. La libération du PA étant essentiellement dépendante de l'environnement ionique autour de la résine, ce type de système suppose être moins sensible aux variabilités physiologiques du tractus GI - *ex.* : *enzymes, agitation*. Toutefois, la charge ionique du milieu extérieur peut varier en fonction du régime alimentaire, du type de boissons ingérées ou de diverses pathologies [Hui et col., 1987]. Ainsi, les résines échangeuses d'ions ne peuvent pas être considérées comme un système de premier choix pour fournir une libération prolongée d'un PA.

I.3.4.5. Les pompes osmotiques

Les pompes osmotiques sont des formes monolithiques rigides composées de deux parties entourées par une membrane semi-perméable. La première partie contient le PA tandis que la deuxième renferme le mélange capable de générer le flux osmotique [Hui et col., 1987]. Ces deux parties peuvent être soit réunies dans un même compartiment (**Figure 16**) - *Oros*[®] - ou se trouver dans 2 compartiments distincts séparés ou non par une membrane flexible - *Oros push-pull*[®].

Les pompes osmotiques libèrent le PA en continu selon une cinétique d'ordre 0 grâce à un gradient osmotique. L'osmose est définie comme étant la diffusion d'un

fluide, à travers une membrane semi-perméable, vers une solution plus concentrée en électrolytes, jusqu'à ce que l'équilibre osmotique soit atteint de part et d'autre de la membrane [Stevenson et col., 2000].

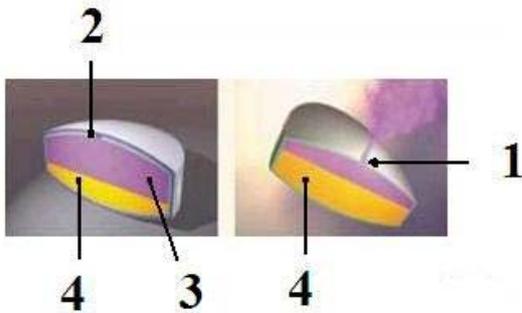


Figure 16 : Pompe osmotique sans membrane de séparation – 1. orifice ; 2. membrane semi-perméable ; 3. couche renfermant PA ; 4. couche refermant un hydrocolloïde contenant le mélange osmotique.

Une membrane semi-perméable est perméable aux fluides mais pas aux électrolytes [Stevenson et col., 2000]. Elle règle la vitesse de pénétration de l'eau dans le système en fonction de son épaisseur, de sa surface et de son coefficient de perméabilité à l'eau. Le mélange osmotique est une solution hautement concentrée en électrolytes, ce qui crée la différence de pression osmotique entre le système et le milieu extérieur. En créant un flux osmotique (Eq. 4), le mélange concentré en électrolytes attire le liquide de dissolution à l'intérieur de la forme, générant une pression capable d'expulser le PA à travers un orifice formé au moyen d'un laser [Qiu et Zhang, 2000].

$$dv/dt = (A/h) P_h (\Delta\pi - \Delta p) \quad (\text{Eq. 4})$$

dv/dt = vitesse de diffusion d'un solvant à travers une membrane semi-perméable (m^3/s)

A = surface de la membrane où s'effectue le transport de fluide (m^2)

h = épaisseur de la membrane (m)

P_h = perméabilité hydraulique de la membrane ($\text{m}^2/\text{s.Pa}$)

$\Delta\pi$ = gradient osmotique (Pa)

Δp = gradient hydrostatique (Pa)

Les membranes semi-perméables sont composées d'un mélange d'esters de cellulose et de polyuréthane. Leur perméabilité varie linéairement avec la teneur en groupements « acétyl » des esters cellulosiques. En général, une membrane semi-

perméable utilisée pour la fabrication des pompes osmotiques est capable de réguler un flux compris entre 10^{-7} à 10^{-6} g/cm.s. Pour la plupart des formes pharmaceutiques, l'agent osmotique de choix est le chlorure de sodium (NaCl). Il doit être présent en quantité suffisante pour préserver la saturation de la solution osmotique jusqu'à libération complète du PA. Le diamètre de l'orifice par lequel diffuse le PA doit être suffisamment petit pour minimiser les variations liées au flux, mais assez large pour prévenir une surpression [Stevenson et col., 2000].

I.4. Formes monolithiques vs. formes divisées

Les formes orales peuvent être développées sous forme unitaire – *ex. comprimés, gélules* – ou divisée – *ex. pellets, mini-comprimés*.

En raison de leur taille importante, il a été rapidement admis que des formes monolithiques non désintégrables pouvaient constituer une approche avantageuse pour la rétention gastrique des formes orales.

I.4.1. Les formes monolithiques

Les formes monolithiques de grande taille possèdent un diamètre minimal de 7 mm. En raison de la contraction pylorique, leur vidange gastrique ne s'effectue théoriquement que pendant la phase III du CMMI. Toutefois, Kaus et col. puis Khosla et Davis, ont démontré que des formes possédant un diamètre compris entre 7 et 15 mm ne fournissaient aucune garantie de rétention gastrique tant les variations interindividuelles étaient importantes (entre 15 et 200 min) [Kaus et col., 1984 ; Khosla et Davis, 1990]. De plus, Davis et al. ont également constaté que, même en phase digestive, des comprimés de 12 mm étaient sujets à une vidange gastrique précoce (< 4 heures) [Davis et col., 1988]. Seules les formes de diamètre supérieur à 25 mm restent dans l'estomac pendant l'entièreté de la phase digestive. Elles ne s'évacuent de l'estomac que sous l'action des contractions engendrées par le CMMI [Coupe et col., 1991].

I.4.2. Les formes divisées

Contrairement aux formes monolithiques, les formes divisées sont constituées d'un ensemble de particules qui jouent chacune le rôle de réservoir à partir duquel la substance active est relarguée [Porter et Ghebre-Sellassie, 1994]. Comparées aux formes unitaires, elles offrent plusieurs avantages non négligeables :

- Leur surface de contact plus importante permet un meilleur contrôle de la libération, y compris pour les substances présentant une solubilité limitée [Amighi, 2007b] ;
- Elles sont moins irritantes et réduisent le risque de « dose dumping » car elles parcourent l'entièreté du tractus GI de manière dispersée [Kenyon et col., 1995] ;
- Ne subissant pas le phénomène de « tout ou rien », elles permettent une diminution des variabilités inter- et intra-individuelles des temps de résidence gastrique et de transit gastro-intestinaux [Davis et col., 1984 ; Follonier et Doelker, 1992] ;
- En raison de la vidange aléatoire, leur temps de résidence gastrique est moins influencé par l'état nutritionnel du patient [Bechgaard et col., 1985 ; Davis, 1986].

La vidange gastrique des formes divisées se déroulant de manière aléatoire, elle est généralement caractérisée par le temps de demi vidange - $T_{50\%}$. Il s'agit du temps nécessaire pour évacuer la moitié des particules présentes dans l'estomac juste après administration [Hwang et col., 1998].

I.5. Formes à rétention gastrique

L'augmentation du temps de résidence gastrique d'une forme à libération prolongée est parfois nécessaire pour augmenter l'efficacité thérapeutique. En effet, la résorption de certains PA est notamment limitée par leur solubilité et/ou leur fenêtre d'absorption. Pour ce type de PA, plus longtemps la forme pharmaceutique reste en amont des sites d'absorption les plus performants, plus la quantité de PA résorbée est

élevée. Ainsi, le développement de formes à rétention gastrique est particulièrement utile pour :

- Des PA présentant une fenêtre étroite d'absorption au niveau de l'intestin supérieur – *ex. levodopa* [Seth et Toussounian, 1984 ; Hoffman et col., 2004], *ciprofloxacine* [Rouge et col., 1996 ; Chavanpatil et col., 2005], *riboflavine* [Ingani et col., 1987b ; Moës, 1993] ;
- Des PA se dégradant dans l'intestin – *ex. metoprolol, captopril* [Warrington et col., 1985]. A l'inverse, les PA instables en milieu acide ne peuvent être incorporés dans une forme à rétention gastrique ;
- Des PA caractérisés par une solubilité accrue en milieu acide – *ex. des bases faibles comme le diazepam et la cinnarizine* [Moës, 1993 ; Rouge et col., 1996] ;
- Des PA possédant une activité locale au niveau de l'estomac – *ex. antiacides* [Deshpande et col., 1996], *le misoprostol (analogue des prostaglandines E1 cytoprotecteur de la muqueuse gastrique* [Oth et col., 1992], *l'amoxicilline et la clarithromycine (antibiotiques destinés à l'éradication de l'Helicobacter pylori)* [Burton et col., 1995 ; Patel et col., 1996] ;
Par contre, les substances irritantes pour la muqueuse gastrique seront plus favorablement incorporées dans des formes à libération retardée – *ex. les AINS* ;
- Des PA absorbés dans l'estomac – *ex. albuterol* [Agyilirah et col., 1991 ; Hwang et col., 1998] ;
- Des PA rapidement absorbés lorsqu'ils sont libérés à partir de formes conventionnelles. Une rétention gastrique accrue permet d'augmenter, mais aussi de mieux contrôler, le temps de transit total d'un médicament. La libération du PA sera donc plus lente et plus régulière tout le long du tractus GI – *ex. β -Lactam* [Deshpande et col., 1996].

De nombreux facteurs influencent la rétention de ce type de systèmes – *ex. la motilité gastrique, le pH et la présence de nourriture*. Même si il n'est pas aisé de résoudre ces différents problèmes, plusieurs approches ont déjà été envisagées.

I.5.1. Utilisation d'agents chimiques ralentissant la motilité gastrique

Une des premières solutions envisagées a été d'utiliser des substances chimiques capables de freiner la vidange gastrique – *ex. les anticholinergiques*. Incorporés en tant qu'excipients, les acides gras saturés à longues chaînes - C_{10} - C_{14} ou les substances narcotiques – *ex. opiacées* – peuvent également ralentir la motilité stomacale. Leur utilisation a été rapidement abandonnée car ces substances modifient la physiologie naturelle du transit GI. Les risques d'obstruction stomacale et/ou d'occlusion intestinale sont donc accrus [Moës, 1993 ; Singh et Kim, 2000].

Le développement galénique a permis de concevoir des formes dont la rétention gastrique se base majoritairement sur des phénomènes physiques – *ex. densité et taille* (Figure 17) [Hwang et col., 1998]. Elles n'agissent pas chimiquement sur la motilité stomacale et n'influencent donc pas le transit naturel des substances ingérées.

I.5.2. Les systèmes magnétiques

Un petit aimant à base de ferrite de magnésium ($MgO-Fe_2O_3$) est placé au centre d'un comprimé matriciel hydrophile. Le diamètre final de la forme atteint 10 mm pour une épaisseur de 5.5 mm. Après administration, un aimant extra corporel doit être fixé devant l'estomac, exactement à l'endroit où se trouve la forme magnétique. La difficulté de positionner l'aimant extra corporel, ajouté à l'impossibilité de le maintenir en place pendant toute la durée de libération du PA, rend le traitement très déplaisant pour le patient [Hwang et col., 1998].

I.5.3. Les formes à haute densité

Les formes à densité élevée restent positionnées dans la partie inférieure de l'antra. Seules des microbilles ont été développées car aucun accroissement de la rétention gastrique n'a pu être confirmé après administration de formes monolithiques.

La densité de ces systèmes (min. 1.4) doit être supérieure à celle du contenu stomacal (± 1.005). Elle est obtenue en dispersant le PA dans une matrice contenant une teneur élevée en matériel inerte de haute densité comme le sulfate de baryum, l'oxyde de zinc, le dioxyde de titane ou de la poudre de fer [Singh et Kim, 2000].

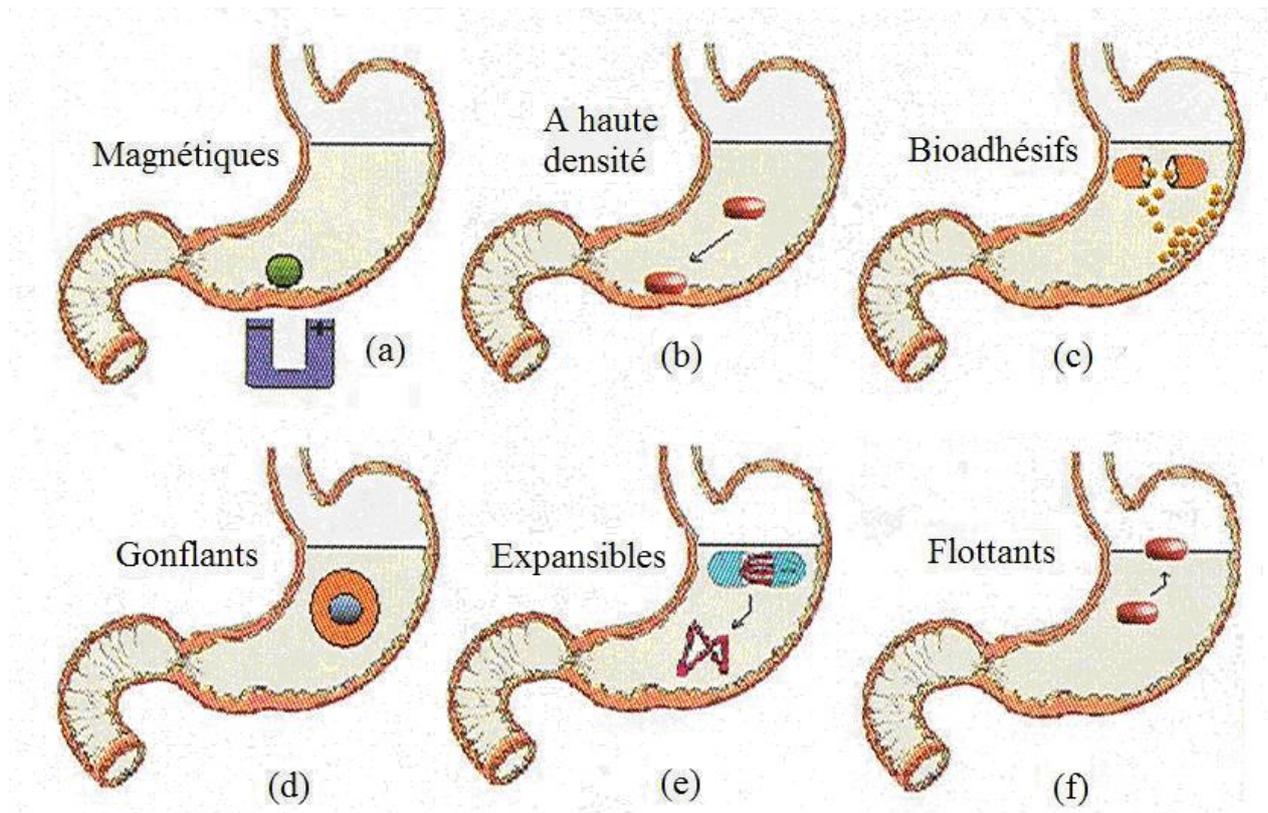


Figure 17 : Les différents systèmes présentant une rétention gastrique – (a) magnétiques, (b) à haute densité, (c) bioadhésifs, (d) gonflants, (e) expansibles et (f) flottants [Modifié de Roca et Shah., 2004]

I.5.4. Les formes bioadhésives

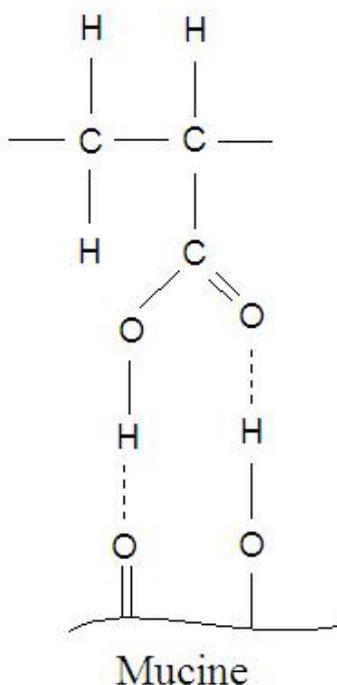
L'adhésion d'un polymère implique trois zones d'intérêt différentes [Peppas et col., 2000] :

- La surface du matériel bioadhésif ;
- La première couche superficielle du tissu ;
- La région interfaciale de contact.

Lorsqu'une forme bioadhésive entre en contact avec un tissu biologique, trois types d'interactions peuvent survenir [Peppas et col., 2000] :

- Des liaisons physiques : le polymère est déposé ou inclus dans une circonvolution tissulaire ;
- Des liaisons chimiques primaires – *ex. covalentes, ioniques* ;
- Des liaisons chimiques secondaires – *ex. ponts hydrogènes, forces de van der Waals*.

Les formes adhésives adhèrent aux cellules épithéliales sécrétant le mucus stomacal à hauteur de l'antre. La diffusion partielle du matériel adhésif à travers le gel muqueux étant une étape primordiale de l'adhésion, une bonne solubilisation de ce matériel est essentielle pour lier efficacement la forme au tissu. Il est possible d'obtenir une solubilité suffisante en développant des formes possédant une structure chimique similaire au mucus [Peppas et col., 2000]. L'adhésion est ainsi rendue possible par l'utilisation de glycoprotéines greffées dont les chaînes oligosaccharidiques contiennent des groupements sulfatés ou des résidus d'acide acrylique. Les liaisons responsables de la mucoadhésion sont donc majoritairement des ponts hydrogènes (**Figure 18**) ou des interactions électrostatiques [Singh et Kim, 2000]. Ainsi, les hydrogels anioniques – *ex. Carbopol® 934* - présentent une meilleure capacité d'adhésion que les neutres ou les cationiques.



La capacité de liaison étant totalement dépendante de la nature de l'excipient, ces formulations conviennent à tout type de PA. Toutefois, le turnover du mucus stomacal limite fortement la rétention gastrique de ces systèmes [Peppas et Buri, 1985 ; Moës, 1993 ; Deshpande et col., 1996]. De plus, Khosla et Davis, puis Harris et col., ont démontré par scintigraphie qu'aucune rétention gastrique ne se produisait après administration d'une forme bioadhésive à base de Carbopol® [Khosla et Davis, 1987 ; Harris et col., 1990].

Figure 18 : Interaction entre une fonction d'acide acrylique et une molécule de mucine [de Hwang et col., 1998]

Ce dérivé ne se lie aux molécules que sous sa forme protonée grâce aux liens hydrogènes. Le pH stomacal doit donc être inférieur au pKa du polymère (± 4) [Hwang et col., 1998].

De plus, l'administration de ces formes doit être rigoureusement contrôlée. En effet, l'adhésion n'est optimale qu'en phase I et IV du CMMI. Si elles sont ingérées en phase III, elles passeront le pylore avant formation des liens. Une administration post prandiale est également à déconseiller puisque des phénomènes d'adsorption à la surface des aliments ne sont pas à exclure [Helliwell, 1993].

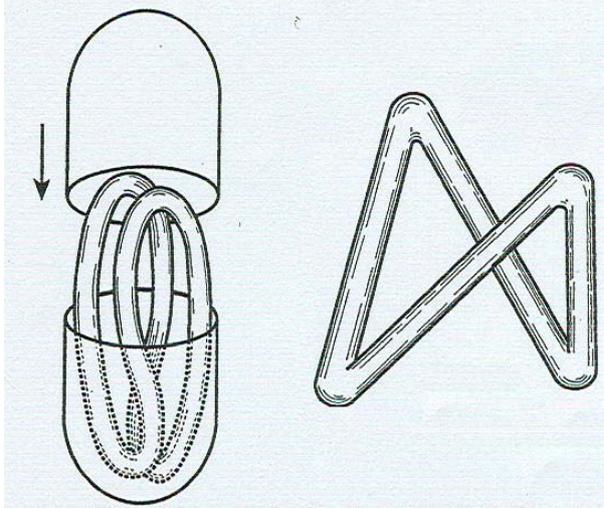
I.5.5. Les systèmes gonflants et expansibles

Les formes présentant une taille supérieure à l'ouverture du pylore (13 ± 7 mm) peuvent être retenues dans l'estomac pendant une période de temps prolongée [Sugito et col., 1990]. La largeur définitive du système (2 à 50 fois la taille initiale) est atteinte rapidement après ingestion de la forme [Deshpande et col., 1996].

Une première technologie se base sur la capacité de certains matériaux à gonfler au contact du fluide gastrique. Le gonflement peut être obtenu de différentes façons :

- Par hydratation des chaînes de polymère – *ex. hydrogels, hydrogels superporeux (1000 fois leur taille initiale) ;*
- En enrobant des agents osmotiques par une membrane semi-perméable expansible – *ex. sucres, résines, sels ;*
- En utilisant des gaz solidifiés ou liquéfiés à température ambiante, mais possédant un point d'évaporation inférieur à 37°C.

La rétention gastrique de ces formes n'a jamais pu être démontrée. En effet, le gonflement aléatoire ne permet pas d'obtenir un effet reproductible [Hwang et col., 1998].



Un second procédé consiste à placer dans une gélule, un dispositif capable de se déplier après dissolution de la capsule (**Figure 19**). Ces systèmes contiennent également, au moins un dérivé érodable - *ex. Klucel[®] ou Eudragit[®] E* - et peuvent se présenter sous la forme d'une tige, d'un cercle ou d'une figure plane [Klausner et col., 2003a].

Figure 19 : Schéma d'une forme extensible [de Hwang et col., 1998]

Ils doivent présenter une rigidité suffisante pour résister aux forces destructrices de l'estomac. Toutefois, les dérivés érodables leur permettent de passer le pylore après un laps de temps déterminé afin d'éviter l'obstruction gastrique [Klausner et col., 2003a].

Leur utilisation chez l'homme est également limitée par l'utilisation de gélule 000 difficile à avaler [Klausner et col., 2003b].

Au niveau industriel, leur développement est basé uniquement sur le principe d'essai-erreur. Chaque optimisation demande donc la mise en place d'études cliniques lourdes et coûteuses. De plus, les dérivés érodables peuvent déjà subir une dégradation progressive lors du stockage. Les formes deviennent alors inefficaces en quelques semaines [Hwang et col., 1998].

I.5.6. Les formes flottantes

Le concept de formes flottantes a été décrit dans la littérature dès 1968, quand Davis proposa une méthode capable de réduire les problèmes de déglutition rencontrés chez de nombreux patients [Davis, 1968]. Une forme flottante possède une densité inférieure au fluide stomacal et flotte ainsi à sa surface pendant une période de temps prolongée, ce qui permet de diminuer le nombre de prises quotidiennes.

En comparant des formes flottantes à des non flottantes, Davis et col. ont montré que la rétention gastrique d'une forme flottante était statistiquement accrue après repas [Davis et col., 1986]. La présence de nourriture dans l'estomac est donc une condition favorisant la résidence stomacale d'une forme flottante [Müller-Lissner et Blum, 1981 ; Mazer et col., 1988]. Grâce à une étude scintigraphique, Moës a même été jusqu'à affirmer que la présence de nourriture dans l'estomac favorisait d'avantage la flottaison des formes que la technologie mise en œuvre pour lui faire acquérir ses propriétés de flottaison [Moës, 1989].

I.5.6.1. Les formes flottantes sans génération de dioxyde de carbone

Historiquement, les recherches se sont d'abord focalisées sur des formes sans génération de dioxyde de carbone [Moës, 1993].

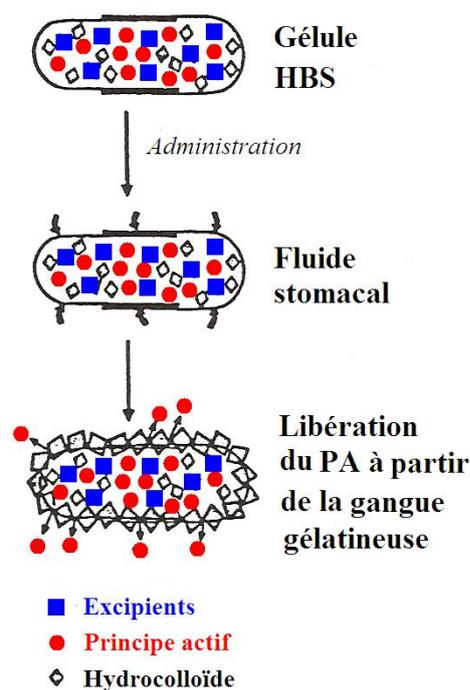


Figure 20 : Système HBS
 [Moës, 1993]

Seth et Tossounian ont développé un système monolithique matriciel de type HBS (Hydrodynamically Balanced System) (Figure 20). Il était composé d'un mélange de principe actif, d'excipients composant la matrice - *ex. polycarbonates, polyacrylate, polyméthacrylate, polystyrène, huiles végétales hydrogénées* - et d'excipients gélifiants - *ex. HPMC, polysaccharides* - insérés dans une gélule. Au contact du fluide gastrique, cette dernière se dissout et le polymère se gélifie pour former une gangue gélatineuse poreuse assurant la flottaison de la forme tout en maintenant son intégrité [Seth et Tossounian, 1978, 1979].

Si ces formes permettent une libération prolongée du PA jusqu'à érosion complète de la matrice hydrophile, leur capacité de flottaison diminue au cours du

temps. Le volume de la gangue est accru par la gélification et le gonflement du polymère tandis que le gain de masse est engendré par le flux aqueux pénétrant à l'intérieur de la forme. Lorsque la masse augmente en plus grande proportion que le volume, la densité augmente progressivement [Moës, 1993]. Afin de résoudre en partie ce problème, il est également possible d'incorporer un excipient gras mélangé à l'hydrocolloïde [Ushimaru et col., 1987]. Leur densité naturellement inférieure à 1 facilite la flottaison. Si cette dernière s'en trouve améliorée dans les premiers moments suivants l'ingestion, ces substances lipidiques n'empêchent aucunement la mise en place de l'équilibre hydrodynamique [Bolton et Desai, 1989]. De plus, les systèmes HBS donnent lieu à une mauvaise reproductibilité de l'effet thérapeutique. Lorsque la masse gélifiée se fragmente dans l'estomac, les portions résultantes ne sont jamais identiques. La surface de contact, et donc la dissolution du PA, varie d'une administration à l'autre [Goole et col., 2006].

Une autre forme monolithique, de type comprimé, a été décrite plus tard dans la littérature. Ces comprimés contiennent du polypropylène de très faible densité (~ 0.69) et un agent gélifiant - *ex.* HPMC, Carbopol®, alginate sodique. Aucun délai de flottaison n'a été observé. Dans de l'HCl 0.1 N, ces comprimés flottent pendant plus de 8 heures tout en prolongeant la libération du PA. Toutefois, de faibles variations dans la quantité incorporée de polypropylène influencent fortement la flottaison et la libération du PA. Ainsi, seulement maximum 30% (m/m) de PA peuvent être introduits dans la matrice [Streubel A. et col., 2003].

Oth et col. ont développé des comprimés monolithiques bicouches - une couche flottante (a) et une couche assurant la libération prolongée (b) - à base de misoprostol (Figure 21). La flottaison, comme la libération, était assurée par un mélange de Méthocel® K4M et K100. Grâce à des études scintigraphiques, il a été démontré, qu'après repas, ce type de système pouvait demeurer dans l'estomac au moins 8 heures.

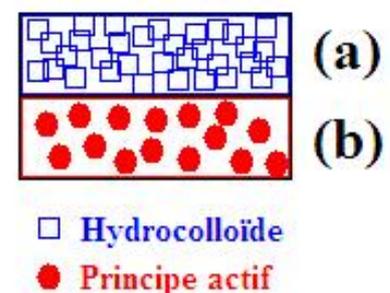


Figure 21 : Comprimés bicouches

Toutefois, s'agissant d'une forme monolithique, il n'a pas été formellement établi que cette rétention était bien due à la flottaison. En effet, la taille du comprimé joue également un rôle important dans la rétention gastrique de ce système [Oth et col., 1992 ; Franz et Oth, 1993].

Mitra a également décrit un système flottant multicouche flexible à libération prolongée. Cette forme contient au moins un PA dispersé dans une matrice inerte insoluble dans l'eau. Ce noyau est alors enrobé par un film contenant un agent filmogène insoluble et au moins un polymère hydrophile perméable à l'eau et au PA. Le noyau et l'enrobage sont unis en laissant à leur intersection des poches d'air capables de faire flotter le système [Mitra, 1984].

Hou et col. ont étudié des granules de chitosan contenant de l'indométhacine. Le PA est dissous dans du méthanol avant d'y ajouter le chitosan. Après évaporation du solvant à 60°C, le résidu est redissous dans de l'acide acétique. Le mélange gélatineux obtenu est alors laissé à température ambiante pendant 1 heure avant d'être extrudé. Les granules ainsi obtenus sont encore séchés pendant 8 heures à 50°C. Les essais de dissolution ont démontré que le PA a pu être retenu pendant plus de 8 heures. Toutefois, la gélification du chitosan étant très lente, l'entièreté des granules n'a flotté qu'1 heure après immersion [Hou et col., 1985].

En se basant sur le pouvoir de gélification ionotropique du chitosan lorsqu'il est mis en présence d'un composé multivalent - *ex.* DOS, TPP - il devient possible d'améliorer les propriétés de flottaison de ce type de granule [Torrado et col., 2004]. Le chitosan peut être lié par réticulation au DOS par extrusion capillaire. S'il s'avère être un procédé simple et efficace, la production s'étend sur une période de plus de 48 heures. Il est possible d'y incorporer entre 30 et 60 % (m/m) de PA. Toutefois, si le temps total de flottaison dépasse 18 heures, quel que soit le milieu de dissolution, la libération du PA ne s'étend pas au-delà de 5 heures [El-Gibaly, 2002].

Des microsphères creuses flottantes (diamètre moyen $\sim 450\mu\text{m}$), formées par une membrane en alcool de polyvinyle, de dérivés acryliques ou acétate de cellulose sont également abondamment décrites dans la littérature. L'agent filmogène et le PA sont émulsionnés en présence de divers solvants organiques – *ex. heptane, chloroforme, dichlorométhane* – qui seront ensuite évaporés pour former des microsphères [Kawashiwa et col., 1991 ; Thanoo et col., 1993 ; Soppimath et col., 2001].

L'efficacité d'encapsulation du PA dépendra de la quantité initialement présente dans l'émulsion. Les seules données actuellement disponibles semblent montrer que seule une très petite quantité de PA peut être incorporée dans ces systèmes [Murata et col., 2000]. De plus, la teneur en PA conditionnera la taille des microsphères et la vitesse de libération. Cette dernière évoluera proportionnellement à la quantité de PA incorporée et inversement à la taille des microsphères [Deshpande et col., 1996].

Si la durée totale de flottaison atteignait 12 heures, la libération ne se prolongeait que pendant 8 heures [Kawashiwa et col., 1991 ; Thanoo et col., 1993]. Une mesure indirecte du temps de rétention gastrique a également montré une augmentation de la quantité de riboflavine excrétée dans l'urine après administration de microsphères flottantes. Des études scintigraphiques ont permis de visualiser les formes dans l'estomac et ainsi, d'évaluer leur temps de rétention gastrique à 5 heures [Sato et col., 2003, 2004a, 2004b]. Le procédé de fabrication impliquant de nombreuses étapes de séchage et d'analyse de résidus organiques, le développement industriel n'a pas encore été atteint.

Whitehead et col. ont développé des microsphères à base d'alginate calcique. L'alginate sodique précipite en présence d'une solution aqueuse de chlorure de calcium. Après incorporation complète, les microsphères sont séparées de la dispersion et prises en masse dans de l'azote liquide pendant 24 heures à -40°C [Whitehead et col., 1996]. Ces microsphères flottantes ont ensuite été investiguées sur des sujets volontaires sains. Leur temps de flottaison a été comparé à des microsphères non flottantes par γ -scintigraphie. Le temps de rétention gastrique des microsphères flottantes a été évalué à 5.5 h chez tous les sujets. Ce qui faisait 4.5 h de plus que le temps de rétention obtenu avec les microsphères non flottantes [Whitehead et col., 1998].

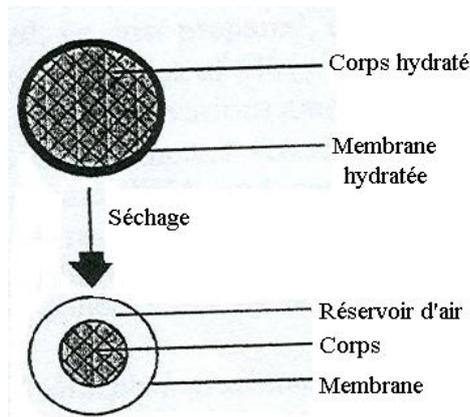


Figure 22 : Microsphères flottantes [Hwang et col., 1998]

Iannucelli et col. ont développé des microsphères flottantes composées d'un corps en alginate calcique séparé d'une membrane flexible en alginate/PVA par un compartiment contenant de l'air (**Figure 22**). Pour ce faire, une solution aqueuse d'alginate sodique est extrudée vers du *n*-heptane dispersé dans une solution aqueuse de chlorure calcique contenant un tensioactif. Ce milieu est alors mélangé à 1000 rpm pendant 5 min à température ambiante.

Les particules formées sont ensuite prélevées et rincées rapidement à l'eau puis au diéthyl éther. L'étape d'enrobage est réalisée par trempage des microsphères dans une solution d'alginate calcique/PVA suivie d'un séchage au diéthyl éther [Iannucelli et col., 1998a]. Des tests radiologiques ont été réalisés pour évaluer la résidence gastrique de ces formes par rapport à un comparateur non flottant. Après repas, toutes les microsphères d'alginate ont montré un temps de rétention gastrique de 5 heures, soit 2 heures de plus que les non flottantes [Iannucelli et col., 1998b]. L'impossibilité apparente d'incorporer de grande quantité de PA, ajouté à la méthode de fabrication impliquant l'utilisation de solvants organiques, rend l'exploitation de ces microsphères à base d'alginate calcique très difficile.

Joseph et col. ont décrit une étude où des microsphères contenant du piroxicam ont été administrées à des lapins albinos à jeun. Les courbes plasmatiques ont montré qu'endéans 8 heures, 80% du PA avait déjà été absorbé. L'absorption des 20% restants s'est étalée sur une période de 16 heures [Joseph et col., 2002]. Cet effet de libération initiale très rapide, ajouté à l'absence de données concernant la rétention gastrique des microsphères, ne permet pas de conclure positivement à cette expérience.

Bulgarelli et col. ont développé un autre type de microsphères flottantes. Une solution aqueuse de caséine et de gélatine est ajoutée goutte à goutte à de l'huile minérale préchauffée à 60°C. Cette émulsion est ensuite mélangée pendant 10 min à 500 rpm avant d'être rapidement refroidie à 5°C. Pour former des microsphères solides, de l'acétone est ajouté à la dispersion. Parallèlement, un mélange de caséine et de gélatine est soumis à de faibles pressions (10 mmHg) afin d'évacuer les bulles d'air. Les 2 dispersions sont ensuite homogénéisées dans un mélange eau-acétone-glyceraldéhyde pendant 6 heures à 400 rpm. Les microsphères ainsi formées sont filtrées, lavées à l'acétone (5°C) et séchées à faible pression (10 mm Hg). Elles ont flotté pendant au moins 1 heure dans une solution pH 1.2 et l'entièreté du PA (fluorescéine) était déjà libéré après 2 heures [Bulgarelli et col., 2000].

Ce système nécessite un long temps de préparation, ne permet pas d'incorporer de grandes quantités de PA et fournit une libération trop rapide de ce dernier.

Des microparticules (100-1250 µm) à base d'Eudragit® S et RL, préparées par émulsion-diffusion de solvants, sont également décrites dans la littérature. La méthode de préparation nécessite un mélange éthanol-dichlorométhane. A pH 1.2 et 6.8, des tests de dissolution effectués sur du kétoprofène ont montré que l'entièreté du PA n'était pas libérée avant 24 heures. Or, après 6 heures de test, seulement 60% des microparticules optimisées flottaient encore dans de l'HCl 0.1 N contenant du polysorbate 20 [El-Kamel et col., 2001]. Il semble donc très difficile d'obtenir un temps de flottaison correspondant au temps nécessaire pour libérer l'entièreté du PA. Comme en présence d'une forme conventionnelle, si la forme quitte l'estomac trop tôt, la quantité de PA résorbée s'en trouvera diminuée. Il peut en résulter une diminution de l'efficacité thérapeutique.

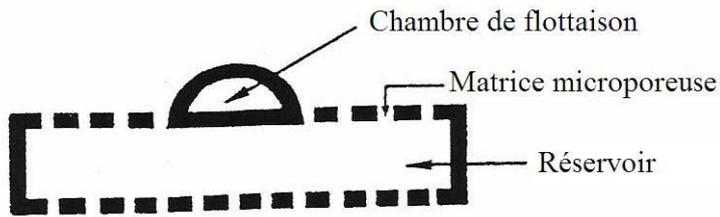


Figure 23 : Forme flottante avec chambre de flottaison indépendante.

Il existe également des formes comprenant une chambre de flottaison indépendante du réservoir (**Figure 23**).

Inerte et microporeux, ce dernier assure la libération prolongée du PA [Harrigan, 1977]. Aucune donnée *in vivo* n'est pour l'instant disponible.

Le système appelé Dome Matrix® comprends 2 modules matriciels - *convexe et concave* - capables de prolonger la libération d'un PA donné. Leur géométrie particulière permet un assemblage par la base, formant ainsi un cylindre creux assurant la flottaison de la forme (**Figure 24**).

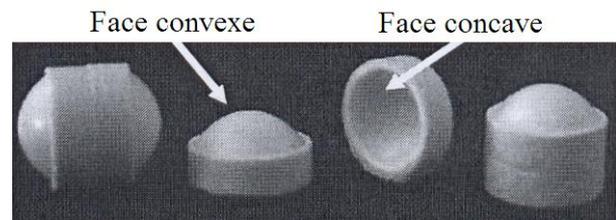


Figure 24 : Le Dome Matrix®

La cinétique de libération du PA peut être modulée en fonction de la courbure des 2 éléments. Ces derniers sont soudés par ultrasons. Aucune étude de flottaison n'a encore été réalisée car ce système n'a pas été développé dans ce but [Losi et col., 2006].

1.5.6.2. Formes flottantes générant du gaz

Afin d'améliorer la flottaison, les recherches se sont également concentrées sur des formes contenant un mélange capable de générer du dioxyde de carbone pendant toute la durée de libération du PA. Généralement, ce mélange est constitué de bicarbonate de soude et d'un acide organique - *ex. acide citrique, acide tartrique*. Le gaz formé est encapsulé dans une matrice gélifiante ou retenu par un enrobage flexible.

Dans le cas de formes matricielles, le CO₂ favorise également la gélification en accélérant l'hydratation des chaînes de polymère [Singh et Kim, 2000].

Umezawa a développé des mini-capsules flottantes de diamètre compris entre 0.1 et 2.0 mm. Le noyau contenant du bicarbonate, du lactose et un agent liant a été enrobé par une solution méthanolique d'HPMC - *libération prolongée et encapsulation du gaz généré*. Ce noyau a été ensuite enrobé avec de la pepstatine [Umezawa, 1978].

Une étude clinique réalisée sur des volontaires sains a démontré qu'une quantité plus importante de riboflavine était excrétée dans l'urine après administration de comprimés bicouches flottants par rapport à des non flottants. La couche flottante contenait de l'HPMC de grande viscosité et un mélange effervescent à base d'acide citrique et de bicarbonate. La libération du PA était régulée par une matrice hydrophile de plus faible viscosité. Les comprimés mesuraient 7 mm de diamètre et pesaient 150 mg. Le délai de flottaison était compris entre 1 seconde et 7 minutes. Si le temps total de flottaison était supérieur à 7 heures *in vitro*, aucune mesure directe (scintigraphique) du temps de résidence gastrique n'a été effectuée [Ingani et col., 1987b].

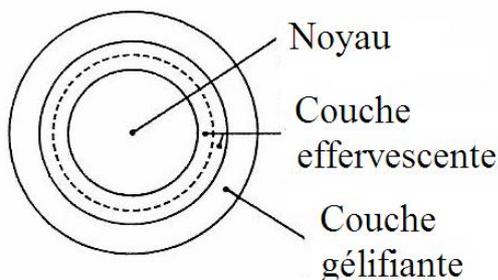


Figure 25 : Système multi-couches flottant [Sing et col., 2000]

Un système multi-couches composé d'un noyau est enrobé successivement par une couche contenant le mélange effervescent - *bicarbonate sodique et acide tartrique (2:1)* - et une couche renfermant le polymère gélifiant - *ex. HPMC+ acétate de polyvinyl* (**Figure 25**). Les teneurs en enrobage ont été fixées à 12.5 et 13.0% (m/m) respectivement.

Au contact du fluide stomacal, l'eau traverse la couche gélifiante pour atteindre l'effervescente. Le dioxyde de carbone formé sera retenu par le polymère et provoquera une diminution de densité suffisante pour assurer la flottaison de la forme.

In vitro, il a été démontré que ce système flottait entièrement en 10 min. Pratiquement 80% des unités flottaient encore après 5 heures, quel que soit le pH de la

solution [Ichikawa et col., 1991]. Le double enrobage, précédé d'une étape de granulation humide, semble alourdir la procédure de fabrication. De plus, l'utilisation de solvants pour disperser les différents agents d'enrobage nécessite des étapes de séchage et d'analyse de résidus longues et coûteuses.

Sungthongjeen et col. ont développé des formes multi-unitaires similaires à Ichikawa à la différence que le dioxyde de carbone formé était retenu par une membrane flexible plutôt que par un dérivé hydrocolloïdique. En effet, des microbilles produites par extrusion-sphéronisation ont été enrobées par des dispersions polymériques d'Eudragit® RS, RL et NE. L'entièreté du système flottait en 3 min et pendant plus de 24 heures. La vitesse de libération du PA a pu être modulée en fonction des proportions des différents dérivés acryliques incorporés dans l'enrobage. La formation des microbilles étant obtenue par voie humide, le procédé de fabrication a nécessité au moins 4 étapes : un mélange, une extrusion-sphéronisation, un séchage et un enrobage [Sungthongjeen et col., 2006].

Hamdani et col. ont développé et évalué des microbilles flottantes fabriquées par pelletisation thermoplastique. Un mélange de poudres contenant un agent liant lipidique est soumis à d'importantes forces de cisaillement au sein d'un granulateur haute vitesse. L'agitation engendrée par le bras du mélangeur, ajouté à la chaleur provenant d'une double paroi chauffée, permet d'élever progressivement la température du mélange. Lorsque cette dernière atteint la plage de fusion de l'agent liant lipidique, son ramollissement provoque le début de la granulation. En fonction du temps de prise en masse, la taille des granulés augmente pour aboutir à la formation de microbilles. Un mélange effervescent peut être incorporé. Le dégagement rapide du dioxyde de carbone permet de créer des pores au sein de la matrice, améliorant ainsi les propriétés de flottaison. Les résultats ont montré une poussée initiale importante suivie d'une brusque diminution de la force de flottaison. Après 24 heures, 70% des microbilles flottaient lorsqu'elles étaient placées dans de l'HCl 0.1N. Toutefois, des tests de poids résultant [Timmermans et Moës, 1990a] ont montré que leurs forces de flottaison étaient alors proche de 0 mg/100mg [Hamdani et col., 2006]. De plus, les

proportions importantes d'agents lipidiques incorporées (min. 35% m/m) réduisent la teneur maximale de PA pouvant y être introduit et augmentent considérablement le risque de dégradation par oxydation de la matière grasse.

Une granulation humide, suivie d'une étape de compression, peut également être employée pour la fabrication de formes flottantes. Baumgartner et col., puis Xiaoqiang et col., ont tous deux développé des comprimés matriciels monolithiques flottants. L'utilisation d'éthanol comme agent liant a nécessité 5 heures de séchage à 45°C, ce qui peut poser des problèmes de stabilité pour des PA thermosensibles. De plus, en raison d'une masse relativement importante (± 300 mg), le délai de flottaison s'élevait à 12 min. Toutefois, la durée totale de flottaison était supérieure à 8 heures et l'entièreté du PA était libéré endéans ce laps de temps. Des études cliniques chez le chien ont montré une résidence gastrique supérieure de 4 ± 1 heures par rapport à une forme non flottante [Baumgartner et col., 2000 ; Xiaoqiang et col., 2006].

Talwar et col. ont également développé des comprimés matriciels flottants. Ces derniers comprenaient de la ciprofloxacine, de l'alginate de sodium, de la gomme xanthane, du bicarbonate de sodium et de polyvinylpyrrolidone réticulée. Les poudres étaient mélangées et comprimées directement après homogénéisation. Le brevet ne mentionne aucune donnée relative au délai et au temps total de flottaison. Le temps de résidence gastrique de ces comprimés flottants a été comparé à celui d'un système HBS™ auquel ils ont ajouté du sulfate de baryum. Le brevet ne fait pas mention d'un ajout de sulfate de baryum dans la composition des comprimés. De plus, le temps de rétention gastrique optimal semble avoir été obtenu après une administration simultanée de deux comprimés [Talwar et col., 2001].

Des systèmes beaucoup plus complexes sont aussi décrits dans la littérature. Il s'agit notamment de résines flottantes échangeuses d'ions contrôlant la libération du PA de manière prolongée. Les résines sont initialement chargées en bicarbonates et enrobées par une membrane semi-perméable. Au contact du fluide gastrique, les anions chlorures s'échangent avec les bicarbonates. Ces derniers, grâce au pH stomacal acide,

gènèrent du dioxyde de carbone. Atyabi et col. ont montré que le pourcentage de théophylline capable d'être contenu dans ce type de système était dépendant de la quantité de bicarbonate déjà fixé sur la résine. En fonction de la teneur en enrobage, le PA pouvait être retenu plus de 24 heures [Atyabi et col., 1994, 1996].

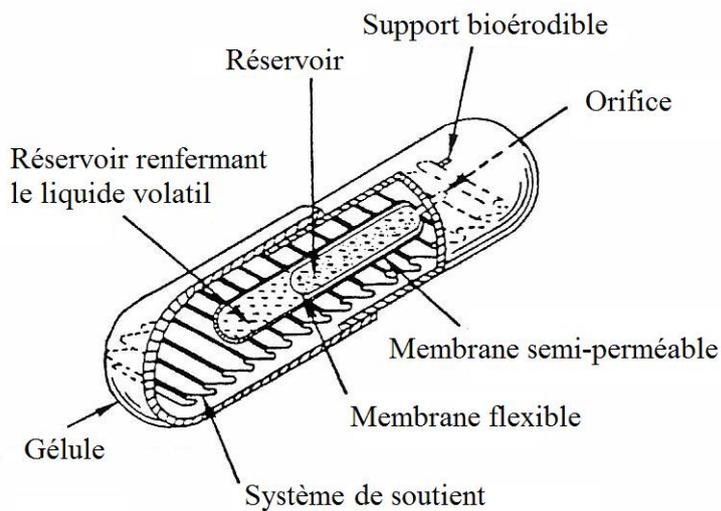


Figure 26 : Système flottant contenant un liquide volatil

Un autre système se compose de 2 chambres distinctes contenues dans une gélule. Une renferme le PA, l'autre, un gaz volatil à température corporelle - *ex. cyclopentane*. Une membrane semi-perméable permet l'entrée du liquide à l'intérieur d'un réservoir déformable contenant un mélange osmotique (**Figure 26**).

La pression engendrée par ce réservoir rempli d'eau entraînera la libération progressive du PA [Michaels et col., 1974, 1975].

II. Approche retenue pour notre recherche

Comme nous venons de le voir, une rétention gastrique accrue et reproductible d'une forme pharmaceutique orale est souvent très difficile à obtenir. L'efficacité des formes à haute densité est étroitement liée à la taille de ces dernières. La fabrication de systèmes expansibles ou gonflants est complexe et ne permet pas de garantir une stabilité suffisante. De plus, leur grande taille pouvant causer des problèmes d'occlusion gastrique et intestinale, leur utilisation s'est souvent limitée à l'usage vétérinaire. Les systèmes magnétiques, peu pratiques, sont presque toujours délaissés par le patient en raison de leur faible compliance. Ainsi, les recherches se sont rapidement focalisées sur le développement de formes flottantes, premières à fournir des résultats satisfaisants.

Développés vers la fin des années 70, les systèmes monolithiques présentaient une cible de choix en raison de la simplicité de leur composition et la facilité de fabrication. Malheureusement, soumis au phénomène de « tout ou rien » et à de nombreux problèmes de fragmentation, les études *in vivo* montrèrent une variabilité importante de l'efficacité thérapeutique. S'ils n'ont pas été abandonnés pour autant, les chercheurs ont ensuite ciblé leurs recherches sur des formes divisées. Les microsphères flottantes fabriquées par évaporation de solvant ne présentent aucun délai de flottaison et peuvent rester à la surface du fluide gastrique pendant plus de 24 heures. Toutefois, leur méthode de fabrication ne permet pas d'incorporer une grande quantité de PA, ce qui limite fortement leur utilisation.

Les mini-comprimés matriciels ont permis de résoudre ce problème. Avec l'augmentation de teneur en PA, le poids total de ces formes a également augmenté par rapport aux microsphères flottantes. De ce fait, ils présentent tous un délai de flottaison plus ou moins important. De plus, pour faciliter la compression, un bon écoulement des poudres est obtenu par granulation humide. Les étapes de séchage et d'essais sur les teneurs en résidu allongent le temps de travail et alourdissent les coûts de production.

Des microbilles fabriquées par granulation thermoplastique ont alors été développées. La pelletisation thermoplastique permettait d'obtenir une forme à libération prolongée sans enrobage grâce à des corps gras hautement lipophiles (HLB =

2) jouant le rôle de matrice [Voinovich et col., 2000 ; Hamdani et col., 2003]. Toutefois, si elles ne présentaient aucun délai, leurs faibles forces de flottaison risquaient d'aboutir à un échec en phase finale du développement [Hamdani et col., 2006].

Afin de pallier les différents problèmes précités, des mini-comprimés flottants ont été développés au sein de notre laboratoire. Ces derniers sont composés de granulés fabriqués par granulation thermoplastique. Le principal avantage qu'offre cette dernière par rapport à une granulation humide repose sur le fait que la phase de séchage est supprimée. De ce fait, la consommation d'énergie et donc, le coût financier s'en trouvent diminués. Aucun solvant n'est nécessaire, or ce sont des produits souvent dangereux tant pour l'expérimentateur que pour l'environnement. L'étape consistant à confirmer l'absence de résidus de solvant au niveau du produit fini devient inutile. C'est un procédé rapide - *ex. temps total de fabrication des granulés inférieur à une demi-heure* - et facile ne comprenant qu'une seule étape. Il est possible de granuler un grand nombre de composés dans une large gamme de concentrations. L'incorporation de substances instables en milieu aqueux devient également possible [Schaefer, 1990]. De plus, des études antérieures ont montré la possibilité de la transposer à l'échelle industrielle [Hamdani, 2005].

La reproductibilité du procédé de fabrication des mini-comprimés est facilement vérifiable. Ainsi, contrairement aux microbilles, chaque unité peut être analysée et discriminée selon des normes fixées au préalable. La compression permet donc d'obtenir un diamètre, une masse, une dureté et une surface reproductibles. De plus, les paramètres de fabrications étant fixés, ces caractéristiques physiques restent identiques pour chaque lot de production.

Les mini-comprimés développés se composent d'au minimum un PA, un agent liant gras à faible plage de fusion et d'un mélange effervescent. Contrairement à de nombreuses formes divisées flottantes, les compositions quantitative et qualitative peuvent être facilement modulables. Ainsi, il est possible d'incorporer divers PA - *seuls (ex. riboflavine, ciprofloxacine, levodopa) ou en association (ex. levodopa-carbidopa)* - des excipients lipidiques ou modifier la composition du mélange effervescent. De plus, les

proportions en PA, agent liant et mélange effervescent peuvent varier tout en préservant la libération prolongée et la flottaison des mini-comprimés [Goole et col., 2007, 2008a, 2008b, 2008c]. Il est possible d'incorporer plus de 60% (m/m) en PA, ce qui est largement supérieur aux valeurs obtenues avec des microsphères [Ichikawa et col., 1991] ou des microbilles [Hamdani et col., 2006]. Contrairement aux formes matricielles lipidiques, l'agent liant gras n'est pas introduit pour assurer la libération prolongée du PA. Une petite quantité - 12% (m/m) - suffit à provoquer la granulation. Cette faible proportion évite un surmouillage des poudres lorsque la plage de fusion est atteinte. La granulation devient plus facilement contrôlable et donc, plus reproductible. La génération continue du dioxyde de carbone assure une flottaison stable pendant une période prolongée. Il évite en effet la diminution progressive des forces de flottaison observée avec des formes ne générant pas de dioxyde de carbone. Ces dernières voient leur prise en masse augmentée lorsqu'elles atteignent l'équilibre hydrodynamique. L'augmentation de volume engendré par la gélification du polymère ne parvient alors plus à compenser l'afflux d'eau à l'intérieur de la forme et la densité augmente. Le dioxyde de carbone formé peut être retenu soit par un agent gélifiant, soit par un enrobage élastique. Ces derniers permettront également d'assurer la libération prolongée du PA. De plus, l'utilisation d'un enrobage barrière ou d'un agent gélifiant possédant un important degré de polymérisation permet d'éviter le burst effect généralement rencontré avec des formes divisées [Hamdani et col., 2002].

Notre but est donc de développer et d'aboutir à une forme flottante divisée, capable de flotter endéans 10 min et pendant une période de temps au moins égale à celle correspondant à la libération totale du PA. Connaissant les profils de flottaison d'un système HBS™ [Goole et col., 2007] et ceux des microbilles flottantes [Hamdani et col., 2006], la formulation des mini-comprimés sera optimisée afin d'obtenir des forces de flottaison supérieures et plus stables. Il est également important d'obtenir une forme robuste dont les propriétés de flottaison et de libération du PA seront très peu dépendantes de l'agitation ou du pH. Nos mini-comprimés devront présenter un temps de résidence gastrique accru, au moins égal à celui de la spécialité commerciale Prolopa® HBS 125.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel et méthodes

Le matériel (**Tableaux 4 et 5**) et les méthodes utilisés dans le cadre de ce travail sont détaillés dans les différents articles qui le composent dans la section « materials and methods ». La pureté du matériel était indiquée sur le certificat d'analyse.

I.1. Matériel

Tableau 4 : Les excipients et principes actifs utilisés au cours des différentes études

Produits	Dénomination chimique	Fournisseurs
Riboflavine 5' Phosphate Na (99.56 % - conforme à la Ph. Eur. 5)	7,8-dimethyl-10-(D-ribo-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)iso-alloxazine	Certa (Braine L'Alleud, Belgique)
Fonction : Vitamine B2 utilisée comme modèle de substance hydrophile		
Levodopa (99.65% - conforme à l'USP 26)	3-Hydroxy-L-tyrosine	Newsmart (Nantong, Chine)
Fonction : Agent anti-parkinsonien, précurseur de la dopamine, utilisé comme modèle de PA hydrosoluble		
Carbidopa (99.4 % - conforme à la Ph. Eur. 6)	Acide L- α -(3,4-dihydroxybenzyl)- α -hydrazino-propionic monohydraté	Teva (Petah Tiqva, Israël)
Fonction : Inhibiteur de décarboxylases périphériques utilisé en association avec la levodopa		
Ciprofloxacine HCl (99.9 % - conforme à l'USP 26)	Chlorhydrate d'acide 1-Cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylique	Siris (Potancheru Mandal, Inde)
Fonction : Agent anti-microbien utilisé comme modèle de PA hydrosoluble		
Prolopa [®] HBS 125		Roche (Bâle, Suisse)
Fonction : Spécialité commerciale contenant de la levodopa et un inhibiteur de décarboxylases périphériques.		
Lactose 450 mesh (conforme à l'USP)		DMV International (Veghel, Pays-Bas)
Fonction : Agent diluant hydrophile		
Précirol [®] ATO 5 (Conforme à la Ph. Eur.)	Glycéryl d'acide palmitostéarique	Gattefossé (Saint-Priest, France)
Fonction : Agent liant lipophile		

Compritol [®] 888 (Conforme à la Ph. Eur.) Fonction : Agent diluant lipophile	Glycéryl d'acide béhénique	Gattefossé (Saint-Priest, France)
*Méthocel [®] K15M (Conforme à l'USP) Fonction : Dérivé cellulosique utilisé comme agent gélifiant formant une matrice hydrophile	2-hydroxypropyl methyl éther de cellulose	Colorcon (Kent, Angleterre)
*Méthocel [®] E5 (Conforme à l'USP) Fonction : Dérivé cellulosique utilisé comme agent d'enrobage hydrosoluble	2-hydroxypropyl methyl éther de cellulose	Colorcon (Kent, Angleterre)
Bicarbonate de sodium (Conforme à l'USP) Fonction : Composant du mélange effervescent		Merck (Darmstadt, Allemagne)
Carbonate calcique (Conforme à l'USP) Fonction : Composant du mélange effervescent		Welphar (Bruxelles, Belgique)
Acide tartrique (Conforme à l'USP) Fonction : Composant du mélange effervescent		Federa (Bruxelles, Belgique)
Ac-Di-Sol [®] (Conforme à l'USP) Fonction : Agent désintégrant	Carboxyméthyl cellulose sodique réticulée	FMC (Philadelphie, Etats-Unis)
Eudragit [®] RL 30D Fonction : Agent filmogène insoluble	Dérivé cationique d'ester d'acide acrylique et méthacrylique	Rhöm Pharma (Darmstadt, Allemagne)
Citroflex [®] 2 Fonction : Agent plastifiant hydrosoluble	Triéthyl citrate (TEC)	Reilly (Hautrage, Belgique)
Citroflex [®] A2 Fonction : Agent plastifiant peu hydrosoluble	Acétyltriéthyl citrate (ATEC)	Reilly (Hautrage, Belgique)

Talc (Conforme à la Ph. Eur.) Fonction : Substance de charge pour l'enrobage	Aldrich Chemical	(Gillingham, Angleterre)
Emulsion de silicone Fonction : Agent anti-mousse		Vel. S.A. (Seneffe, Belgique)

* Les Méthocel® K et E sont des hydrocolloïdes de type hydroxypropylméthylcellulose. La viscosité d'une dispersion aqueuse à 2% (m/v) à 20°C est de 5 et 15000 mPa.s pour le Méthocel® E5 et K15M, respectivement.

● Matériel radioactif & résine fixatrice

Tableau 5 : Matériel radioactif et résine fixatrice ayant servis au marquage des mini-comprimés et de la spécialité Prolopa® HBS 125 lors de l'étude pharmacoscintigraphique.

Produits	Caractéristiques	Fournisseurs
Oxinate d'indium ¹¹¹ In Fonction : Agent radioactif servant au marquage des mini-comprimés	$t_{1/2} = 67.4$ h	Mallinckrodt Medical (Petten, Pays-Bas)
Pertechnétate sodique ^{99m} Tc Fonction : Agent radioactif ayant permis la visualisation de l'estomac	$t_{1/2} = 6.0$ h	Générateur Ultratechnekow FM, Hallincknodt Diagnostica (Bruxelles, Belgique)
Amberlite® IR 120 (Plus) Sel sodique Fonction : Résine échangeuse de cations		Sigma-Aldrich® (Munich, Germany)

I.2. Granulation thermoplastique

La granulation peut être définie comme étant un procédé par lequel de fines particules sont liées entre elles pour former des agglomérats. Les liaisons interparticulaires se forment par agitation en présence d'un agent liant [Schaefer, 1990, 1994, 1996 ; Iveson et col., 2001]. La granulation thermoplastique est un procédé de granulation dont le principe repose sur l'utilisation d'agents liants gras ou de PEG dont la plage de fusion est relativement basse. Ils doivent être solides à température ambiante et ramollir lorsqu'ils sont soumis à des forces de cisaillement importantes [Hamdani et col. 2002, 2006]. Après ramollissement, les corps gras (ou les PEG) agissent comme des agents liants liquides. L'élévation de température, permettant le ramollissement des liants, provient des frictions provoquées par l'agitation intense des particules [Evrard et col., 1999]. Certains modèles de mélangeur haute vitesse présentent également une double paroi pouvant être thermostatée pour accélérer le ramollissement du liant.

Le mélangeur-granulateur haute vitesse utilisé est un Mi-Pro® fourni par la société Pro-C-epT (Zelzate, Belgique) (Figure 27). Il s'agit d'un appareil de laboratoire spécialement conçu pour des processus de granulation impliquant de petites quantités de poudre ou de liquide.



Figure 27 : Mélangeur - granulateur haute vitesse

Il est composé :

- D'un bras mélangeur - *l'impeller* - dont la vitesse de rotation maximale atteint 1800 rpm ;
- D'un couteau - *le chopper* - dont la vitesse de rotation maximale s'élève à 4000 rpm ;
- D'une cuve en verre se présentant sous la forme d'une demi-sphère pouvant contenir jusqu'à 300 g de poudre ou un litre et demi de liquide. Elle est équipée d'une double paroi pouvant contenir de l'eau thermostatée ;
- D'une sonde infrarouge ;
- D'un système de contrôle et d'enregistrement continu des données.

Le Mi-Pro[®] est très avantageux lors d'une granulation thermoplastique car l'agitation qu'il est capable de fournir génère suffisamment d'énergie pour atteindre la plage de fusion recherchée dans un laps de temps relativement court.

I.3. Analyse de distribution de taille des granulés

Après sélection des granulés par tamisage ($\Phi = 100-315 \mu\text{m}$), leur distribution de taille a été relevée au moyen d'un appareil à diffraction laser par voie sèche (Mastersizer Scirocco[®] 2000, Malvern Instrument, Worcestershire, Royaume-Uni) en utilisant les paramètres de mesure adéquats et une procédure de mesure standardisée (SOP) : indice de réfraction 1.52, pression 1 bar, vibration 50 %, temps de mesure 30 secondes.

I.4. Compression des mini-comprimés

Une comprimeuse alternative (Korsch[®], Berlin, Allemagne) a été utilisée pour la fabrication des mini-comprimés. Au cours du développement, le remplissage de la matrice et la compression des granulés ont été réalisés manuellement afin d'éviter d'endommager les poinçons. Toutefois, la cadence de production peut atteindre ± 36 comprimés par minute en mode automatique.

Lors des différents travaux de recherche, nous avons utilisé des poinçons biconvexes de diamètre égal à 3, 4 et 5 millimètres (**Tableau 6**). Le dispositif permettant de fabriquer les mini-comprimés de 3 mm était un poinçon multiple contenant 8 chambres de compression.

Tableau 6 : Masse, forces de compression et dureté des MC en fonction de leur diamètre

Diamètre	Masse	Forces de compression	Dureté (n=5)
3mm	20mg	1000-2000N	14 \pm 1 N
4mm	40mg	2000-3000N	22 \pm 3 N
5mm	60 mg	3000-4000N	28 \pm 2 N

Les forces de compression ont pu être mesurées à l'aide d'un quartz piézoélectrique placé en dessous du poinçon inférieur.

L'appareil utilisé pour évaluer la dureté des mini-comprimés fabriqués est un Computest Kraemer_{GmbH} EL Elektronik (Darmstadt, Allemagne).

I.5. Préparation des mini-comprimés enrobés

Les dispersions d'enrobage ont été préparées en ajoutant lentement l'agent plastifiant à la dispersion aqueuse contenant l'agent filmogène et placées sous agitation magnétique. En parallèle, le talc a été dispersé dans l'eau (les substances hydrosolubles ayant été préalablement ajoutées) à l'aide d'un Ultra-Turrax[®] T45 (Staufen, Allemagne) en présence d'un agent anti-mousse. Les deux dispersions ont ensuite été rassemblées. L'ensemble a finalement été maintenu sous agitation magnétique pendant au moins une heure avant le début de l'étape d'enrobage.

Les mini-comprimés ont ensuite été enrobés à l'aide d'un appareil à lit d'air fluidisé, d'une capacité maximale de 800 grammes, contenant un système Würster (Uni-Glatt[®], Binzen, Germany) [Amighi, 1995 ; Amighi et Moës, 1997]. Le processus d'enrobage (**Tableau 7**) s'est poursuivi jusqu'à obtenir la teneur désirée en enrobage. La dispersion aqueuse a été maintenue sous agitation magnétique pendant l'entièreté de l'opération afin de prévenir la sédimentation des particules insolubles.

Tableau 7 : Paramètres d'enrobage

	Pré-chauffage	Enrobage	Séchage
T° d'entrée	40 ± 2 °C	40 ± 2 °C	40 ± 2 °C
T° de sortie	35 ± 2 °C	32 ± 2 °C	35 ± 2 °C
Débit		5 à 6 g/min	
Pression	1 bar	1 bar	1 bar
Durée	10 min	de 1 à 5h en fonction de la teneur en enrobage souhaitée	

Après l'étape d'enrobage, les mini-comprimés ont été placés dans une étuve thermostatée à 60°C (humidité non contrôlée) pendant 8 heures afin de faire mûrir le film [Amighi et Moës, 1996].

I.6. Mise en gélule

Pour être administrés, les mini-comprimés doivent être placés dans une gélule. Le taux de remplissage va dépendre de la taille de la gélule et du type de mini-comprimé - *les mini-comprimés enrobés étant plus épais que les non enrobés (Tableau 8)*. Les mini-comprimés ont été placés manuellement dans la gélule afin d'occuper un espace minimal. Une manipulation industrielle devait donner des taux de remplissage moins importants en raison du caractère aléatoire du remplissage.

Tableau 8 : Taux de remplissage maximal* des gélules

Gélules	Diamètres des MC	MC non enrobés	MC enrobés**
n° 00	3 mm	31	29
Longueur = 24 mm	4 mm	16	14
Diamètre = 8 mm	5 mm	10	8
n° 0 allongée	3 mm	25	23
Longueur = 23 mm	4 mm	14	11
Diamètre = 7 mm	5 mm	8	6
n° 0	3 mm	24	20
Longueur = 20 mm	4 mm	13	10
Diamètre = 7 mm	5 mm	7	6
n° 1 allongée	3 mm	17	15
Longueur = 20 mm	4 mm	8	6
Diamètre = 6 mm	5 mm	6	5
n° 1	3 mm	16	14
Longueur = 19 mm	4 mm	7	6
Diamètre = 6 mm	5 mm	6	5

* Pour des mini-comprimés présentant les caractéristiques reprises dans le **Tableau 6**.

** Avec 20% (m/m) d'enrobage

I.7. Essais de dissolution

Une rampe de dissolution Distek Dissolution system 2100C (North Brunswick, NJ, Etats-Unis), type I et II, a été utilisée pour réaliser les essais de dissolution (n=5). Les dosages ont été effectués à l'aide d'un spectromètre HP 8453 UV/visible à diode array (Agilent, Santa Clara, Etats-Unis) à 280, 445 et 317 nm pour la levodopa, la riboflavine et la ciprofloxacine, respectivement. La largeur des cuvettes de mesure était égale à 1 cm pour le dosage de la levodopa et de la riboflavine, et 0.2 cm pour celui de la ciprofloxacine. Les essais de dissolution ont été réalisés en circuit fermé au moyen d'une pompe péristaltique automatisée fournissant un débit de ± 3.7 ml/min (Helwlett-Packard, Model 89092A, Diegem, Belgique). Au cours des différents essais de dissolution, plusieurs vitesses de rotation des pales ont été sélectionnées - 50, 60, 75 et 100 rpm. Le volume de liquide contenu dans les bains de dissolution et la température du milieu ont été fixés à 900 ml et $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$, respectivement. En fonction de l'essai réalisé (cf. articles), le milieu de dissolution était de l'HCl 0.1 N ou un tampon phosphate/acide acétique (0.05 M) tamponné à pH 1.5, 3.0 ou 6.5. Tous les milieux de dissolution contenaient 0.05 % (m/v) de Polysorbate 20.

Les mini-comprimés flottants ont été dispersés dans les bains de dissolution au temps 0, sans forcer l'immersion. Les essais réalisés sur la levodopa et la riboflavine ont été effectués à l'abri de la lumière afin d'éviter leur altération.

I.8. Evaluation des propriétés de flottaison

● Système d'agitation horizontale

Ces essais ont permis d'évaluer visuellement le délai et le temps total de flottaison des mini-comprimés.

A chaque essai, 3 mini-comprimés flottants ont été placés dans 70 ml d'HCl 0.1 N contenant 0.05 % (m/v) de Polysorbate 20 (pH 1.2, 37°C). L'ensemble a été placé sous agitation horizontale de 100 cycles par minute (GFL 1086, Großburwedel, Allemagne). Trois essais ont été réalisés par formulation (n = 9).

● Le poids résultant

Il y a peu, la densité et le temps de flottaison étaient les principaux paramètres caractérisant une forme flottante. Malheureusement, ces éléments ne reflétaient que l'aspect qualitatif, le système flottait ou ne flottait pas. Timmermans proposa de quantifier la force de flottaison et son évolution au cours du temps grâce à un procédé faisant intervenir le poids résultant de la forme en solution (**Figure 28**) [Timmermans et Moës, 1990b].

L'amplitude et la direction de la force F déterminent le poids résultant (Eq. 5).

$$F = F_{fl} - F_{grav} \quad (Eq. 5)$$

$$F = d_f g V - d_s g V$$

$$F = (d_f - d_s) g V$$

Où F_{fl} = force de flottaison

F_{grav} = force de gravité

d_f = densité du fluide

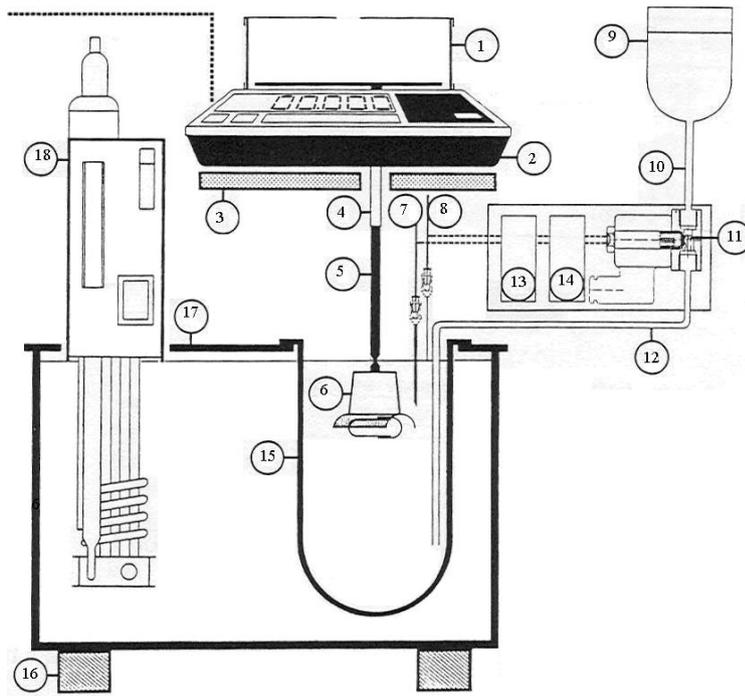
d_s = densité de la forme solide

g = l'accélération de la gravité

Il s'agit en fait de la force (F) nécessaire pour maintenir l'objet immergé [Timmermans et Moës, 1990b]. Par convention, si la forme flotte, la force est positive; si la forme coule, la force est négative.

Cette méthode présente de nombreux avantages :

- Elle offre une grande précision ;
- Les mesures sont continues, stables et reproductibles ;
- Il existe une bonne corrélation entre les résultats théoriques et expérimentaux.



1-6 : Système de mesure
 7-14 : Système de compensation des pertes du liquide d'épreuve
 15-18 : Récipient d'épreuve et bain thermostaté

Figure 28 : Schéma de l'appareil du poids résultant [Timmermans et Moës, 1990a]

Le système doit être thermostaté (37°C) minimum 4 heures avant le début de l'évaluation. Le liquide d'épreuve doit être dégazé - *ex. eau bouillie-refroidie*. Un poids est placé sur le plateau de la balance afin d'augmenter la précision des mesures (diminution des interférences liées au mouvement d'air).

Mode opératoire

1. Relever la masse correspondant au nombre de mini-comprimés désirés (*pour une même formulation, ce nombre est identique à celui utilisé lors des essais de dissolution*) ;
2. Retirer le poids précédemment placé sur le plateau de la balance et remettre cette dernière à zéro ;
4. Fermer le système de compensation ;
5. Enlever le plateau afin de séparer le panier de la tige de soutien ;
6. Disperser les mini-comprimés à l'intérieur du panier ;
7. Remonter le dispositif comme il l'était initialement ;
8. Remettre le dispositif de compensation sous tension, attendre que le niveau de liquide soit revenu à son état initial, replacer le poids sur le plateau et lancer le programme d'enregistrement des valeurs aussi rapidement que possible.

I.9. Analyses par chromatographie liquide haute performance

Les profils de dissolution et la détermination de la teneur en levodopa, carbidopa et benserazide dans la forme finie – *lors des essais précédant l'étude clinique et lors des études de stabilité* – ont été réalisés par chromatographie liquide haute performance (Agilent HPLC 1090, Agilent, Santa Clara, Etats-Unis). La méthode de dosage par HPLC a été adaptée à partir des conditions prescrites par l'USP 25 [USP 25, 2002].

● Paramètres de dissolution utilisés pour tester la forme finie

Les paramètres de dissolution décrits ci-dessous ont été appliqués aux formulations définitives de mini-comprimés – *matriciels et enrobés* – lors des essais précédents l'étude clinique et au cours des études de stabilité.

- *Rampe de dissolution* : Distek Dissolution system 2100C (North Brunswick, NJ, Etats-Unis), Type II
- *Volume de liquide contenu dans chaque bain* : 900 ml
- *Température des bains* : 37.0 ± 0.2 °C
- *Vitesse de rotation des tiges d'agitation* :
 - Pour l'étude clinique : 50 rpm
 - Pour les essais de stabilité : 100 rpm
- *Liquide de dissolution* : tampon phosphate / acide acétique (0.05 M) tamponné à pH 3.0
- *Temps de prélèvement* : t_0 , $t_{1/2h}$, t_{2h} , t_{4h} , t_{6h} , t_{8h} , t_{12h} et t_{24h}
- *Volume de prélèvement* : 10 ml
 - Les 5 premiers millilitres servent à saturer le filtre. Le volume des bains est gardé constant en ajoutant du tampon après prélèvement.
- *Nombre d'essais* : 5

Chaque échantillon a été filtré (0.2 µm) (Acrodisc®, Ann Harbor, Etats-Unis) avant de procéder à l'analyse par HPLC.

● Procédé d'extraction de la levodopa, carbidopa et bensérazide à partir de la forme finie

La méthode d'extraction a été optimisée grâce aux données bibliographiques concernant le dosage de la levodopa à partir de formes sèches type matricielle [Hasan et col., 1994 ; Dolezalova et Tkaczykova, 1999 ; Siddhuraju et Becker, 2001]. Cette méthode d'extraction reste valable pour les deux types de mini-comprimés – *matriciels et enrobés*. Il est nécessaire d'obtenir 3 essais concordants avant de calculer la moyenne et l'écart-type.

1. Broyer les mini-comprimés au mortier ;
2. Effectuer une pesée précise d'une partie du broyat (la concentration finale en levodopa doit correspondre à 100 mg/l) ;
3. Disperser, sous une agitation magnétique de 700 rpm (Variomag[®], Namur, Belgique), la quantité pesée dans un volume adéquat d'HCl 0.1 N ;
4. Laisser sous agitation pendant 30 min ;
5. Placer ensuite le dispersa aux ultra-sons (Bransonic[®] 2510^E-DTH, Danbury, Etats-Unis) pendant 45 min ;
6. Mettre au trait dans un matras ;
7. Filtrer la dispersion (0.2 µm) avant d'effectuer l'analyse par HPLC (**Figure 29**).

● Paramètres HPLC

- *Appareillage* : HPLC 1090 Series II, Agilent, Santa Clara, Etats-Unis

- *Colonne chromatographique* : Luna[®] 5µm C₁₈ 150 x 4.6 mm, Phenomenex (Torrance, Etats-Unis)

- *Phase mobile* :

- 4.76 g de KH₂PO₄
- Eau Milli Q : ad 1 litre
- Ajuster à pH 2,0 avec de l'acide orthophosphorique
- Proportion tampon phosphate aqueux / acétonitrile = 97 / 03

- Longueurs d'onde :
 - Levodopa : 280 nm
 - Carbidopa : 282 nm
 - Bensérazide : 220 nm
- Débit : 0.8 ml/min
- Température de la colonne : 30°C
- Volume d'injection : 20 µl
- Nombre d'essais = 5

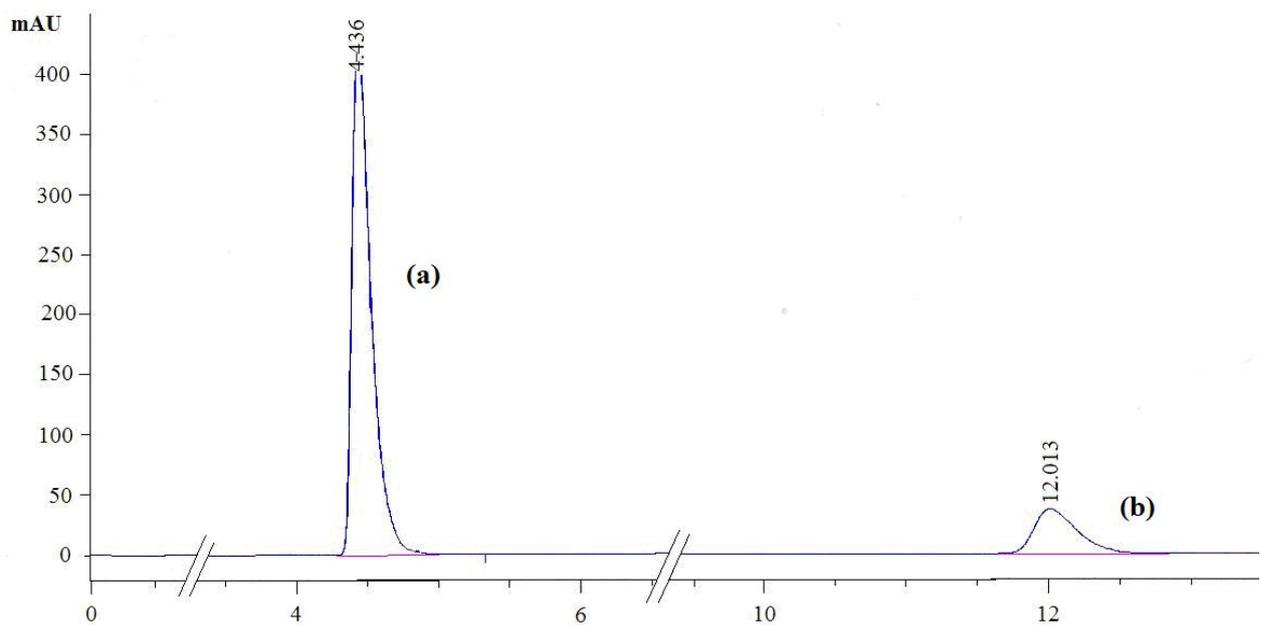


Figure 29 : Chromatogrammes de la levodopa (a) et de la carbidopa (b) obtenus par HPLC pour une concentration de 200 µg/ml à 280 nm et 282 nm.

I.10. Dosages fluorimétriques

La riboflavine contenue dans les échantillons d'urine a été dosée par une méthode spectrofluorimétrique inspirée de la technique de Burch et Coll et légèrement modifiée par Ingani [Burch et col., 1948 ; Ingani et col., 1987b]. Les mesures sont réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre Perkin Elmer, LS 50B, Bucks, UK.

I.11. Mesure de la radioactivité

Pour réaliser l'étude pharmacoscintigraphique, de la résine marquée par un radioélément a été incorporée à la Prolopa® HBS 125 et aux mini-comprimés matriciels et enrobés. Afin d'évaluer leur temps de résidence gastrique, la résine radioactive devait être maintenue à l'intérieur des formes pendant au moins 8 heures. Des essais préliminaires ont donc été réalisés afin de relever les profils de libération de la radioactivité à partir des 3 formes testées.

● Compteur automatique de rayonnement gamma

Un compteur automatique Packard Cobra™ Gamma 5003 (GMI, Minnesota, Etats-Unis) a été utilisé pour déterminer le nombre de coups par minute (cpm) à partir des échantillons liquides issus du test de dissolution. Il a été nécessaire de fixer la fenêtre de comptage de part et d'autre du pic maximal (des pics maximaux) d'énergie (keV) correspondant au radionucléide testé.

- Le temps de comptage a été fixé à 1 minute pour un échantillon liquide d'1 ml d'¹¹¹In.
- Fenêtres de comptage pour l'¹¹¹In = 173 ± 20 et 247 ± 20 (keV)

● Compteur non spécifique de rayonnement gamma

Un compteur non spécifique de rayonnement gamma Ortec Elscint (AC Joue, Pays-Bas) muni d'un cristal d'iodure de sodium (NaI) a été utilisé pour calibrer la radioactivité présente dans les formes sèches avant de les soumettre à la dissolution.

Il a été nécessaire de fixer la fenêtre de comptage de part et d'autre du pic maximal d'énergie (keV) correspondant au radionucléide testé.

La distance entre le cristal et l'échantillon à calibrer a dû être ajustée pour optimiser l'efficacité du comptage.

- Fenêtre de comptage :
 - Niveau inférieur = 160
 - Niveau supérieur = 500
- Distance de comptage : 15 cm
- Temps de comptage : 30 secondes

● Calibreur de radio-isotopes

Une chambre d'ionisation Capintec Radioisotope Calibrator CRC120 (New Jersey, Etats-Unis), calibrée sur le pic maximal d'énergie du radionucléide et préalablement ajusté en fonction du bruit de fond, a été utilisée lors du prélèvement de la solution d' ^{111}In nécessaire au marquage de la résine.

● Gamma caméra

La gamma caméra utilisée pour les acquisitions scintigraphiques était une DHD-SMV (Sopha Medical, France) fournie avec un cristal de NaI (40 cm x 1/2"). Avec ce type de caméra double tête, il est possible d'obtenir des images émanant de 2 radionucléides différents en une seule acquisition.

Les fenêtres de comptage ont été encodées comme suit (**Figure 30**) :

- condition « Indium » :

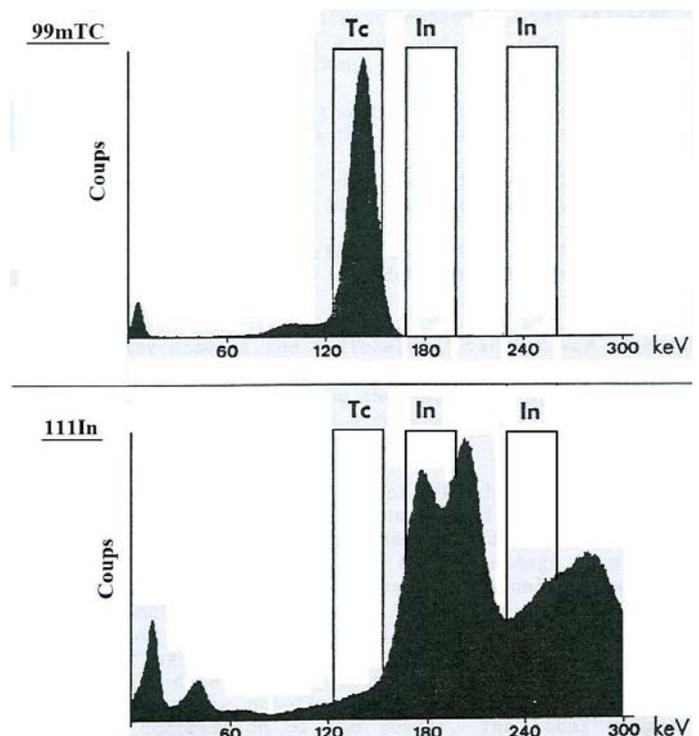
2 pics → 173 ± 20 et 247 ± 20 (keV)

- condition « Technétium » :

1 pic → 140 ± 20 (keV)

Le temps d'acquisition a été fixé à 2 minutes.

Figure 30 : Pics énergétiques des deux éléments analysés - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{111}In
- par gamma scintigraphie



I.12. Analyses LC/MS

Les analyses LC/MS ont été réalisées dans le cadre de l'étude pharmacoscintigraphique afin de doser les concentrations plasmatiques en levodopa, carbidopa et bensérazide à partir des échantillons prélevés.

L'extraction des substances actives à partir du plasma sanguin récolté s'est réalisée en éluant les échantillons au travers d'une cartouche SPE HAX échangeuse d'anions (Biotage, Uppsala, Suède) placée dans un système Gilson XL4 (Gilson, Middeltown, Etats-Unis) thermostatisé à 4°C (n=1). Premièrement, la cartouche a été conditionnée avec 1 ml de méthanol et 1 ml d'un tampon hydrogénophosphate diammonique (20 mM, pH 10). Ensuite, 400 µl d'échantillon* ont été déposés sur la cartouche, lavés par 0.8 ml d'eau désionisée et élués par 0.8 ml d'acide formique 3% (v/v). Il a été nécessaire d'ajouter 50 µl d'une solution d'acide ascorbique 2% (m/v) à l'éluat afin de préserver les PA d'une possible oxydation.

*Les échantillons ont été préparés comme suit :

- 10 µl d'hydrazine 20% (m/v) ont été ajoutés à 400 µl de plasma ;
- De ce mélange, ont été prélevés 250 µl, auxquels ont été ajoutés 25 µl de standard interne (salbutamol) et 200 µl d'une solution tampon hydrogénophosphate diammonique (20 mM, pH 10) ;
- 400 µl de ce dernier mélange ont été déposés sur la cartouche.

● Paramètres LC/MS

- *Appareillage* : HPLC série 1100, Agilent, Santa Clara, Etats-Unis couplé à un spectrophomètre de masse quadripole API365 (Applied Biosystems/MDS, Concord, Canada).
- *Colonne chromatographique* : Synergi® Polar-RP greffée avec des groupements phényl'éther, 4µm, 150x4.6mm, Phenomenex (Torrance, Etats-Unis)
- *Phase mobile* :
 - 20 % (v/v) de méthanol
 - 80 % (v/v) d'une solution d'acide formique à 2%
- *Débit* : 150 µl/min

- *Température de la colonne* : 30°C
- *Volume d'injection* : 50 µl
- *Substances dosées* : levodopa, carbidopa, bensérazide

I.13. Outils statistiques

● **Facteur de similitude f_2**

Le facteur f_2 est utilisé pour quantifier le degré de similitude entre deux profils de dissolution (ou de libération de radioactivité) pour autant que tous les tests aient été réalisés dans les mêmes conditions. Les valeurs de f_2 se situent entre 0 et 100. Plus le résultat est élevé, plus les profils de dissolution sont statistiquement similaires. La limite de similitude est fixée à 50 [Shah et col., 1998].

● **Test paramétrique à plusieurs comparaisons**

Lors des études de stabilité, le test paramétrique de Tukey-Kramer a été appliqué pour déterminer si les diminutions de teneurs en levodopa et en carbidopa par rapport à la teneur initiale étaient statistiquement significatives au cours du temps. Le test est significatif à 5% si le degré de significativité est inférieur à 0.05 [Systat, 1996].

II. Démarche expérimentale

Notre but était de fabriquer des mini-comprimés flottants à libération prolongée en utilisant la granulation thermoplastique suivie d'une compression directe. Si les mini-comprimés ont été premièrement testés *in vitro*, nous avons toujours gardé à l'esprit qu'une évaluation *in vivo* s'imposait. Toute la démarche scientifique s'est donc orientée dans ce but. Ces mini-comprimés devaient flotter rapidement indépendamment du pH afin d'éviter une vidange gastrique précoce. Leurs forces de flottaison devaient être suffisamment importantes pour favoriser leur flottaison à la surface de l'estomac malgré la poussée engendrée par la prise concomitante de nourriture. Il était également important d'obtenir un temps total de flottaison relativement long pour aboutir à un temps de résidence gastrique supérieur à celui observé avec d'autres formes. Le profil de dissolution du PA devait démontrer une libération prolongée. Ainsi, nous espérions éviter des effets de pics et vallées au niveau des courbes plasmatiques en fournissant un apport continu et régulier en PA. Puisque en cas de réussite, une commercialisation des ces mini-comprimés était à espérer, nous avons également essayé d'augmenter au maximum la teneur en PA afin de réduire le nombre d'unité à administrer par prise et donc, améliorer la compliance du patient. L'influence des conditions et du temps de stockage sur la teneur et les profils de dissolution des PA, ainsi que sur les propriétés de flottaison des mini-comprimés ont été évaluées lors d'étude de stabilité basées sur les normes ICH.

La chronologie des travaux réalisés au cours du développement et de l'évaluation des mini-comprimés flottants à libération prolongée se décline en 7 étapes successives.

1. La première partie du développement concerne des mini-comprimés flottants matriciels contenant de la levodopa, un agent gras liant, un mélange effervescent et un agent gélifiant cellulosique. Ces mini-comprimés sont caractérisés par un faible délai de flottaison, des forces de flottaison élevées et une durée totale de flottaison importante. De plus, des études de dissolution ont démontré la robustesse de ces mini-comprimés aux variations de pH et d'agitation.

2. Suite aux bons résultats obtenus *in vitro*, une étude préliminaire *in vivo* a été effectuée sur des sujets volontaires sains. La riboflavine - *vitamine endogène* - a été préférée à la levodopa comme modèle hydrosoluble en raison du caractère non invasif des prélèvements. Comme la levodopa, la riboflavine possède une fenêtre étroite d'absorption au niveau du duodénum. Ainsi, toute augmentation du temps de résidence gastrique provoquera une élévation de la quantité résorbée et donc, excrétée dans l'urine. Même si nous n'avons pas pu conclure statistiquement, l'hypothèse selon laquelle les mini-comprimés flottants offrent une rétention gastrique supérieure à celle obtenue avec des mini-comprimés non flottants semble avoir été vérifiée.

3. Une seconde technologie a ensuite permis de remplacer l'agent gélifiant par un enrobage capable de maintenir le dioxyde de carbone à l'intérieur de la forme tout en assurant la libération prolongée du PA. Le but de cette substitution était de pouvoir augmenter le pourcentage de PA contenu dans la forme.

4. La deuxième étape du développement des mini-comprimés enrobés visait à augmenter la vitesse de dissolution du PA et à améliorer les propriétés de flottaison de la forme. Ainsi, l'influence de substances hydrosolubles - *ex. lactose* - incorporées au sein de l'enrobage sur la vitesse de dissolution de la levodopa et l'influence de l'augmentation des teneurs en acide au sein du mélange effervescent ont été évaluées. La robustesse de ces mini-comprimés enrobés a également été vérifiée en faisant varier différents paramètres relatifs aux essais de dissolution.

5. Au cours de la cinquième partie de ce travail, l'influence des propriétés physico-chimiques de la levodopa et de la ciprofloxacine sur les profils de dissolution et de flottaison a été évaluée pour les deux concepts de mini-comprimés flottants. Le but de cette étude était de démontrer, qu'outre l'apport technologique, les propriétés physicochimiques du PA incorporé influencent à la fois les propriétés de dissolution et de flottaison.

6. Une étude pharmacocinétique a finalement été réalisée sur les mini-comprimés matriciels et enrobés contenant une association de levodopa et de carbidopa. Le but de cette investigation était d'étudier et de comparer les profils pharmacocinétiques de la levodopa et des inhibiteurs de décarboxylases périphériques obtenues à partir des mini-comprimés avec ceux obtenus après administration de la spécialité commerciale Prolopa® HBS 125. Une étude pharmacoscintigraphique a également été réalisée afin d'évaluer le temps de résidence gastrique des 3 formes flottantes.

7. Enfin, des études de stabilité ont été réalisées afin d'évaluer l'influence des conditions et de la durée de stockage sur :

- la teneur et les profils de dissolution de la levodopa et de la carbidopa ;
- les propriétés de flottaison des mini-comprimés matriciels et enrobés.

III. Synthèse des travaux de recherche publiés

III.1. Développement et évaluation d'une nouvelle forme flottante divisée permettant la libération prolongée de la levodopa

Development and evaluation of new multiple-unit levodopa
sustained-release floating dosage forms

International Journal of Pharmaceutics 334 (2007) 35-41

Publications : Article 1

III.1.1. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, le développement de formes pharmaceutiques prises par voie orale peut présenter certaines limitations liées au transit GI. Ce dernier étant difficilement contrôlable, la quantité de PA résorbée peut varier d'une administration à l'autre. Par exemple, un transit GI trop rapide peut conduire à une libération incomplète du PA en amont de sa fenêtre d'absorption. L'efficacité thérapeutique s'en trouvera ainsi diminuée. Une prolongation du temps de résidence gastrique de la forme pharmaceutique peut résoudre ce type de problème et augmenter la reproductibilité ainsi que la durée de l'effet thérapeutique. De plus, la biodisponibilité des PA possédant une fenêtre d'absorption étroite au niveau du duodénum s'en trouvera significativement accrue [Hoffman et col., 2004]. C'est pourquoi la levodopa a été choisie comme modèle de PA. Il s'agit d'un amino-acide (**Figure 31**) possédant une fenêtre d'absorption étroite au niveau du duodénum [Chen et col., 2005].

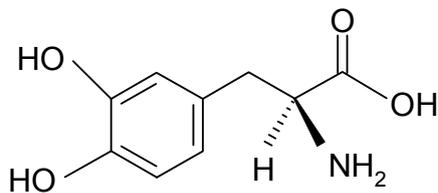


Figure 31 : Formule développée de la levodopa

Après avoir franchi la barrière hémato-encéphalique, la levodopa atteint les neurones cérébraux où elle est décarboxylée en dopamine [Kordower et Goetz, 1999]. La dopamine ne peut être administrée directement car elle ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique, provoquant de nombreux effets périphériques indésirables [Tolokan et col., 1997].

La levodopa constitue un traitement de choix de la maladie de Parkinson [Deogaonkar et Subramanian, 2005]. Cette dernière est caractérisée par la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la *pars compacta* de la substance noire, engendrant un déficit dopaminergique au sein du striatum [Fraix, 2004]. Il s'agit de la deuxième maladie neurodégénérative la plus importante après la maladie d'Alzheimer. Elle possède une distribution mondiale et atteint autant les hommes que les femmes [Shastry, 2001]. La déplétion dopaminergique entraîne une exacerbation des activités GABAergique et glutaminergique. La résultante de ces troubles biochimiques provoque une inhibition

accrue du thalamus et du cortex moteur, engendrant de l'akinésie et de la dystonie. La substitution de la dopamine endogène par la levodopa permet de lever cette inhibition [Deogaonkar et Subramanian, 2005]. Malheureusement, des troubles moteurs - *mouvements involontaires et dyskinésie* - apparaissent chez 50 % des patients après environ 5 années de traitement. En plus de la dénervation striatale progressive, la stimulation pulsatile des récepteurs dopaminergiques favorise l'apparition de ces complications [Scharg, 2005]. Le développement de formes flottantes capables de prolonger la libération de la levodopa permet de résoudre ce problème en réduisant le nombre de prises quotidiennes [Fahn, 1998].

Le but de la première partie du travail expérimental était de développer des mini-comprimés flottants matriciels fournissant une libération prolongée de la levodopa. Ces mini-comprimés sont constitués de granulés, fabriqués par granulation thermoplastique, avant d'être comprimés par compression directe. Il est important d'obtenir une forme robuste présentant de bonnes propriétés de flottaison - *ex. faible délai, durée totale, forces élevées* - et de dissolution - *ex. absence de burst effect, libération constante*. Pour ce faire, l'influence de la composition - *teneur en agent matriciel cellulosique et agents effervescent* - et des paramètres de fabrication - *ex. diamètre, force de compression* - ont d'abord été examinés. Les profils de dissolution ont ensuite été relevés à différents pH et différentes vitesses d'agitation.

III.1.2. Résultats et discussion

III.1.2.1. Influence de la formulation sur les propriétés de dissolution et de flottaison

Un agent gélifiant de haute viscosité - *Méthocel® K15M* - a été utilisé pour retenir le dioxyde de carbone généré, tout en assurant la libération prolongée du PA (**Tableau 9**). Ce polymère cellulosique de haut poids moléculaire permet de réduire les phénomènes d'érosion grâce à son importante capacité d'hydratation. La rétention du PA est également favorisée par la formation d'une gangue gélatineuse épaisse limitant le phénomène de burst effect.

Le Precirol® a été utilisé comme agent liant lipidique en raison de sa plage de fusion relativement basse (~ 50°C). Les frictions provoquées lors de la granulation thermoplastique engendrent une élévation de température responsable du ramollissement du liant, initiant ainsi le processus de granulation [Bardin et col., 2004]. Le Compritol® a été incorporé en tant qu'agent diluant lipophile, la température interne du mélange n'atteignant jamais sa température de ramollissement (~ 70°C).

En générant du dioxyde de carbone, le mélange effervescent permet d'obtenir une flottaison rapide en favorisant l'hydratation des chaînes cellulosiques et donc l'emprisonnement du gaz formé. De plus, une flottaison régulière sera assurée grâce à un apport continu en dioxyde de carbone.

Tableau 9 : Compositions des granulés investigués

	Formulations (% m/m)			
	F1	F2	F3	F4
Levodopa	37.5	37.5	37.5	37.5
Precirol® ATO5	12.0	12.0	12.0	12.0
Compritol® 888	-	-	-	6.0
Methocel® K15M	25.0	15.0	15.0	15.0
CaCO ₃	10.0	10.0	5.0	5.0
NaHCO ₃	4.0	4.0	4.0	4.0
Acide tartrique	3.0	3.0	3.0	3.0
Lactose 450 mesh	8.5	18.5	23.5	17.5

L'influence de la formulation sur les profils de dissolution a été évaluée sur des mini-comprimés de 4 mm de diamètre à pH 3.0 sous une agitation de 60 rpm (USP, type II).

La formulation F1 a fourni une libération prolongée de la levodopa sans délai, ni burst effect. Les profils de dissolution obtenus étaient réguliers et s'étalaient sur une période d'environ 8 heures. De plus, les mini-comprimés ont flotté en seulement 12 minutes et ont conservé leurs propriétés de flottaison pendant plus de 13 heures.

Le pourcentage en agent gélifiant a alors été réduit de 25 à 15 % (m/m). La teneur en agent effervescent étant resté identique, une désintégration précoce s'est produite. L'entièreté du PA a été dissoute en seulement 1 heure et demie. Les mini-comprimés n'ont jamais flotté. La gangue gélatineuse formée n'était pas assez épaisse pour résister aux tensions provoquées par la génération du dioxyde de carbone.

La quantité d'agents effervescents a ensuite été réduite à 12% (m/m). Si l'intégrité des mini-comprimés a été maintenue, ils ont flotté moins vite (90 min) et pendant moins longtemps (7.5 h). La vitesse de dissolution de la levodopa a également augmenté à cause de la quantité moins importante en agent gélifiant.

Le Compritol® 888 a finalement été inséré dans la composition des granulés pour améliorer la flottaison et retenir le PA plus longtemps au sein de la forme. Malheureusement, malgré sa faible densité et ses propriétés lipophiles, nous ne sommes pas parvenus à obtenir d'aussi bons résultats que ceux fournis par la première formulation.

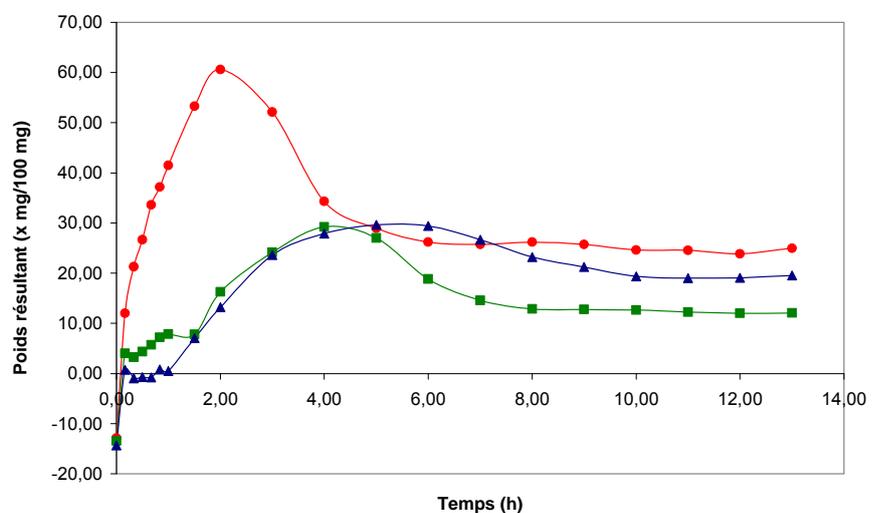
III.1.2.2. Influence du diamètre

Les essais de dissolution ont été effectués sur les mini-comprimés F1 de 3, 4 et 5 mm. Les profils de dissolution ont été relevés à pH 3.0 sous une agitation de 60 rpm.

La levodopa s'est dissoute plus rapidement à partir des mini-comprimés de 3 mm. Toutefois, aucun burst effect n'a été observé. La libération a été soutenue dès le début du test.

Les profils de poids résultant (**Figure 32**) ont montré que le délai de flottaison augmentait avec le diamètre. Il s'élevait à 1, 12 et 45 min, respectivement pour les mini-comprimés (MC) de 3, 4 et 5 mm.

Figure 32 : Influence du diamètre – 3 (●), 4 (■), 5 (▲) mm – sur les propriétés de flottaison des MC (n=1).



La valeur de poids résultant maximale obtenue avec les mini-comprimés de 3 mm s'élevait à 60 mg/100mg, c'est-à-dire le double de celles relevées avec les mini-comprimés de 4 et 5 mm. Ils ont flotté pendant plus de 13 heures, montrant une bonne résistance à l'érosion, malgré l'importante surface de contact solide-liquide par comparaison aux mini-comprimés de plus grand diamètre.

III.1.2.3. Influence de la force de compression

Les profils de dissolution (USP type II ; pH 3.0 ; 60 rpm) obtenus avec les mini-comprimés F1 de 3 mm n'ont pas été altérés par une modification de la force de compression (**Tableau 10**). Tous les profils sont restés statistiquement similaires - *ex. la plus petite valeur de f_2 96,4* - pendant les 8 heures de test.

Tableau 10 : Caractéristiques physiques des mini-comprimés en fonction de leur diamètre.

	Diamètres (mm)		
	3	4	5
Masse (mg)	20	40	60
Forces de compression (N)	(a) 50-100 (b) 100-200 (c) 200-400 (d) 1000-2000	2000-3000	3000-4000
Dureté (N) (n=10)	(a) 5 ± 1 (b) 8 ± 1 (c) 11 ± 1 (d) 14 ± 1	22 ± 3	28 ± 2

Même aux forces de compression les moins élevées, aucun burst effect n'est apparu. Cela peut être expliqué par la présence du mélange effervescent, qui en générant du dioxyde de carbone, favorise l'hydratation rapide des chaînes cellulosiques.

A l'inverse, les propriétés de flottaison ont été influencées par la force de compression (**Figure 33**). Même si, quelle que soit la force de compression, tous les mini-comprimés ont flotté endéans la minute, le poids résultant maximal - *69 mg/100mg* - a été obtenu avec ceux pour lesquels les forces de compression étaient comprises entre 50 et 100 N.

Après avoir optimisé la formulation et les propriétés physiques des mini-comprimés flottants, l'influence de certaines conditions de dissolution - ex. *pH*, *agitation* - sur leur profil de libération a ensuite été évaluée. Ainsi, tous les essais qui vont suivre ont été réalisés sur des mini-comprimés F1 de 3 mm, comprimés à des forces comprises entre 50 et 100 N.

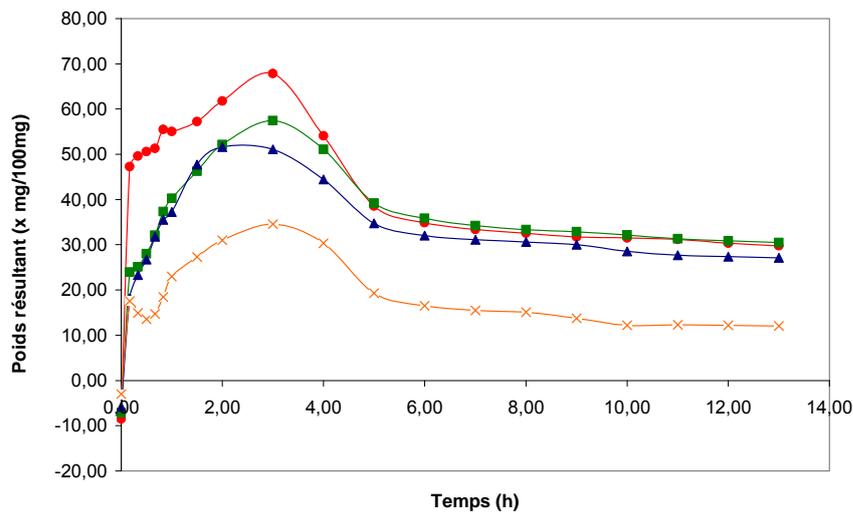


Figure 33 : Influence de la force de compression - 50-100N (●), 100-200N (■), 200-400N (▲), 1000-2000N (x) - sur les propriétés de flottaison des MC F1 de 3 mm de diamètre (n=1).

III.1.2.4. Influence du pH sur les profils de dissolution

La présence des fonctions carboxylique et amine primaire dans la structure de la levodopa (**Figure 31**) engendre une solubilité pH-dépendante. Son profil de dissolution a donc été relevé à 3 valeurs de pH différentes (**Figure 34**) sous une agitation de 60 rpm (Type II). Elles ont été choisies afin de simuler des pH physiologiques pouvant être rencontrés par la forme au niveau du système GI. Des valeurs de pH équivalentes à 1.5 et 3.0 correspondent aux pH stomacaux à jeun et post-prandiaux. Tandis qu'un pH 6.5 se rencontre au niveau duodénal.

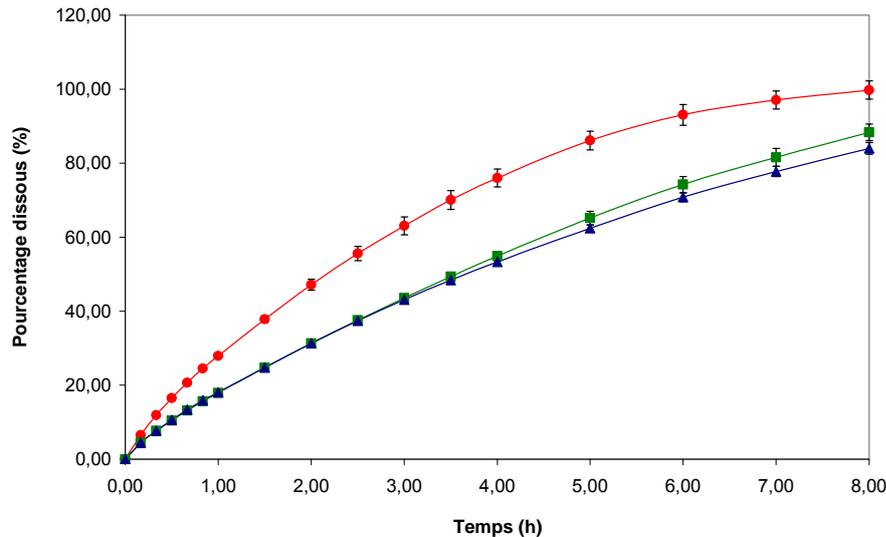


Figure 34 :
Influence du pH -
1.5 (●), 3.0 (■), 6.5
(▲) – sur le profil de
dissolution de la
levodopa (n=5)

Quel que soit le pH, aucun burst effect n'est apparu et une libération prolongée de la levodopa a été obtenue dès le début du test. Même si la libération du PA a été plus rapide à pH 1.5, tous les profils de dissolution sont restés statistiquement similaires pendant les 8 heures de test - *ex.* $f_{2(1,5-6,5)} = 57.2$. Il semble donc que la vitesse de dissolution de la levodopa dépende plus des capacités de rétention du dérivé cellulosique - le Méthocel® K15M - que de la solubilité pH-dépendante de la molécule.

III.1.2.5. Influence de la vitesse d'agitation

En plus de leur influence sur la vitesse de dissolution, il est admis que les facteurs affectant la gélification et l'érosion du polymère cellulosique peuvent également modifier l'allure des profils de dissolution. Ainsi, la robustesse des formes matricielles peut être partiellement évaluée en étudiant l'influence de la vitesse de rotation des pales - 50, 75 et 100 rpm - sur les profils de dissolution de la substance active.

Conformément à l'équation de Noyes-Whitney, la libération de la levodopa a augmenté avec la vitesse de rotation. Le démantèlement plus rapide des chaînes de polymère a provoqué la diminution de l'épaisseur de la couche stagnante, favorisant ainsi l'érosion de la matrice. Toutefois, aucune désintégration, ni aucun burst effect ne s'est produit quelle qu'ait été la vitesse de rotation des pales. La libération du PA a été soutenue pendant plus de 8 heures et tous les profils de dissolution sont restés statistiquement similaires - *ex.* $f_{2(50-100rpm)} = 62.7$.

III.1.2.6. Comparaison des propriétés de flottaison obtenues avec les mini-comprimés flottants et la spécialité commerciale Prolopa® HBS 125

La spécialité commercialisée Prolopa® HBS 125 est une matrice monolithique flottante ne contenant pas de mélange effervescent. Son profil de flottaison a été comparé aux mini-comprimés (Figure 35) dans l'espoir de pouvoir prédire l'efficacité *in vivo* de ces derniers. En effet, les corrélations *in vitro-in vivo* ayant déjà été confirmées pour la Prolopa® HBS [Seth et Tossounian, 1984], une meilleure flottaison des mini-comprimés pourrait engendrer un temps de résidence gastrique plus important.

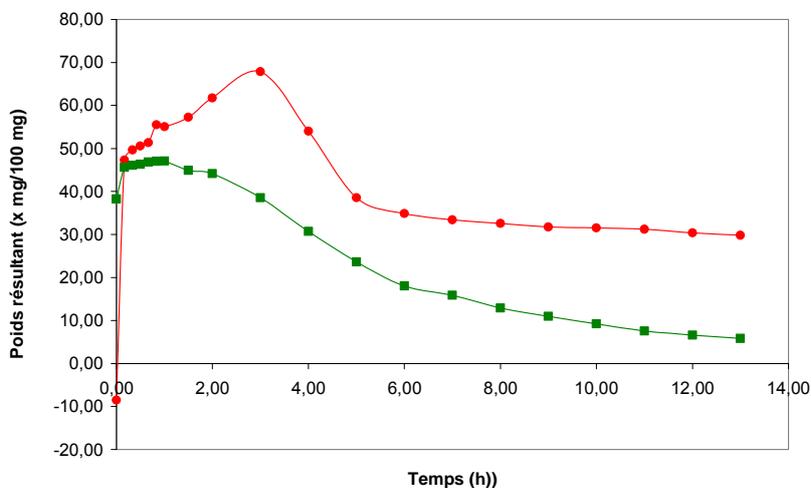


Figure 35 : Profils de flottaison de la Prolopa® HBS 125 (■) comparé à celui des MC flottants matriciels (●) (n=1).

La gélule de Prolopa® HBS 125 n'a présenté aucun délai de flottaison en raison de sa faible densité initiale. Son poids résultant est resté stable à 45 mg/100mg pendant 1 heure, avant de diminuer progressivement pour atteindre 5 mg/100mg après 13 heures. L'équilibre hydrodynamique n'a pu être conservé pendant toute la durée du test. Après 1 heure, la pénétration de l'eau à l'intérieur de la forme est devenue plus rapide que l'augmentation de volume. La densité de la gélule a augmenté et les forces de flottaison ont diminué. Le mélange effervescent contenu dans les mini-comprimés a permis d'engendrer des forces de flottaison toujours supérieures à celles obtenues avec la Prolopa® HBS 125. Le dioxyde de carbone étant produit en continu et maintenu à l'intérieur de la forme jusqu'à érosion complète de la matrice, la densité des mini-comprimés n'a jamais diminué de façon excessive. Il semble donc que l'incorporation d'un mélange effervescent améliore les propriétés de flottaison.

III.1.3. Conclusion et perspectives

En conclusion, des nouveaux mini-comprimés flottants permettant la libération prolongée de la levodopa ont été développés avec succès. L'utilisation de la granulation thermoplastique suivie d'une compression directe permet d'obtenir un procédé de fabrication simple, rapide et peu coûteux. La libération prolongée du PA est assurée par un dérivé cellulosique de haut poids moléculaire. Le mélange effervescent aide à l'hydratation des chaînes de polymère, évitant un phénomène de burst effect. De plus, la production continue du dioxyde de carbone engendre un faible délai de flottaison (± 1 min), des forces de flottaison élevées - de 30 mg/100mg à 70 mg/100mg - et une durée totale de flottaison supérieure à 13 heures. Grâce à l'étude des profils de dissolution, il a été également démontré que ces mini-comprimés offraient une bonne robustesse aux variations de pH et d'agitation.

Toutefois, même si ces résultats sont très encourageants, de simples résultats *in vitro* ne peuvent certifier l'efficacité réelle d'une forme flottante. Il devient donc nécessaire de réaliser une étude *in vivo* préliminaire afin de valider ces premières évaluations.

III.2. Evaluation *in vitro* de mini-comprimés flottants
à libération prolongée contenant de la riboflavine,
suivi d'une étude *in vivo* réalisée sur des sujets
volontaires sains.

In vitro and *in vivo* evaluation in healthy human volunteers
of floating riboflavin minitablets

Journal of Drug Delivery Science and Technology 16 (2006) 351-356

Publications : Article 2

Annexes : 1 - 2 et 3

III.2.1. Introduction

Le développement des nouveaux mini-comprimés matriciels flottants à libération prolongée ayant été réalisé avec succès, une étude *in vivo* préliminaire a alors été menée sur des sujets volontaires sains. Le but de cette investigation était d'évaluer la rétention gastrique des mini-comprimés, à jeun et après repas. La riboflavine a été sélectionnée comme modèle car il est possible de la doser facilement dans l'urine et cela évite des prélèvements sanguins invasifs. De plus, elle possède un métabolisme très court - $t_{1/2} = 1h$ - ce qui permet de raccourcir la durée d'étude à une seule journée. Comme elle possède une fenêtre d'absorption étroite au niveau du duodénum, toute variation du transit stomacal d'une forme orale contenant de la riboflavine, affecte à la fois la vitesse de résorption et la quantité de vitamine absorbée [Levy et Hewit, 1971]. Ainsi, il devient possible d'évaluer indirectement la rétention gastrique d'une forme flottante. Toute augmentation du temps de résidence gastrique provoquera une élévation de la quantité de riboflavine absorbée et donc, excrétée dans l'urine. Certains paramètres pharmacocinétiques ont donc été étudiés à partir d'échantillons urinaires. Des mini-comprimés matriciels non flottants, fournissant les mêmes profils de dissolution que les flottants, ont été utilisés comme comparateurs (**Tableau 11**). Les études concernant l'influence du diamètre sur les propriétés de dissolution et de flottaison n'étant pas terminées au début de cette étude, cette dernière a été réalisée sur des mini-comprimés de 4 mm de diamètre. Les deux formes ont été fabriquées par granulation thermoplastique suivie d'une compression.

Tableau 11 : Formulations et caractéristiques des MC matriciels flottants et non flottants utilisés lors de l'étude *in vivo* préliminaire.

Formulations (% m/m)	MC flottants	MC non flottants	Caractéristiques
Riboflavine Na	5	5	Diamètre = 4 mm
Precirol [®] ATO55	12	18	Masse = 40 mg
Methocel [®] K15M	25	55	
CaCO ₃	10	-	Force de compression = 2000-3000 N
NaHCO ₃	4	-	
Acide tartrique	3	-	
Lactose 450 mesh	41	22	Dureté = 22 N

Protocole de l'étude

L'étude concernait 9 volontaires adultes masculins sains, entrant dans une tranche d'âge comprise entre 22 et 45 ans, ne prenant aucune médication et n'ayant pas souffert d'antécédents d'affections gastro-duodénales (Ref : P2005/057). Un à deux jours avant la session d'étude, le sujet ne devait pas consommer de manière excessive des jus de fruits ou des aliments pouvant provoquer un trouble du transit GI. Les volontaires devaient être à jeun depuis la veille à minuit et ne devaient pas se mettre en position couchée durant les 8 heures qui suivaient la prise de la forme pharmaceutique (cf. annexes 1, 2, 3).

Les volontaires étaient répartis en 2 groupes, de 5 et 4 personnes, un «groupe à jeun» et un «groupe repas», respectivement. Les mini-comprimés flottants et non flottants ont été administrés aux 2 groupes à une semaine d'intervalle. Cette semaine correspond à une période de wash-out. L'administration des gélules contenant les mini-comprimés flottants ou non s'est faite de manière randomisée. L'étude s'est déroulée en double aveugle, ni les investigateurs, ni les volontaires ne savaient quel type de forme était contenu dans la gélule administrée.

A son arrivée, le sujet était invité à vider sa vessie. Selon le groupe auquel il appartenait, il devait suivre le régime alimentaire standardisé qui lui était attribué. Les urines étaient ensuite récoltées aux temps prédéfinis par le protocole et conservées dans des flacons bruns placés au frigo à 4°C. L'ensemble des urines excrétées pendant la journée a été récolté. La riboflavine étant plus stable aux pH fortement acides, 5 gouttes d'HCl 12N ont été additionnées à chaque échantillon. Les échantillons ne pouvant être analysés le jour même étaient conservés au congélateur (-18°C) jusqu'à leur analyse. La riboflavine contenue dans les urines a été dosée par une méthode spectrofluorimétrique.

III.2.2. Résultats et discussion

III.2.2.1. Evaluations *in vitro* des mini-comprimés flottants et non flottants

Les profils de dissolution de la riboflavine à partir des mini-comprimés flottants et non flottants ont été relevés à pH 1.5 - 3.0 et 6.5 (USP type II ; 60 rpm). La rétention gastrique des mini-comprimés devant être confirmée par l'analyse des teneurs urinaires

en riboflavine, il était indispensable d'obtenir des profils de dissolution similaires entre la forme flottante et la forme non flottante. Le protocole étant standardisé sur une période de 7 heures, la similarité entre les courbes obtenues à partir des 2 types de forme aux différents pH a été calculée pour cet intervalle de temps - $f_{2(pH\ 1.5)} = 50.6 / f_{2(pH3.0)} = 64.6 / f_{2(pH6.5)} = 66.0$.

La similitude des courbes de dissolution aux différents pH ayant été établie, les mini-comprimés flottants et non flottants ont été soumis à l'essai d'agitation horizontale. La forme flottante a flotté après 15 minutes et a conservé ses propriétés jusqu'à érosion complète de la matrice. La forme non flottante a coulé pendant toute la période de test. Les profils de poids résultant ont démontré que les mini-comprimés flottants ont flotté pendant plus de 13 heures. Leur poussée maximale a atteint 43 mg/100mg. A l'inverse, à aucun moment, les mini-comprimés non flottants n'ont acquis une poussée positive. Leur poids résultant est resté plus ou moins constant, avoisinant -15mg/100mg.

III.2.2.2. Evaluations *in vivo*

La riboflavine est excrétée sous forme inchangée dans l'urine. La quantité excrétée reflète donc la quantité absorbée. Comme sa fenêtre d'absorption est étroite, la quantité excrétée devrait être plus importante avec une forme flottante. En effet, si cette dernière réside plus longtemps dans l'estomac que la non flottante, la riboflavine libérée progressivement pourra être absorbée en plus grande quantité. Si la forme non flottante sort rapidement de l'estomac, passant ainsi sa fenêtre d'absorption, seule une faible quantité aura le temps d'être absorbée. Le **Tableau 12** reprend les quantités de riboflavine excrétée en 23h pour chaque forme en fonction du régime alimentaire.

Tableau 12 : Quantité totale de riboflavine (mg) excrétée dans l'urine en 23h (de T₀ à T₂₃)

	Forme flottante	Forme non flottante
A JEUN		
Sujet 1	30	13
Sujet 2	14	19
Sujet 3	13	16
Sujet 4	48	44
Sujet 5	20	12
Moyennes ± Ecart-types	25 ± 15	21 ± 13

REPAS		
Sujet 1	37	10
Sujet 2	12	16
Sujet 3	24	17
Sujet 4	32	16
Moyennes \pm Ecart-types	26 \pm 11	15 \pm 3

Lorsque nous avons appliqué le test de Wilk-Shapiro, nous avons constaté que les valeurs se distribuaient de manière gaussienne. Nous avons alors effectué un test t de Student. Ce dernier nous a donné une valeur supérieure à 0.05 ($p > 0.05$). Les écart-types étaient trop importants pour pouvoir conclure statistiquement. Dans le groupe à jeun, un sujet s'est écarté largement de la moyenne. Nous aurions pu l'éliminer mais nous avons préféré laisser tous les résultats, non seulement parce que le nombre de sujets était trop restreint pour en éliminer, mais également parce que cela démontre bien les variations importantes engendrées par l'utilisation de riboflavine (présente dans l'alimentation)

Toutefois, dans le groupe repas, la quantité moyenne excrétée en 23h a été plus importante après administration de la forme flottante, ce qui corrobore les résultats observés dans la littérature [Ingani, 1987a ; Sato et col., 2003].

Par contre, après administration de la forme flottante, la quantité de riboflavine excrétée en 23h n'est pas différente dans le groupe repas comparé au groupe à jeun (26 \pm 11 vs. 25 \pm 15). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une quantité non négligeable d'eau a été ingérée régulièrement. L'estomac, même dans le groupe à jeun, n'était jamais totalement vide. Ces résultats semblent démontrer les bonnes capacités de flottaison des mini-comprimés.

Les **Figures 36** et **37** reprennent les quantités de riboflavine excrétées à chaque prélèvement chez les sujets à jeun et dans le groupe repas. Il est important de noter qu'après 8 heures, la prise de repas n'était plus standardisée.

Tant dans le groupe à jeun que dans le groupe repas, la quantité de riboflavine excrétée a tendance à être plus élevée avec la forme flottante qu'avec la forme non flottante. Cette différence est d'autant plus flagrante dans le groupe repas. De plus, la quantité de riboflavine excrétée augmente nettement entre 4 et 6h, ainsi qu'entre 6 et 8h. Ces prélèvements ont été effectués après administration du dîner et du goûter. Cette

augmentation de la quantité excrétée après prise concomitante de nourriture est caractéristique d'une forme flottante.

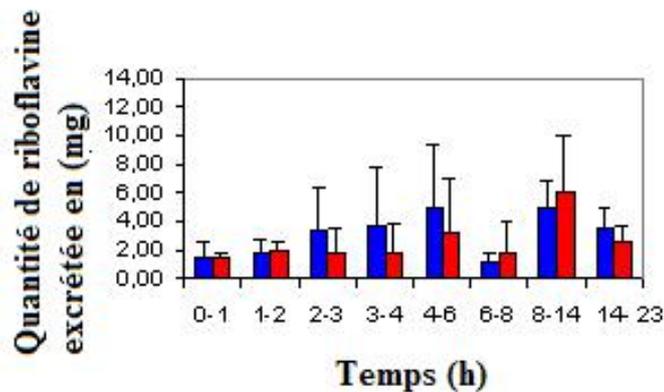


Figure 36 : Quantité moyenne (mg) de riboflavine excrétée à partir de la forme flottante (en bleu) et non flottante (en rouge), en fonction du temps chez les sujets à jeun (n=5)

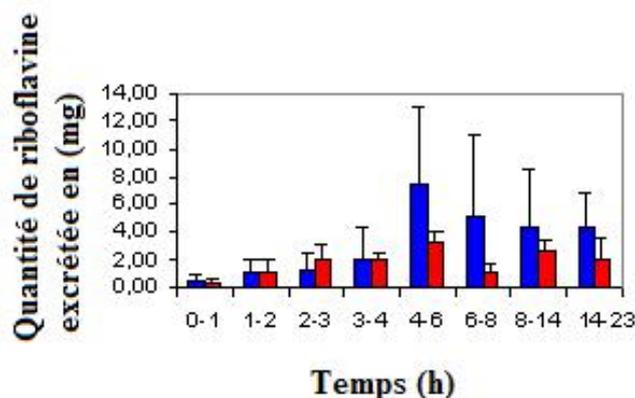


Figure 37 : Quantité moyenne (mg) de riboflavine excrétée à partir de la forme flottante (en bleu) et non flottante (en rouge), en fonction du temps chez les sujets «repas» (n=4)

Un test t de Student a été réalisé sur chaque valeur en fonction du régime alimentaire. Aucune valeur n'était inférieure à 0.05. Les écart-types étaient trop importants pour pouvoir conclure statistiquement.

Les **Figures 38** et **39** montrent les vitesses d'excrétion urinaire moyennes (en $\mu\text{g}/\text{min}$) en fonction du temps. Les écart-types ne sont pas représentés sur les figures pour faciliter leur lecture.

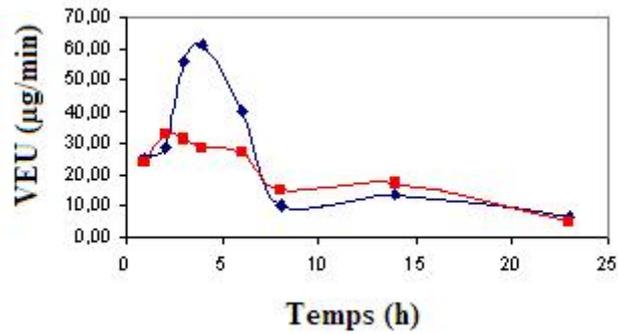


Figure 38 : Vitesses d'excrétion urinaire moyennes ($\mu\text{g}/\text{min}$) des sujets à jeun en fonction du temps, pour la forme flottante (●) et non flottante (■) ($n=5$).

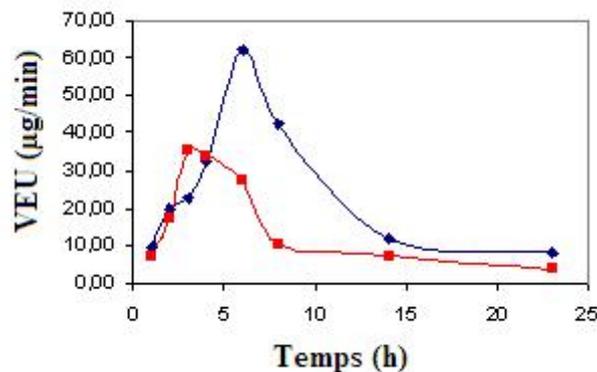


Figure 39 : Vitesses d'excrétion urinaire moyennes ($\mu\text{g}/\text{min}$) des sujets «repas» en fonction du temps, pour la forme flottante (●) et non flottante (■) ($n=4$).

Quel que soit le régime alimentaire, la VEU maximale et le temps nécessaire pour l'atteindre ont toujours été supérieurs après administration d'une forme flottante. Ce décalage de T_{max} est surtout marqué avec la prise concomitante d'un repas. En effet, dans le groupe repas, le T_{max} de la VEU pour la forme flottante est d'environ 5h, alors qu'elle n'est que de 3h pour la forme non flottante. En comparant les 4 courbes, nous constatons que l'étalement de la courbe de VEU est plus important dans le cas d'une forme flottante prise avec un repas que dans les 3 autres cas. Ceci semble indiquer la bonne flottaison du système. Cette hypothèse devra être vérifiée ultérieurement par une étude pharmacoscintigraphique.

III.2.3. Conclusion et perspectives

Des mini-comprimés flottants et non flottants offrant une libération prolongée de la riboflavine ont été développés et évalués. La riboflavine a été utilisée comme agent traceur pour démontrer indirectement la rétention gastrique accrue de la forme flottante. *In vitro*, la différence de flottaison entre les deux formes a été prouvée par le test du poids résultant. Les profils de dissolution aux différents pH testés étant similaires, la comparaison des résultats obtenus après l'étude *in vivo* pouvait dès lors être effectuée.

Après analyse des quantités excrétées et des VEU de la riboflavine, aucune conclusion statistique n'a pu être posée à cause d'écart-types trop importants. Ces derniers peuvent être expliqués par l'utilisation d'une vitamine comme agent traceur, mais également par le nombre de sujets testés peu conséquent. Toutefois, la rétention gastrique des mini-comprimés semble s'accroître après administration conjointe d'une forme flottante et d'un repas.

Plusieurs tendances semblent confirmer cette affirmation. En effet, quand une forme flottante est prise avec un repas, par rapport au groupe à jeun et par rapport à une forme non flottante :

- la quantité moyenne de riboflavine excrétée est plus importante ;
- après chaque ingestion de nourriture, la quantité moyenne de riboflavine excrétée augmente ;
- le T_{\max} moyen de la VEU en riboflavine en fonction du temps est plus élevé.

Même si nous ne pouvons conclure statistiquement, l'hypothèse selon laquelle les mini-comprimés flottants offrent une rétention gastrique supérieure à celle obtenue avec les mini-comprimés non flottants semble être vérifiée. Comme annoncé dans la littérature, le repas semble favoriser la flottabilité des formes flottantes. A jeun, aucune différence de rétention gastrique ne semble pouvoir être notée.

Toutefois, malgré ces résultats encourageants, la flottaison et la rétention gastrique des mini-comprimés flottants devront être prouvées par une étude pharmacoscintigraphique sur un nombre plus élevé de sujets. Des molécules non endogènes présentant une fenêtre d'absorption étroite au niveau du duodénum – *ex. levodopa, carbidopa, ciprofloxacine* – devront être utilisées comme modèle afin d'éviter tout apport exogène lié à la nourriture.

III.3. Développement de nouveaux mini-comprimés flottants assurant la libération prolongée de la levodopa grâce à un enrobage acrylique insoluble.

New levodopa sustained-release floating minitablets coated with insoluble acrylic polymer,

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 68 (2008) 310-318

Publications : Article 3

III.3.1. Introduction

Les précédents travaux ont eu pour thème le développement et l'évaluation de mini-comprimés matriciels flottants. La libération prolongée de la levodopa était assurée par un hydrocolloïde cellulosique de haut poids moléculaire. Ce dernier, servant également à retenir le dioxyde de carbone généré par un mélange effervescent, devait être incorporé en quantité importante – *un quart de la masse totale*. Une seconde technologie a permis de remplacer l'agent gélifiant par un enrobage capable de maintenir le dioxyde de carbone à l'intérieur de la forme tout en assurant la libération prolongée de la levodopa. Pour ce faire, un dérivé acrylique insoluble – *Eudragit® RL30D* – a été utilisé comme agent filmogène [Chang et col., 1989]. L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'influence des paramètres de fabrication – *ex. la composition des granulés, le diamètre des mini-comprimés, la composition et la teneur en enrobage* – sur les propriétés de dissolution et de flottaison des mini-comprimés enrobés. Nous désirions obtenir une forme capable de flotter aussi rapidement, et pendant un laps de temps au moins équivalent aux mini-comprimés matriciels. La libération de la levodopa ne devait pas être retardée par la présence de l'enrobage. De plus, ce dernier devait être suffisamment solide pour résister aux tensions engendrées par la génération du dioxyde de carbone.

III.3.2. Résultats et discussion

III.3.2.1. Conception des mini-comprimés enrobés flottants

Le dioxyde de carbone généré devait donc être retenu par un enrobage, assurant la libération prolongée du PA. Partant de cet objectif, l'agent filmogène devait être suffisamment perméable pour initier rapidement le dégagement gazeux. Toutefois, il devait également être relativement imperméable au CO₂ afin d'engendrer des forces de flottaison importantes pendant un laps de temps prolongé. Ainsi, un latex acrylique légèrement cationique, insoluble dans l'eau – *l'Eudragit® RL30D* – a été sélectionné parmi d'autres dérivés moins perméables (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Composition des dispersions d'enrobage évaluées

Formulations (g)	F1	F2
Eudragit [®] RL30D (sec)	200	200
TEC	40	-
ATEC	-	40
Talc	50	50
Anti-mousse	2	2
Eau	842	842
Matière sèche (% m/m)	25.6	25.6
Teneur en enrobage (% m/m)	12-15-20	20

Afin d'évaluer leur influence sur l'élasticité de l'enrobage, des plastifiants présentant une hydrosolubilité différente ont été testés. Le TEC a été incorporé en tant qu'agent hydrosoluble. L'ATEC présentait une solubilité moins importante et a donc été utilisé comme modèle de plastifiant moins hydrosoluble. Le talc a été utilisé ici comme substance de charge.

III.3.2.2. Influence de la teneur en agents effervescents sur les propriétés de dissolution et de flottaison

Les teneurs en levodopa et en agent liant sont restées constantes (**Tableau 14**). Seule la quantité de mélange effervescent a été modifiée afin d'évaluer son influence sur les profils de dissolution et de flottaison.

Tableau 14 : Composition et caractéristiques des différents noyaux évalués

Composition (% m/m)	C1	C2	C3
Levodopa	37.5	37.5	37.5
Precirol [®] ATO5	12.0	12.0	12.0
CaCO ₃	10.0	5.0	1.7
NaHCO ₃	4.0	4.0	1.4
Acide tartrique	3.0	3.0	1.0
Lactose 450 mesh	33.5	38.5	46.4
Diamètre (mm)	3	4	
Masse (mg)	20	40	
Force de compression (N)	50-100	2000-3000	
Dureté (N)	5	22	

L'influence de la teneur en agents effervescents sur les profils de dissolution et de flottaison a été évaluée sur des mini-comprimés de 4 mm enrobés par F1 (12% m/m).

Quelle que soit la teneur en agents effervescents, la levodopa a été libérée de façon prolongée dès le début du test. De plus, la grande surface de contact fournie par les mini-comprimés et la perméabilité importante de l'enrobage ont permis d'éviter un délai dans la libération du PA (**Figure 40**).

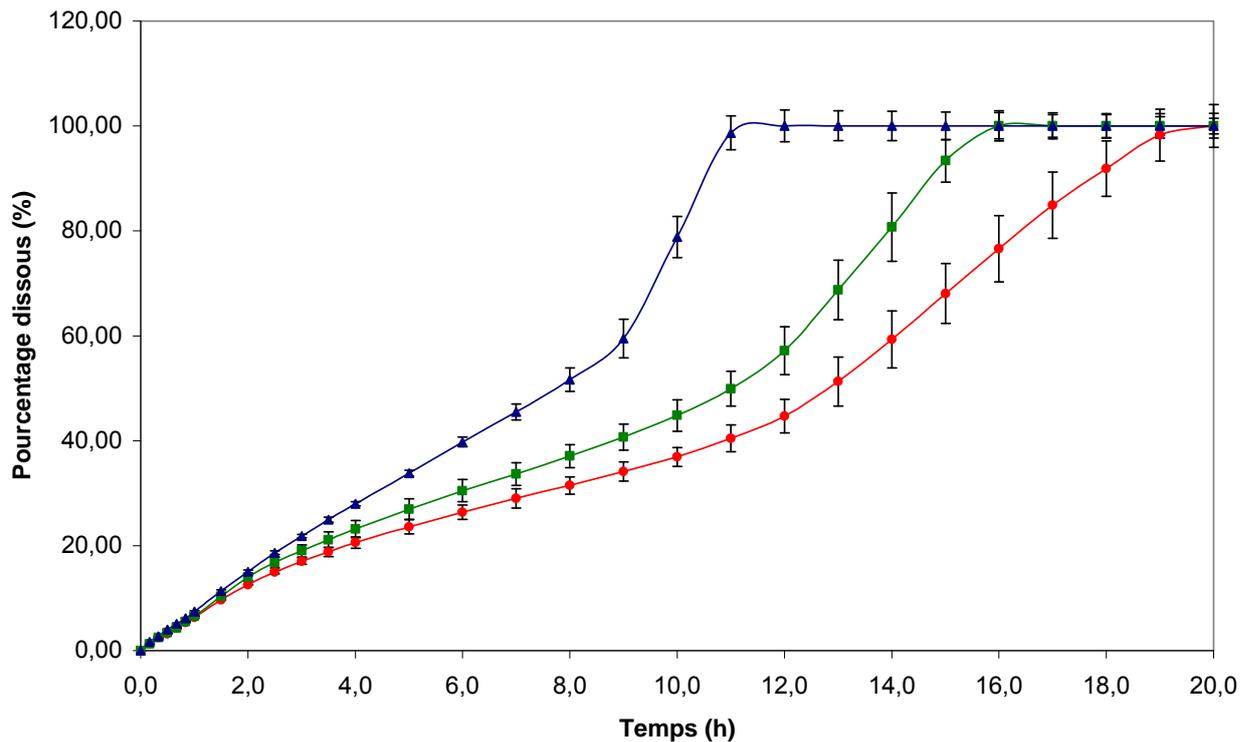


Figure 40 : Profils de dissolution obtenus avec 17% (m/m) (●), 12% (m/m) (■) et 4.1% (m/m) (▲) d'agents effervescents (Type II, pH 3.0 ; 50 rpm) (n=5)

Toutefois, quelle que soit la teneur en agents effervescents, la libération de la levodopa s'est accélérée après 8 heures de test. Des bulles de gaz ont pu être observées à la surface de l'enrobage. Sa teneur ne devait pas être suffisante pour résister aux pressions exercées par le dioxyde de carbone. Après 8 heures de test, la fragilisation de l'enrobage a facilité la diffusion du PA vers le milieu de dissolution.

Comme nous pouvons le constater en observant la **Figure 40**, plus la teneur en agents effervescents est élevée, plus la libération du PA est prolongée. Dès que les mini-comprimés entrent en contact avec le milieu de dissolution, l'eau diffuse à travers le film pour atteindre le noyau, enclenchant ainsi la génération de CO₂.

La distance (h) entre le noyau (N) et le film d'enrobage (E) augmente avec la quantité de dioxyde de carbone produite. L'espace créé entre le noyau et le film d'enrobage sera comblé par le liquide de dissolution (L) et le CO_2 (A) (**Figure 41**). Ainsi, plus la teneur en mélange effervescent sera importante, plus la distance de diffusion sera élevée.

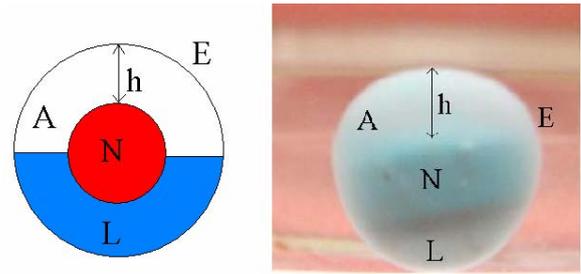


Figure 41 : Schématisation et visualisation d'un MC durant l'essai de dissolution

La quantité de dioxyde de carbone dégagée influence également les propriétés de flottaison des mini-comprimés enrobés (**Figure 42**).

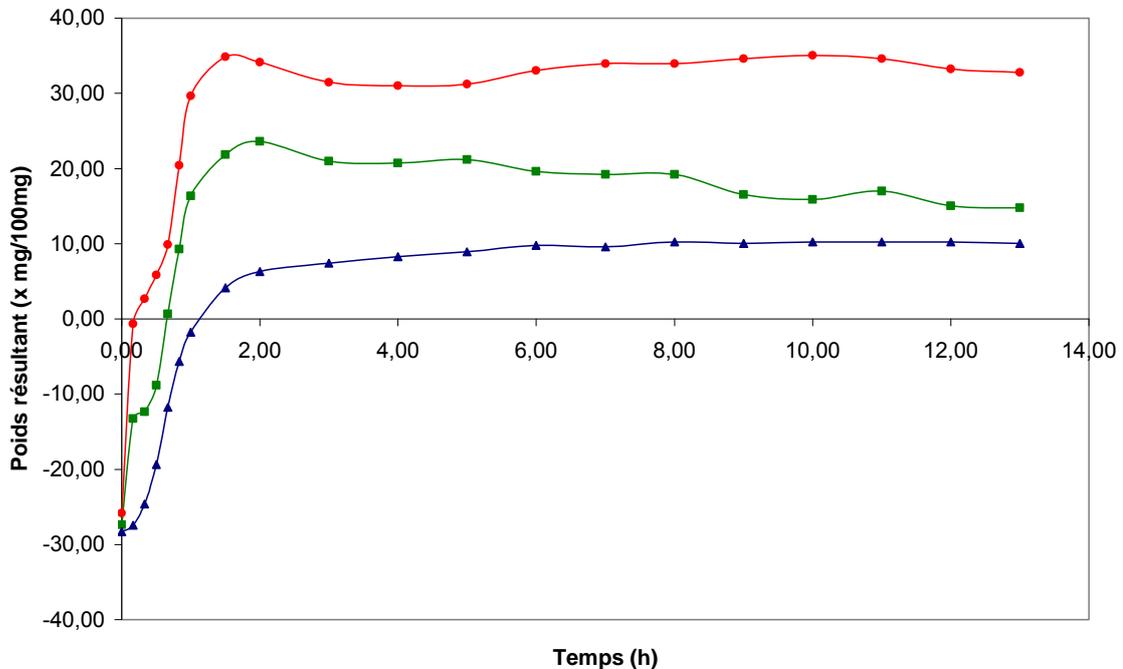


Figure 42 : Profils de flottaison obtenus avec 17% (m/m) (●), 12% (m/m) (■) et 4.1% (m/m) (▲) d'agents effervescents ($n=1$)

Le délai de flottaison a augmenté avec une diminution de la teneur en agents effervescents. À l'inverse, une génération moins importante de dioxyde de carbone réduit le poids résultant maximal et la durée totale de flottaison. À ce stade, les propriétés de flottaison optimales ont donc été obtenues avec 17% (m/m) d'agents effervescents à l'intérieur du noyau.

III.3.2.3. Influence du diamètre sur les propriétés de dissolution et de flottaison

L'influence du diamètre sur les propriétés de dissolution et de flottaison a ensuite été évaluée sur les mini-comprimés contenant 17% de mélange effervescent – *composition C1* – enrobés par F1 (teneur en enrobage = 12% m/m) (Type II ; pH 3.0 ; 50 rpm). Les mini-comprimés de 4 mm ont fourni une libération trop lente de la levodopa. Une façon très simple de l'accélérer était de diminuer le diamètre afin d'augmenter la surface de contact. Quel que soit le diamètre, la libération prolongée de la levodopa s'est déroulée de manière constante pendant les 4 premières heures de test. Le pourcentage de PA dissous s'élevait alors à 27% pour les mini-comprimés de 3 mm au lieu des 20% obtenus avec les 4 mm. Passé ce délai, un changement de pente s'est produit dans le cas des 3 mm. Il a fallu attendre 9 heures pour observer le même phénomène en présence des 4 mm. Lorsque le diamètre est plus grand, le dioxyde de carbone est généré plus progressivement. Les tensions exercées sur le film d'enrobage croissent donc moins rapidement.

Les profils de poids résultant ont montré que le délai de flottaison augmentait avec le diamètre, et donc avec le poids initial des mini-comprimés. De plus, contrairement aux 4 mm, les forces de flottaison des mini-comprimés de 3 mm ont diminué après une période de 5 heures. Un diamètre plus petit fournit une surface de contact plus grande, augmentant ainsi la fragilisation de l'enrobage.

III.3.2.4. Influence de la teneur en enrobage sur les propriétés de dissolution et de flottaison

Comme nous l'avons vu, une teneur en enrobage équivalente à 12% (m/m) ne permettait pas de maintenir l'intégrité de la forme pendant un laps de temps équivalent au temps total de flottaison. L'influence de la teneur en enrobage sur les profils de dissolution a donc été évaluée sur des mini-comprimés C1 de 3 mm enrobés par F1 (**Figure 43**).

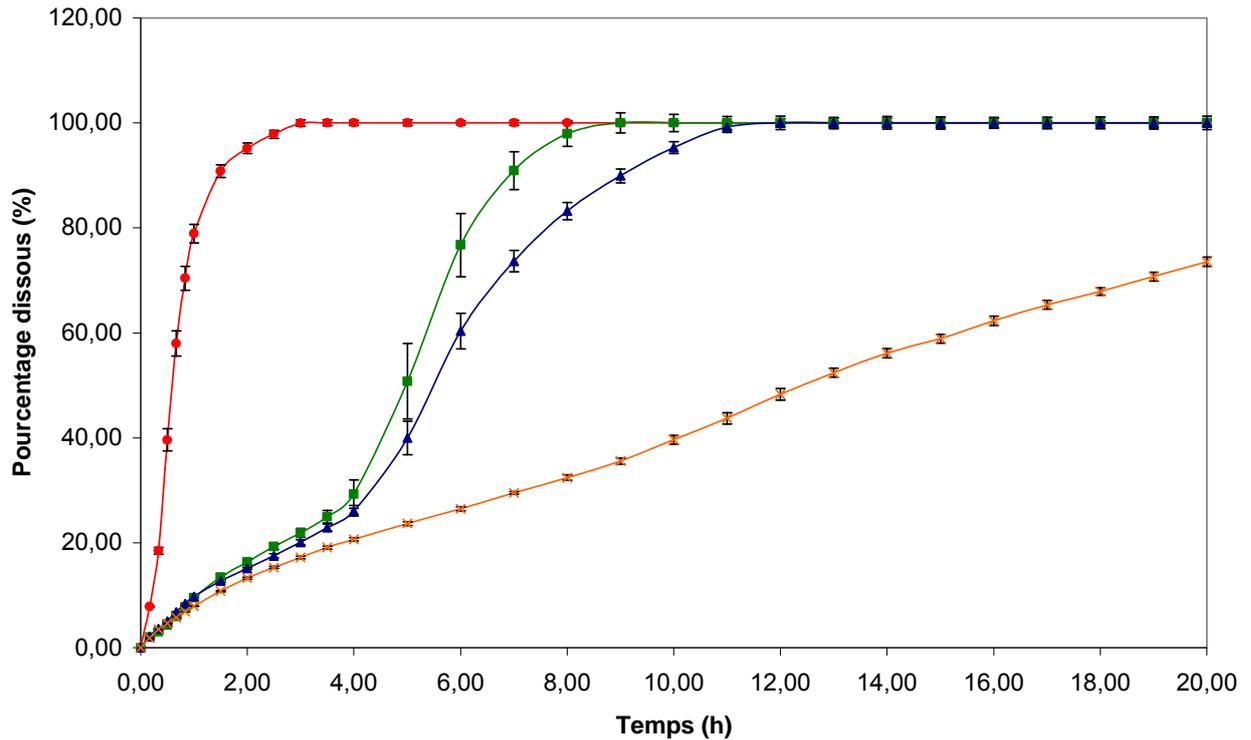


Figure 43 : Influence de la teneur en enrobage - 0% (m/m) (●), 12% (m/m) (■), 15% (m/m) (▲) et 20% (m/m) (×) – sur les profils de dissolution de la levodopa (Type II, pH 3.0 ; 50 rpm) (n=5)

La libération de la levodopa a été ralentie en augmentant la teneur en enrobage. Une épaisseur de membrane plus importante freine la pénétration de l'eau et donc, la dissolution du PA. En l'absence d'enrobage, l'intégrité des mini-comprimés n'a pas été maintenue. L'entièreté du PA a été libérée après 2 heures vu la présence de l'agent liant gras. Seule une teneur en enrobage égale à 20% (m/m) a permis d'obtenir un profil de dissolution homogène. Aucun délai de libération n'a été observé et 75% (m/m) de la dose initiale ont été dissous après 20 heures de test.

Une augmentation de la teneur en enrobage n'a que faiblement affecté les propriétés de flottaison. En effet, le délai de flottaison a atteint 5, 7 et 10 min lorsque le pourcentage déposé s'élevait respectivement à 11, 15 et 20% (m/m). De plus, seule une teneur en enrobage équivalente à 20% (m/m) a permis de conserver une force de flottaison constante pendant 13 heures. Une teneur trop faible a provoqué une fragilisation de la membrane d'enrobage, engendrant une diminution progressive des forces de flottaison.

III.3.2.5. Influence du plastifiant sur les propriétés de dissolution et de flottaison

Les plastifiants sont souvent utilisés pour améliorer les propriétés mécaniques de l'enrobage - *ex. flexibilité*. La rétention du plastifiant à l'intérieur du film dépend principalement de sa solubilité en milieu aqueux, ainsi que de son affinité pour le polymère filmogène. Il a été démontré qu'une proportion plus importante en ammoniums quaternaires - *ex. dans l'Eudragit® RL* - facilitait l'hydratation du film et la solubilisation du plastifiant [Bodmeier et Paeratakul, 1992]. Il a donc semblé utile de comparer les profils de dissolution et de flottaison obtenus en présence d'un plastifiant hydrosoluble - TEC (7g/100ml) - et moins hydrosoluble - ATEC (0,7g/100ml) [Gutiérrez-Rocca et McGinity, 1994]. Tous les tests ont été réalisés sur des mini-comprimés C1 de 3 mm dont la teneur en enrobage a été fixée à 20% (m/m) (Type II ; pH 3.0 ; 50 rpm).

La libération de la levodopa a été plus rapide en présence d'ATEC. En effet, 95% (m/m) de la dose initiale en PA étaient dissous après 20 heures au lieu de 75% (m/m) en utilisant le TEC. La rétention plus importante du dérivé moins hydrosoluble au sein de l'enrobage a permis d'augmenter la diffusivité du PA [Siepmann et col., 1999].

En début de test, l'enrobage étant devenu moins perméable en y incorporant l'ATEC, le délai de flottaison a augmenté de 10 min par rapport à celui obtenu avec le TEC. Toutefois, la rétention de l'ATEC étant plus importante, ce dernier a permis d'augmenter la flexibilité de l'enrobage et donc de réduire la fragilisation de l'enrobage. Le dioxyde de carbone généré est donc resté à l'intérieur de la forme pendant un laps de temps plus long. En effet, après 40 min et pendant plus de 13 heures, les forces de flottaison obtenues après incorporation d'ATEC ont toujours été supérieures à celles observées avec le TEC.

III.3.2.6. Influence de la quantité de PA incorporé dans le noyau sur les propriétés de dissolution et de flottaison

L'incorporation d'une quantité plus importante de PA à l'intérieur de la forme permettrait de réduire le nombre de mini-comprimés à incorporer dans une gélule pour

atteindre le dosage souhaité. Cela permettrait d'augmenter la vitesse de production, de réduire la quantité de diluant, faciliter le remplissage de la gélule et réduire sa taille.

Ainsi, l'influence de la quantité de PA incorporé dans le noyau sur les propriétés de dissolution (Type II ; pH 3.0 ; 50 rpm) et de flottaison a donc été évaluée sur les mini-comprimés de 3 mm – C1, C4, C5 (Tableau 15) – enrobés par F2 (Tableau 13).

Seule la quantité de levodopa incorporée dans le noyau a été modifiée. Les teneurs en agents liant et effervescents sont restées constantes.

Tableau 15 : Composition des noyaux évalués

Composition (% m/m)	C1	C4	C5
Levodopa	37.5	25.0	68.0
Precirol [®] ATO5	12.0	12.0	12.0
CaCO ₃	10.0	10.0	10.0
NaHCO ₃	4.0	4.0	4.0
Acide tartrique	3.0	3.0	3.0
Lactose 450 mesh	33.5	46.0	3.0

Quelle que soit la quantité de levodopa incorporée dans le noyau, une libération prolongée apparaît sans délai, dès le début du test. L'intégrité de l'enrobage a été préservée (pas d'apparition de bulles de gaz en surface). Aucune accélération de libération du PA n'a été observée pendant les 20 heures de test. Toutefois, la libération de la levodopa a été ralentie lorsque la teneur en PA dans le noyau a augmenté de 25 à 68 % (m/m). La diminution du nombre de mini-comprimés nécessaires pour atteindre le dosage désiré a réduit la surface de contact solide-liquide et donc, la vitesse de dissolution du PA.

Les propriétés de flottaison des mini-comprimés – *délai et durée totale de flottaison* - n'ont pas été modifiées en augmentant la teneur en levodopa dans le noyau de 25 à 68 % (m/m). Ceci démontre que seules la quantité de mélange effervescent incorporée dans le noyau, la nature et la teneur en enrobage influencent les propriétés de flottaison de ces mini-comprimés.

III.3.3. Conclusion et perspectives

Des nouveaux mini-comprimés enrobés flottants permettant la libération prolongée de la levodopa ont été développés avec succès. Le système est composé d'un noyau contenant le PA, un mélange effervescent et un agent liant gras. Le noyau est enrobé à l'aide d'un polymère acrylique perméable à l'eau. La libération du PA s'est prolongée sur une période de 20 heures. Les mini-comprimés ont flotté en 20 min et ont conservé leurs propriétés de flottaison pendant plus de 13 heures. Si les profils de dissolution et les propriétés de flottaison sont, à ce stade, très encourageants, il est toutefois nécessaire d'évaluer la robustesse de cette forme. De plus, l'administration des formes flottantes étant conseillée après un repas, les propriétés de flottaison des mini-comprimés se doivent d'être faiblement influencées par le pH. Si nécessaire, la composition du noyau devra être adaptée afin d'obtenir une flottaison similaire quel que soit le pH.

III.4. Evaluation et optimisation des propriétés de flottaison de mini-comprimés flottants contenant de la levodopa et enrobés par un polymère acrylique insoluble

Evaluation and floating enhancement of levodopa sustained-release floating minitablets coated with insoluble acrylic polymer

Drug Development and Industrial Pharmacy, (sous presse)

Publications : Article 4

III.4.1. Introduction

Lors de l'étude précédente, des mini-comprimés enrobés flottants ont été développés. Ils étaient composés d'un noyau de 3 mm constitué de granulés fabriqués par granulation thermoplastique. Les granulés contenaient le PA, un mélange effervescent et un agent liant gras. Le noyau était enrobé à l'aide d'un polymère acrylique capable de ralentir la libération de la levodopa pendant plus de 20 heures. Un agent plastifiant peu hydrosoluble - l'ATEC - a permis d'obtenir un film élastique résistant aux tensions engendrées par la génération du dioxyde de carbone. En effet, en appliquant une teneur équivalente à 20% (m/m) d'enrobage autour du noyau, les mini-comprimés ont flotté en 20 min et ont conservé leurs propriétés de flottaison pendant plus de 13 heures.

Cette partie du travail avait pour but d'étudier l'influence de certains paramètres de dissolution sur la libération de la levodopa afin d'évaluer la robustesse de la forme flottante constituée de mini-comprimés enrobés. De plus, les profils de poids résultant ont été relevés à pH 1.5 et 3.0 afin d'évaluer l'influence du pH stomacal sur les propriétés de flottaison. Ces valeurs de pH sont similaires au pH stomacal à jeun et après repas, respectivement. Or, comme une forme flottante doit être prise préférentiellement après repas, il sera nécessaire d'obtenir une flottaison similaire quelle que soit la valeur du pH.

III.4.2. Résultats et discussion

III.4.2.1. Influence de la mise en gélule sur le profil de dissolution de la levodopa

Des tensions, résultant de la génération du dioxyde de carbone, peuvent apparaître entre les mini-comprimés enrobés lorsque ces derniers sont confinés dans une gélule. En effet, la distorsion du film d'enrobage sous la pression du gaz peut engendrer des fragilisations - *ex. fissures, cassures* - responsables de variabilité et d'une diminution de l'aptitude de la forme à maintenir une libération soutenue. Comme ce phénomène apparaît de façon aléatoire, il peut être visualisé *in vitro* par l'augmentation des déviations standards et l'apparition d'un changement de vitesse de libération au niveau du profil de dissolution.

Un agent désintégrant - Ac-Di-Sol® - a été incorporé dans la gélule pour faciliter la dispersion des mini-comprimés.

Les essais de dissolution (Type II, pH 3.0 ; 50 rpm) ont été réalisés sur des mini-comprimés C1 de 3 mm, enrobés par F1 (**Tableau 16**). Ces mini-comprimés ont été incorporés dans une gélule 0 en gélatine, contenant ou non de l'Ac-Di-Sol®.

Tableau 16 : Composition et caractéristiques physiques des MC investigués – Formulation de la dispersion d'enrobage

Composition (% m/m)	C1	C2	C3	C4
Levodopa	37.5	37.5	37.5	37.5
Precirol® ATO5	12.0	12.0	12.0	12.0
CaCO ₃	10.0	10.0	10.0	10.0
NaHCO ₃	4.0	4.0	4.0	4.0
Acide tartrique	3.0	7.0	10.0	15.0
Lactose 450 mesh	33.5	29.5	26.5	21.5
Diamètre (mm)	3			
Masse (mg)	20			
Force de compression (N)	50-100			
<hr/>				
Formulation de l'enrobage (g)	F1			
Eudragit® RL30D (sec)	200			
ATEC	40			
Talc	50			
Lactose	20			
Anti-mousse	2			
Eau	842			
Matière sèche (% m/m)	25.6			
Teneur en enrobage (% m/m)	20			

Aucun délai dans la libération du PA n'est apparu, même en l'absence d'agent désintégrant dans la gélule. Il a été visuellement observé que la gélule s'est ouverte après 1 à 2 minutes et s'est complètement dissoute endéans 10 minutes. Les mini-comprimés enrobés se sont alors entièrement dispersés et ont acquis des propriétés de flottaison en 20 minutes. Tant en présence ou en l'absence d'agent désintégrant dans la gélule, aucune augmentation des déviations standards, ni aucune modification du profil de dissolution n'a été observée.

III.4.2.2. Effet du pH sur le profil de dissolution de la levodopa

La levodopa, caractérisée par 4 constantes de dissociation - $pK_a = 2.3, 8.7, 9.7 \text{ et } 13.4$ - présente une solubilité pH-dépendante. Son profil de dissolution a donc été relevé à pH 1.5, 3.0 et 6.5. Les essais de dissolution (Type II ; 50 rpm) ont été réalisés sur des mini-comprimés C1 de 3 mm enrobé par F1 (**Tableau 16**).

La solubilité pH-dépendante de la levodopa a engendré une libération plus rapide à pH 1.5. En effet, après seulement 8 heures de test, les courbes n'étaient plus statistiquement similaires - *ex. $f_2(1.5-6.5)=43.1$* . A l'inverse, les profils de dissolution obtenus à pH 3.0 et 6.5 sont restés statistiquement similaires pendant 20 heures ($f_2=89.1$). L'enrobage n'a donc pas été capable d'annihiler la solubilité pH-dépendante de la levodopa. Toutefois, une forme flottante devant être administrée après repas pour optimiser sa rétention, les mini-comprimés enrobés semblent pouvoir fournir une libération constante en PA de l'estomac - *après repas* - à l'intestin.

III.4.2.3. Effet de la vitesse de rotation des pales sur le profil de dissolution de la levodopa

Selon l'équation de Noyes-Whitney, la vitesse de dissolution d'une substance active à partir d'une forme solide est influencée par des variations d'agitation [**Fukunaka et col., 2006**]. Ainsi, la susceptibilité d'une forme à libération prolongée à modifier ses propriétés de rétention en fonction de la vitesse d'agitation des pales peut être considérée comme une indication de la robustesse de la formulation.

Les essais de dissolution (USP type II ; pH 3.0 ; 50-75-100 rpm ; n=5) ont été réalisés sur des mini-comprimés C1 de 3 mm enrobés par F1 (**Tableau 16**). Conformément à l'équation de Noyes-Whitney, la levodopa s'est libérée plus rapidement lorsque la vitesse d'agitation était augmentée. Toutefois, toutes les courbes sont restées statistiquement similaires - *ex. $f_2(50-100rpm)=85.5$* - quelle que soit la vitesse d'agitation. De plus, indépendamment des conditions appliquées, l'intégrité de l'enrobage a été maintenue pendant toute la durée du test, évitant ainsi un burst effect ou une libération bimodale - *lente puis rapide* - de la levodopa.

III.4.2.4. Influence du pH sur les propriétés de flottaison

L'influence du pH sur le délai de flottaison a ensuite été évaluée à pH 1.2 (HCl 0.1 N) et pH 3.0 (tampons phosphate 0.05 M) sur des mini-comprimés de 3 mm enrobés par F1.

Plus le pourcentage en acide tartrique était petit, plus la différence de délai obtenu à pH 1.2 et pH 3.0 était importante (**Tableau 17**). A pH 3.0, de faibles teneurs en acide tartrique n'ont pas permis la génération rapide du dioxyde de carbone. Ainsi, son pourcentage a dû être augmenté de 3% (m/m) à 15% (m/m) pour obtenir des valeurs de délai de flottaison équivalentes aux 2 valeurs de pH.

Tableau 17 : Influence du pH sur le délai de flottaison (n=3)

Compositions	Acide tartrique (% m/m)	pH	Délai de flottaison (min)
C1	3	1.2	10 ± 2
		3.0	80 ± 15
C2	7	1.2	10 ± 2
		3.0	60 ± 13
C3	10	1.2	10 ± 1
		3.0	40 ± 8
C4	15	1.2	7 ± 1
		3.0	8 ± 2

En incorporant 15% (m/m) d'acide tartrique à l'intérieur du noyau, les mini-comprimés ont flotté en 10 min et pendant plus de 13 heures, quel que soit le pH. Même si les poussées ont été moins importantes en augmentant le

pH (PR_{max} à pH 1.2 = 80mg/100mg *vs.* 40 mg/100mg à pH 3.0), les mini-comprimés ont présenté une flottaison stable et supérieure à celle obtenue avec des microbilles flottantes [Hamdani et col., 2006].

III.4.3. Conclusion et perspectives

Des nouveaux mini-comprimés enrobés flottants libérant la levodopa de façon prolongée avaient été développés précédemment. Leurs propriétés de flottaison ont maintenant été améliorées. Les mini-comprimés ont flotté en 10 min et pendant plus de 13 heures, à pH 1.2 et pH 3.0.

La robustesse des mini-comprimés à des variations d'agitation a également été évaluée et démontrée. Si l'enrobage n'a pas supprimé la solubilité pH-dépendante de la levodopa, les mini-comprimés semblent être en mesure de fournir une libération constante du PA en passant d'un pH 3.0 à un pH de 6.5.

Deux nouvelles formes de mini-comprimés flottants – *matricielles et enrobées* – ayant maintenant été développées et optimisées, il devient intéressant de les tester en y incorporant d'autre PA. De plus, une étude pharmacoscintigraphique devra être réalisée afin de compléter les résultats obtenus *in vitro*.

III.5. Evaluation *in vitro* de deux concepts de mini-comprimés flottants à libération prolongée en fonction du principe actif incorporé

In vitro evaluation of two concepts of sustained release floating minitablets according to the model drug used

Journal of Drug Delivery Science and Technology 18 (2008) 133-138

Publications : Article 5

III.5.1. Introduction

Précédemment, deux nouvelles formes de mini-comprimés flottants à libération prolongée ont été développées et évaluées. La levodopa a été principalement utilisée comme modèle de PA hydrosoluble. Etant caractérisée par une fenêtre d'absorption étroite au niveau du duodénum et par un court temps de demi-vie plasmatique, la levodopa constituait un candidat intéressant pouvant être incorporé dans une forme à rétention gastrique. Quelle que soit la formulation, les mini-comprimés contenaient un PA, un agent liant gras et un mélange effervescent. La première forme développée renfermait un agent gélifiant cellulosique capable de retenir le dioxyde de carbone généré tout en assurant la libération prolongée du PA. Dans le second système, l'agent matriciel hydrophile a été écarté. Un enrobage flexible a alors permis de conserver le dioxyde de carbone à l'intérieur de la forme. Insoluble dans l'eau, il a été capable de prolonger la libération de la levodopa pendant plus de 20 heures. Quelle que soit la technologie, les mini-comprimés ont flotté en moins de 10 min et pendant plus de 13 heures.

Toutefois, en incorporant le même PA dans les mêmes conditions, les profils de dissolution et de flottaison obtenus avec les 2 systèmes étaient différents. En effet, les mécanismes de libération du PA (ou d'un gaz) à partir d'une forme matricielle sont principalement l'érosion et la diffusion [Kill et Dam-Johansen, 2003], tandis que seule la diffusion caractérise une forme enrobée [Siepmann et col., 1999].

Dans cette partie du travail, la levodopa et la ciprofloxacine ont été utilisées comme modèles de PA. L'influence des propriétés physico-chimiques de ces deux molécules sur les profils de dissolution et de flottaison a donc été évaluée pour les deux concepts de mini-comprimés flottants.

La ciprofloxacine (**Figure 44**) possède une masse moléculaire plus élevée que la levodopa - $M_r = 331,37$ vs $197,19$ [Anadon et col., 2001]. Les 2 molécules sont caractérisées par une solubilité pH-dépendante et une fenêtre de résorption étroite au niveau du duodénum [Ross et Riley, 1990 ; Firestone et col., 1998 ; Louie-Helm et col., 2001].

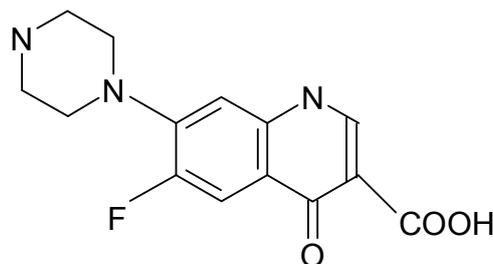


Figure 44 : Formule développée de la ciprofloxacine

La ciprofloxacine est une fluoroquinolone synthétique de 3^{ème} génération [Désévaux et col., 2002]. Administrée oralement, elle est active sur une large variété de bactéries gram positif et gram négatif [Nagaralli et col., 2002]. Les infections bactériennes représentent une des principales sources de mortalité à travers le monde [Mao et col., 2005]. Les fluoroquinolones, et spécialement la ciprofloxacine, constituent un traitement de choix des infections nosocomiales - ex. *Staphylococcus aureus* ou *Enterobacteriaceae* [Tomisic et col., 2002]. Ces infections nécessitant généralement une longue antibiothérapie, une forme présentant une rétention gastrique accrue capable de libérer de façon prolongée la ciprofloxacine constitue une stratégie très intéressante pour améliorer la thérapeutique.

Le but de cette étude est de démontrer, que l'apport technologique des mini-comprimés flottants n'annihile pas l'effet des propriétés physicochimiques du PA incorporé qui influencent à la fois les propriétés de dissolution et de flottaison. Ainsi, il sera souvent nécessaire d'adapter la composition de la forme en fonction du PA incorporé (**Tableaux 18 et 19**). De plus, pour les PA fortement dosés, il sera nécessaire d'augmenter leur teneur à l'intérieur du noyau afin de réduire au maximum le nombre de mini-comprimés devant être introduits dans la gélule. En effet, plus le nombre de mini-comprimés à incorporer augmente, plus la taille de la gélule doit être élevée, ce qui réduit la compliance du patient vu la difficulté à l'avaler.

Tableau 18 : Composition des MC évalués

Composition (% m/m)	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Levodopa	37.5	37.5	-	-	-	-
Ciprofloxacine	-	-	31.25	49.0	54.0	53.0
Precirol [®] ATO5	12.0	12.0	18.0	18.0	18.0	18.0
Méthocel [®] K15M	25.0	-	25.0	20.0	15.0	-
CaCO ₃	10.0	10.0	10.0	5.0	5.0	10.0
NaHCO ₃	4.0	4.0	4.0	5.0	5.0	4.0
Acide tartrique	3.0	15.0	3.0	3.0	3.0	15.0
Lactose 450 mesh	8.5	21.5	8.75	-	-	-
Diamètre (mm)	3					
Masse (mg)	20					
Force de compression (N)	50-100					
Dureté (N)	5 ± 1					

Tableau 19 : Composition des dispersions d'enrobage évaluées

Formulation (g)	F1	F2	F3
Eudragit [®] RL30D (sec)	200	200	200
Ciprofloxacine	-	10	20
Lactose	20	-	-
ATEC	40	40	40
Talc	50	50	50
Agent anti-mousse	2	2	2
Eau	888	898	888
Matière sèche (% m/m)	26	25	26
Teneur en enrobage (% m/m)	20	20	20

III.5.2. Résultats et discussion

III.5.2.1. Retard de libération

Les profils de dissolution de la levodopa et de la ciprofloxacine obtenus à partir des mini-comprimés enrobés – C2 et C6, respectivement - ont d'abord été relevés (Type II ; pH 3.0 ; 50 rpm).

La libération de la levodopa – C2, F1 - a été soutenue dès les premières minutes de test. Aucun retard de libération – *temps de latence* - n'a été observé.

A l'inverse, dans les mêmes conditions de dissolution, la libération de la ciprofloxacine a été retardée d'une heure lorsque le noyau C6 a été enrobé par F1 et F2 (**Figure 45**). Afin d'éviter ce retard de libération, 10% (m/m) de ciprofloxacine ont dû être introduits dans la composition de l'enrobage (F3).

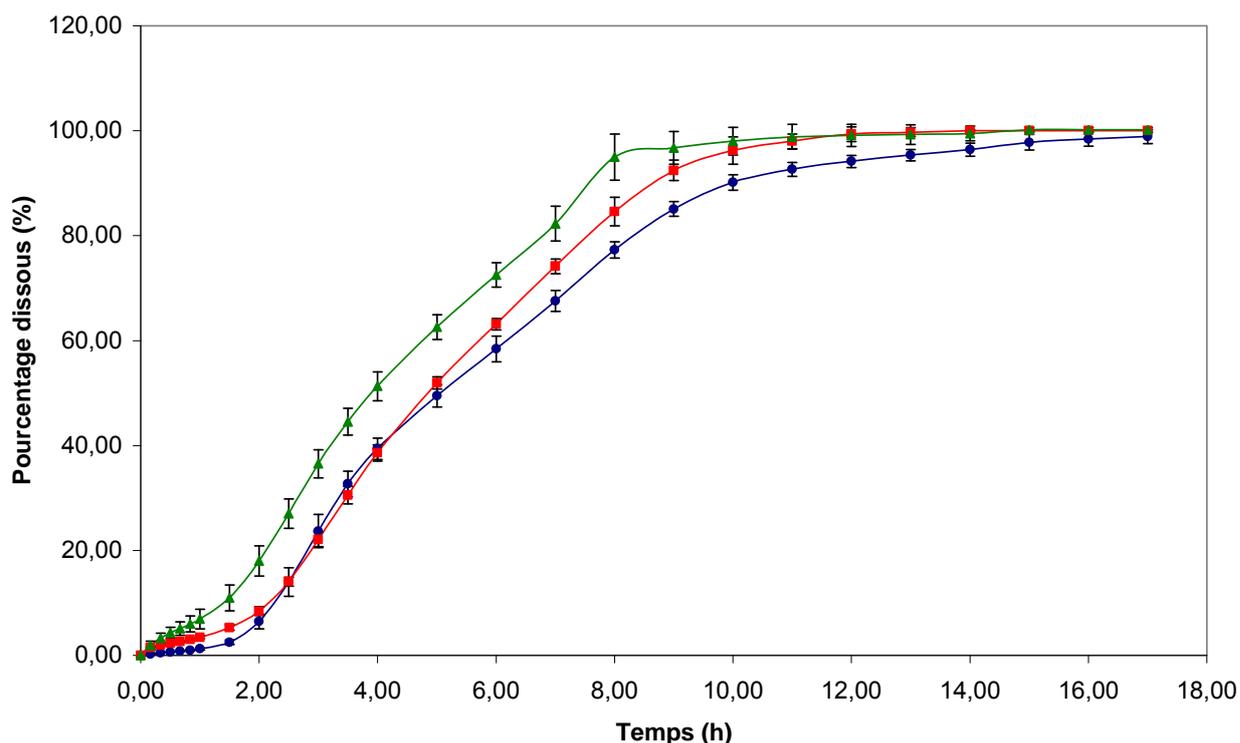


Figure 45 : Influence de l'incorporation de ciprofloxacine (% par rapport à l'agent filmogène) dans l'enrobage sur son profil de dissolution à partir de MC enrobés composés du noyau C6 et des enrobages F1=0% (m/m) (●), F2 =5% (m/m) (■) et F3 =10% (m/m) (▲) (Type II ; pH 3.0 ; 50 rpm) (n=5)

En effet, lorsque la ciprofloxacine ne se trouve pas dans l'enrobage seulement 1% (m/m) de la dose s'est dissous endéans l'heure. Comme la composition de l'enrobage et le diamètre des mini-comprimés contenant la ciprofloxacine étaient similaires à ceux renfermant la levodopa, ce retard de libération ne pouvait dépendre que de la structure de la molécule. La diffusion d'une substance à travers une membrane dépend de la taille et de la masse moléculaire de la substance considérée. La facilité avec laquelle cette dernière passera à traverser le film diminue lorsque sa taille et son poids moléculaire augmentent [Ansari et col., 2006]. En incorporant 5% (m/m) de ciprofloxacine dans l'enrobage (par rapport à l'agent filmogène), seulement 3% (m/m) de la dose initiale se sont dissous après 1 heure. Le retard de libération n'a pu être supprimé qu'en ajoutant 10% (m/m) de ciprofloxacine dans l'enrobage.

Les mini-comprimés matriciels contenant de l'HPMC - C1 et C3 - n'ont pas posé ce type de problème. Les profils de dissolution n'ont montré aucun retard de libération quelle que soit la molécule incorporée. Il semble donc que, dans ce cas, la vitesse de libération d'un PA dépende plus des capacités de rétention de l'agent gélifiant que de la taille ou du poids moléculaire de la molécule.

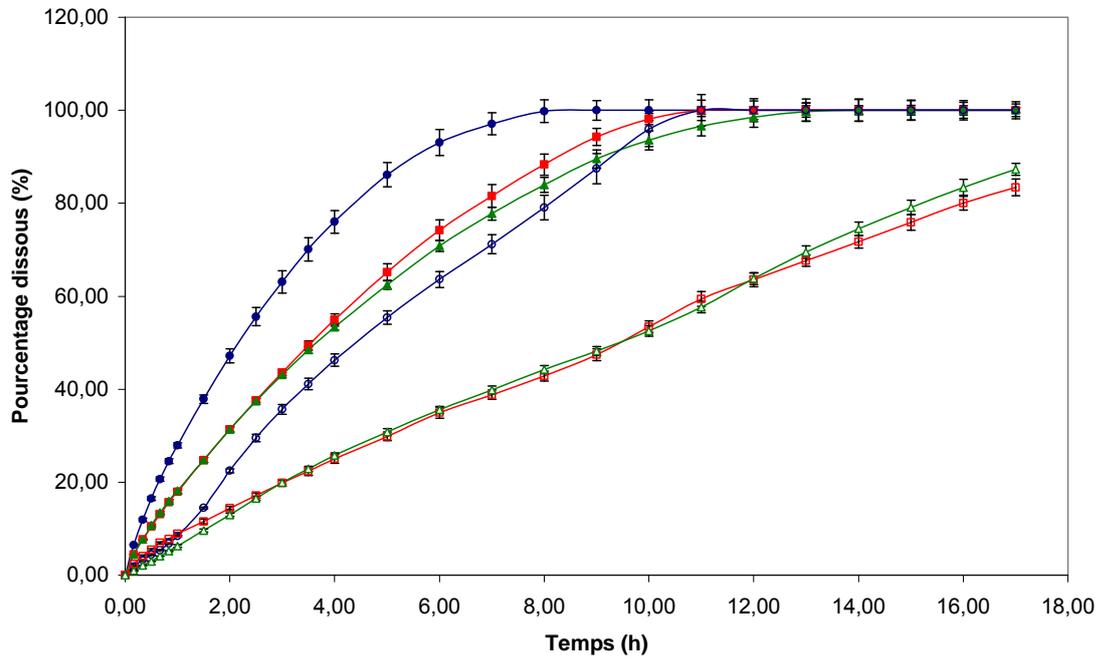
III.5.2.2. Influence du pH sur la dissolution du PA

La levodopa et la ciprofloxacine sont caractérisées par 4 pKa - 2.3, 8.7, 9.7, 13.4 [Clarke, 1986] - et 2 pKa - 6.01, 8.73 [Vilches et col., 2002] - respectivement. Comme elles possèdent donc une solubilité pH-dépendante, leurs profils de dissolution ont été relevés à pH 1.5, 3.0 et 6.5 (Type II ; 50 rpm) à partir des mini-comprimés matriciels et enrobés.

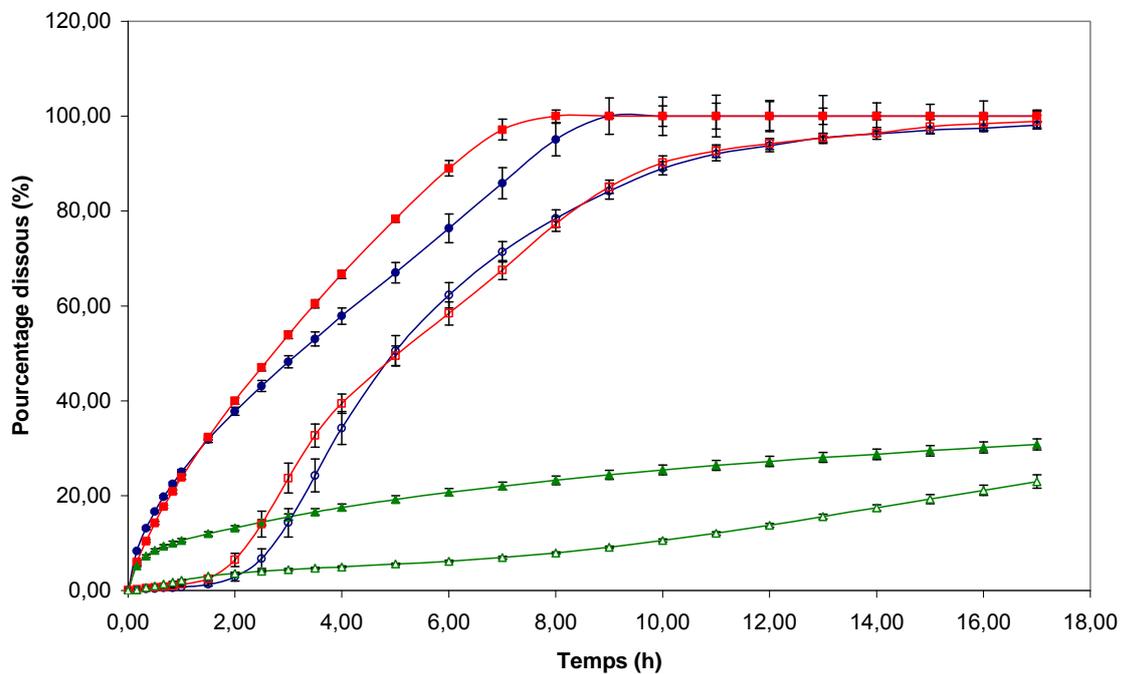
Les mini-comprimés matriciels contenant la levodopa étaient composés de C1, alors que ceux renfermant la ciprofloxacine étaient constitués par C3 (Tableau 18). Le noyau des mini-comprimés enrobés contenant la levodopa étaient composés de C2 et enrobés par F1. Ceux contenant la ciprofloxacine étaient constitués par C6 et enrobés par F1 (Tableaux 19).

Il a été démontré que l'allure des profils de dissolution des 2 PA dépendait plus de leur solubilité pH-dépendante que de la forme testée. En effet, ni les mini-comprimés matriciels, ni les mini-comprimés enrobés n'ont été en mesure d'annihiler l'effet de la solubilité pH-dépendante des 2 PA (Figure 46). En accord avec les mécanismes de

libération relatifs aux formes matricielles et enrobées, pour un même pH, les 2 PA se sont libérés plus rapidement à partir des mini-comprimés contenant l'HPMC.



(a)



(b)

Figure 46 : Profils de dissolution de la levodopa (a) et la ciprofloxacin (b) à partir des MC matriciels à pH 1.5 (●), 3.0 (■) et 6.5 (▲), et des MC enrobés à pH 1.5 (○), 3.0 (□) et 6.5 (△) (n=5)

La valeur du pH n'a pas eu d'influence sur le délai de libération de la ciprofloxacine à partir des mini-comprimés enrobés. Il semble donc que la libération de la ciprofloxacine à partir de ces mini-comprimés dépende plus de sa taille et de son poids moléculaire que de sa solubilité pH-dépendante. En effet, dans les mêmes conditions de dissolution, aucun délai de libération n'a été observé lorsque la levodopa a été incorporée dans les mini-comprimés enrobés.

III.5.2.3. Evaluation des propriétés de flottaison

Mini-comprimés non enrobés

Les mini-comprimés non enrobés ont flotté en 10 min et pendant plus de 13 heures quelle que soit la molécule incorporée. Toutefois, le poids résultant maximal a été obtenu plus vite et était supérieur lorsque les mini-comprimés contenaient de la ciprofloxacine que de la levodopa. La poussée a également été plus importante durant toute la durée du test. La molécule incorporée influence donc les propriétés de flottaison des mini-comprimés non enrobés. Ici, ce phénomène peut être expliqué par la solubilité plus importante de la ciprofloxacine par rapport à la levodopa à pH 1.5 - 8.3 *g/l vs 760 mg/l* (valeurs mesurées expérimentalement). Cette solubilité plus importante peut avoir favorisé la génération du dioxyde de carbone, engendrant des valeurs de poids résultant plus importantes.

Mini-comprimés enrobés

Comme observé avec les mini-comprimés matriciels, la molécule incorporée influence la flottaison des mini-comprimés enrobés. En effet, même si les délais de flottaison étaient similaires, les forces de flottaison obtenues avec les mini-comprimés contenant de la ciprofloxacine sont restées supérieures à celles observées avec la levodopa - ex. la poussée maximale obtenue avec les mini-comprimés enrobés contenant la ciprofloxacine a atteint 165 mg/100 mg, alors que celle relevée avec les mini-comprimés enrobés contenant la levodopa n'a pas dépassé 95 mg/100 mg.

Les mini-comprimés enrobés dont le noyau est composé par C6 (**Tableau 18**) ont flotté en 10 min quel que soit le pourcentage de ciprofloxacine contenu dans l'enrobage.

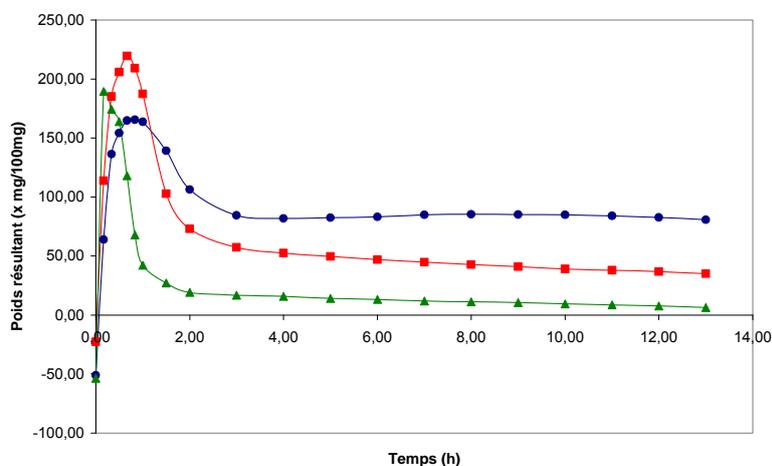


Figure 47 : Profils de poids résultant en fonction de la quantité - 0% (m/m) (●), 5% (m/m) (■), 10% (m/m) (▲) de ciprofloxacine incorporée dans l'enrobage (n=1).

Toutefois, les valeurs de poids résultant obtenues après 2 heures de test ont diminué avec la quantité de PA incorporée (**Figure 47**).

Le fait d'introduire une plus large molécule comme la ciprofloxacine (*vs. levodopa*) dans la composition de l'enrobage semble avoir facilité la diffusion du dioxyde de carbone à travers l'enrobage.

III.5.3. Conclusion et perspectives

Cette étude a démontré qu'un retard de libération peut survenir lorsque les mini-comprimés enrobés contiennent une plus grande molécule caractérisée par un poids moléculaire plus important (*ciprofloxacine vs. levodopa*). A l'inverse, les profils de dissolution obtenus à partir des mini-comprimés matriciels contenant de l'HPMC ne sont pas influencés par la taille moléculaire de la substance incorporée (*ciprofloxacine vs. levodopa*). De plus, ni l'agent gélifiant, ni l'enrobage ne sont capables de supprimer l'effet de la solubilité pH-dépendante du PA. Les valeurs de poids résultant obtenus à partir des mini-comprimés enrobés et non enrobés sont largement influencées par le PA incorporé.

Ainsi, il a été démontré que les propriétés physico-chimiques, ainsi que le dosage d'un PA donné influencent les propriétés de dissolution et de flottaison des mini-comprimés enrobés et matriciels. Il est donc important d'effectuer un développement particulier pour chaque PA afin d'optimiser l'efficacité de rétention et de flottaison des mini-comprimés.

III.6. Etude scintigraphique et pharmacocinétique sur
volontaires sains de mini-comprimés flottants à
libération prolongée contenant de la levodopa et de la
carbidopa

Pharmacoscintigraphic and pharmacokinetic
evaluations on healthy human volunteers of
sustained-release floating minitablets containing
levodopa and carbidopa

International Journal of Pharmaceutics, Soumis

Publications : Articles 6

Annexes : 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 et 11

III.6.1. Introduction

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative, caractérisée par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la *pars compacta* de la substance noire, responsable d'un déficit dopaminergique au sein du striatum [Monville et col., 2005]. La perte des neurones dopaminergiques, associée à une diminution de l'activité dopaminergique des neurones striataux, engendre des dysfonctionnements physiques et mentaux [Forte et col., 2005]. Il s'agit de la deuxième maladie neurodégénérative la plus importante au monde après la maladie d'Alzheimer. Elle possède une distribution mondiale et affecte autant les hommes que les femmes. Sa prévalence varie entre 1 et 2% chez les personnes âgées de plus de 50 ans [Sharstry, 2001]. Les symptômes majeurs de la maladie de Parkinson comprennent une akinésie, une rigidité plastique et des tremblements au repos. Au cours de son évolution, apparaissent des troubles cognitifs, de la marche et de la stabilité posturale [Fraix, 2004].

La maladie de Parkinson est l'une des rares atteintes dégénératives du système nerveux central à être accessible à la thérapeutique médicamenteuse. Toutefois, il est impossible de traiter les patients en leur administrant de la dopamine car cette dernière ne passe pas la barrière hémato-encéphalique [Kordower, 1999]. Cette découverte a favorisé l'utilisation de levodopa, un précurseur de la dopamine capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, pour augmenter la réponse dopaminergique au niveau synaptique [Monville et col., 2005]. Après avoir franchi la barrière, la levodopa se stocke dans les neurones cérébraux où elle est décarboxylée en dopamine [Zhang et col., 2001].

Après 5 années de traitement à base de levodopa, des dyskinésies apparaissent chez 70% des patients traités [Mardsen et Parkes, 1977]. Ces complications sont largement favorisées par des stimulations pulsatiles des récepteurs dopaminergiques [Bezard et col., 2001]. En effet, à cause de son court temps de demi-vie plasmatique, les concentrations plasmatiques en levodopa augmentent et diminuent rapidement après administration, entraînant une oscillation de la réponse thérapeutique [Stocchi et col., 1994]. L'association de la levodopa à des inhibiteurs de décarboxylases périphériques - *bensérazide et carbidopa* - a multiplié la biodisponibilité cérébrale de la levodopa par 10, ce

qui a permis de réduire la fréquence d'administration et donc, l'oscillation des concentrations plasmatiques [Pinder et col., 1976 ; Mardsen et Parkes, 1977]. De plus, l'inhibition des décarboxylases périphériques empêche la conversion de la levodopa en dopamine, réduisant ainsi la sévérité des effets secondaires périphériques [Duvoisin, 1974].

En ayant conscience qu'une relation existe entre les concentrations plasmatiques, les effets cliniques de la levodopa et le développement des effets « on-off », l'efficacité thérapeutique peut être augmentée en développant des formes pharmaceutiques fournissant une libération prolongée en levodopa. En réduisant les effets de pics et vallées obtenus après administration d'une forme à libération immédiate, les formes à libération prolongée stabilisent mieux les teneurs plasmatiques en levodopa [Crevoisier et col., 1987]. De plus, la levodopa étant caractérisée par une fenêtre d'absorption étroite au niveau du duodénum, de développement de formes à libération prolongée possédant un temps de résidence accru semble spécialement indiqué [Hoffman et Stepensky, 1999].

Précédemment, deux nouveaux concepts de mini-comprimés flottants à libération prolongée – *matriciels et enrobés*- ont été développés. La première forme renfermait un agent gélifiant cellulosique capable de retenir le dioxyde de carbone formé tout en assurant la libération prolongée du PA. Dans le second système, un enrobage flexible maintenait le gaz à l'intérieur de la forme et régula la diffusion de la levodopa [Goole et col., 2007, 2008a].

Afin de vérifier les résultats prometteurs obtenus *in vitro*, des études pharmacoscintigraphique et pharmacocinétique ont été réalisées sur les mini-comprimés matriciels et enrobés contenant une association de levodopa et de carbidopa (**Tableau 20**). Le but de cette investigation était de comparer les profils pharmacocinétiques de la levodopa et des inhibiteurs de décarboxylases périphériques obtenus à partir des mini-comprimés avec ceux obtenus après administration de la spécialité commerciale Prolopa® HBS 125.

Une étude pharmacoscintigraphique a également été réalisée afin d'évaluer le temps de résidence gastrique des 3 formes flottantes. L'indium-111, un radioisotope

possédant une temps de décroissance relativement long, a été sélectionné pour visualiser les formes dans l'estomac.

Tableau 20 : Composition et caractéristiques des MC matriciels (Levo-Form 1) et enrobés (Levo-Form 2)

Formulation (% m/m)	MC matriciels	MC enrobés	Dispersion d'enrobage (g)	
Levodopa	25.00	25.00		
Carbidopa	6.25	6.25	Eudragit® RL30D (sec)	200
Precirol® ATO5	12.00	12.00	Lactose	20
Méthocel® K15M	25.00	-	ATEC	40
CaCO ₃	10.00	10.00	Talc	50
NaHCO ₃	4.00	4.00	Anti-mousse	2
Acide tartrique	3.00	15.00	Eau	ad 1600
Lactose	14.75	27.75		
			Teneur en enrobage	20% (m/m)
Diamètre	3 mm			
			Nombre de MC dans une gélule n°0	20
Masse	20 mg			
Force de compression	50 – 100 N			
Dureté	9 ± 2 N		Teneur en levodopa en carbidopa	100 mg 25 mg

Protocole de l'étude

L'étude a été réalisée de manière randomisée, en simple aveugle et en cross-over chez 10 volontaires sains (4 hommes et 6 femmes ; 25 ± 5 ans). Ces derniers ont tous été reçus et examinés par le médecin responsable avant d'être enrôlés dans l'étude. La nature de cette dernière leur a été expliquée et un consentement éclairé écrit a dû être obtenu pour chacun des volontaires. L'étude s'est déroulée en 3 sessions (espacées d'une période de wash-out d'au moins 6 jours) à l'hôpital Erasme de Bruxelles, en accord avec les principes de la déclaration d'Helsinki et l'autorisation du comité d'Ethique de l'hôpital Erasme (Ref. : P2007/086) et du ministère belge des affaires sociales et de la santé publique (Ref. : EudraCT n° 2007-000708-33). Les volontaires ont été répartis en 2 groupes, assignés de manière aléatoire à chacune des 3 périodes. Chaque volontaire a reçu le traitement consistant soit en une gélule contenant les mini-comprimés - *matriciels ou enrobés* - ou en une gélule matricielle flottante à libération prolongée Prolopa® HBS 125 (Tableau 21).

Tableau 21 : Plan de l'étude

SUJETS	PERIODE I Jour 1	PERIODE II Jours 9	PERIODE III Jours 17
1,2,3,4,5	T 1	T 2	T 3
6,7,8,9,10	T 2	T 3	T 1

T 1 = Traitement 1 = Prolopa® HBS 125

T 2 = Traitement 2 = Mini-comprimés matriciels

T 3 = Traitement 3 = Mini-comprimés enrobés

La quantité d'indium-111 (^{111}In) a été ajustée de façon à ce que la dose radioactive maximale ingérée par chaque sujet lors d'une journée d'étude ne dépasse pas 500 μCi .

La quantité de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ injecté en intra-veineux équivalait à 3 mCi.

III.6.2. Résultats et discussion

III.6.2.1. Essais *in vitro*

Les essais *in vitro* ont eu pour but de prouver que l'incorporation de la résine échangeuse de cations ne modifiait ni la teneur, ni l'allure des profils de dissolution des différents PA. De même, il a été démontré que son incorporation n'altérerait pas les propriétés de flottaison - *délai, poids résultant, durée totale de flottaison* - des 3 formes flottantes testées.

Teneur en levodopa, carbidopa et bensérazide, avant et après incorporation de la résine échangeuse dans les 3 formes évaluées

La première étape des évaluations *in vitro* a été de doser la levodopa, la carbidopa et la bensérazide, avant et après incorporation de la résine. Comme montré au **Tableau 22**, l'incorporation de la résine n'a pas modifié la teneur en PA.

Tableau 22 : Teneur en PA (mg) avant et après incorporation de la résine (Moyenne \pm D.S) (n=3)

	MC matriciels		MC enrobés		Prolopa [®] HBS 125	
	sans résine	avec résine	sans résine	avec résine	sans résine	avec résine
Levodopa	99.8 \pm 0.6	99.6 \pm 0.5	98.8 \pm 1.2	98.0 \pm 0.3	100.1 \pm 0.2	99.8 \pm 0.3
Carbidopa	25.05 \pm 0.05	25.0 \pm 0.1	25.1 \pm 0.2	24.8 \pm 0.2	-	-
Bensérazide	-	-	-	-	24.8 \pm 0.1	25.1 \pm 0.1

Influence de l'incorporation de la résine échangeuse sur les profils de dissolution des PA

La quantité adéquate de résine (5% m/m) a été incorporée à la fois dans les mini-comprimés matriciels, les mini-comprimés enrobés et dans la spécialité Prolopa[®] HBS 125. Des tests de dissolution couplés à une analyse HPLC ont permis d'évaluer l'influence de la résine sur les différents profils de dissolution (**Figures 48 et 49**).

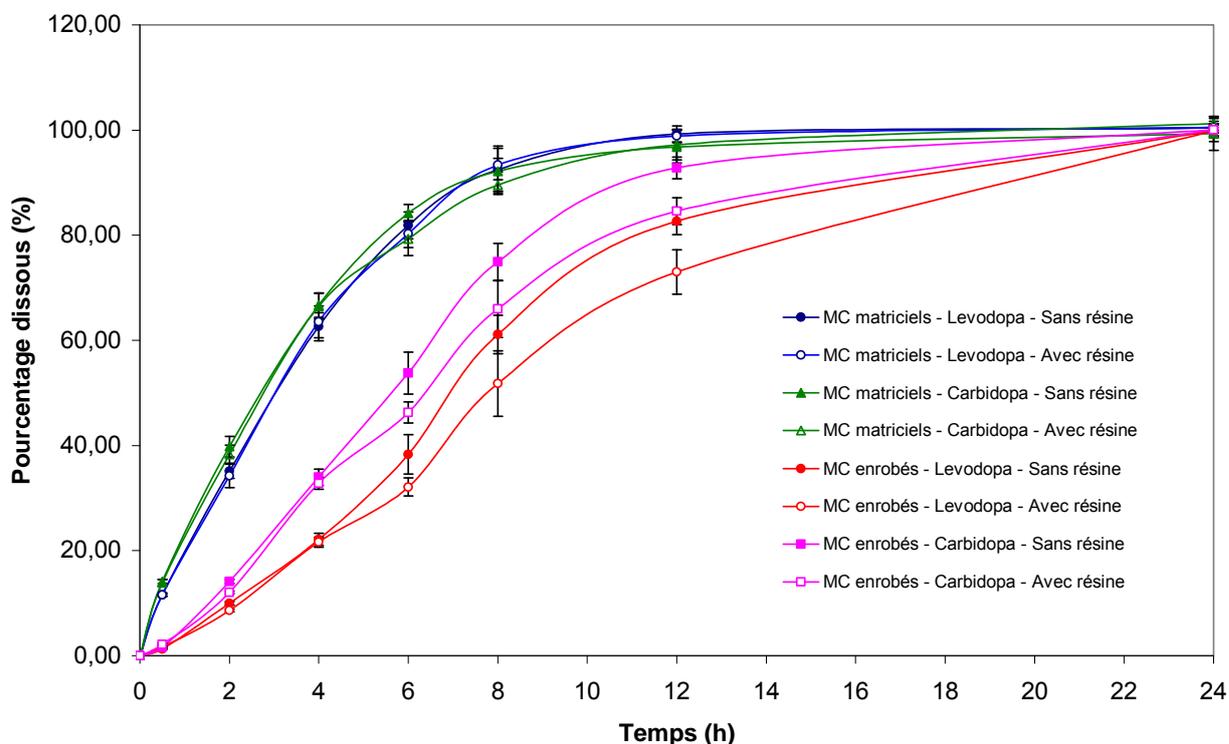


Figure 48 : Profils de dissolution de la levodopa et de la carbidopa à partir des MC matriciels et enrobés, avant et après incorporation de la résine (USP type II ; pH 3.0 ; 50 rpm) (n=5).

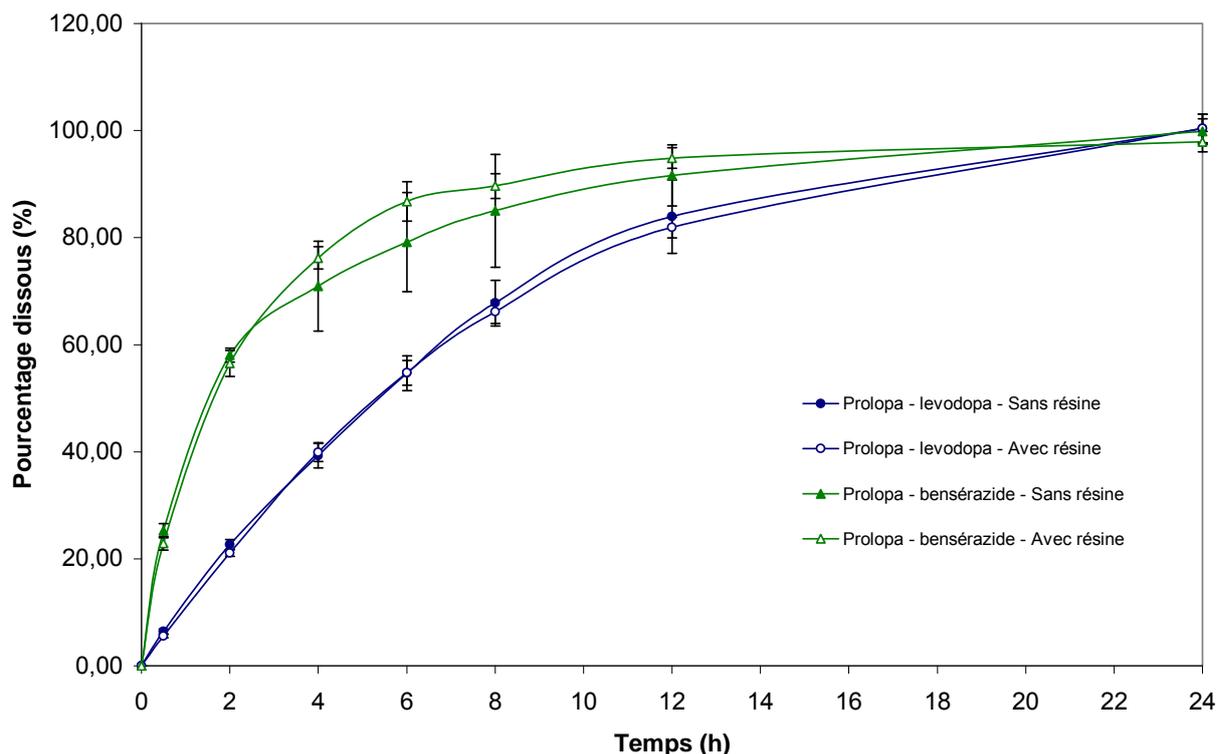


Figure 49 : Profils de dissolution de la levodopa et la bensérazide à partir de la Prolopa® HBS 125, avant et après incorporation de la résine (USP type II ; pH 3.0 ; 50 rpm) (n=5).

Quelle que soit la forme flottante évaluée, l'incorporation de la résine n'a pas modifié de manière significative les profils de dissolution de la levodopa ou de l'inhibiteur de décarboxylase périphérique (**Tableau 23**). Contrairement à la bensérazide ($f_2=47.0$), le profil de dissolution de la carbidopa à partir de mini-comprimés matriciels ($f_2=87.2$) et enrobés ($f_2=64.3$) est resté similaire à celui de la levodopa.

Tableau 23 : Valeurs des différents facteurs f_2 calculés après les essais de dissolution réalisés sur les MC matriciels, enrobés et la spécialité Prolopa® HBS 125 afin d'évaluer l'influence de la résine sur les profils de dissolution des différents principes actifs.

	MC matriciels	MC enrobés	Prolopa® HBS 125
Levodopa	98	76	94
Carbidopa	90	76	-
Bensérazide	-	-	81

Influence de l'incorporation de la résine échangeuse sur les propriétés de flottaison

Après avoir vérifié que l'incorporation de la résine ne modifiait en rien la cinétique de libération des différents PA, il était nécessaire d'évaluer les propriétés de flottaison des 3 formes galéniques avant et après incorporation de la résine afin d'être certain que la présence de cette dernière n'était pas néfaste à la flottaison (**Figure 50**).

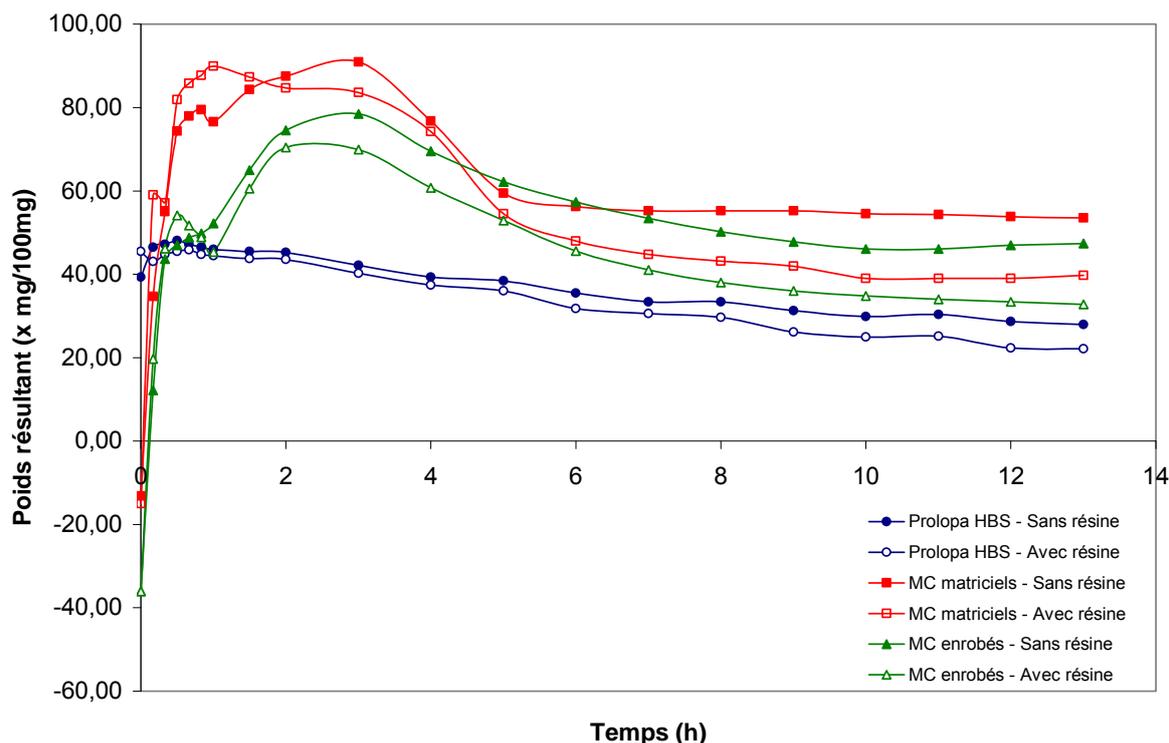


Figure 50 : Profils moyen de poids résultant obtenu à partir des MC matriciels et enrobés et de la Prolopa[®] HBS 125, en absence et présence de résine (n=3)

Les propriétés de flottaison des mini-comprimés matriciels et enrobés, ainsi que celles de la Prolopa[®] HBS 125, n'ont pas été altérées par la présence de résine au sein de la forme. Avec ou sans résine, les mini-comprimés matriciels et enrobés ont flotté en moins de 10 minutes et pendant plus de 13 heures. Comme observé en l'absence de résine, la Prolopa[®] HBS 125 n'a pas présenté de délai de flottaison.

Libération de la radioactivité à partir des 3 formes flottantes évaluées

Le profil de dissolution de la levodopa et le profil de libération de la radioactivité ont ensuite été relevés et comparés pour chaque formulation (**Figure 51**).

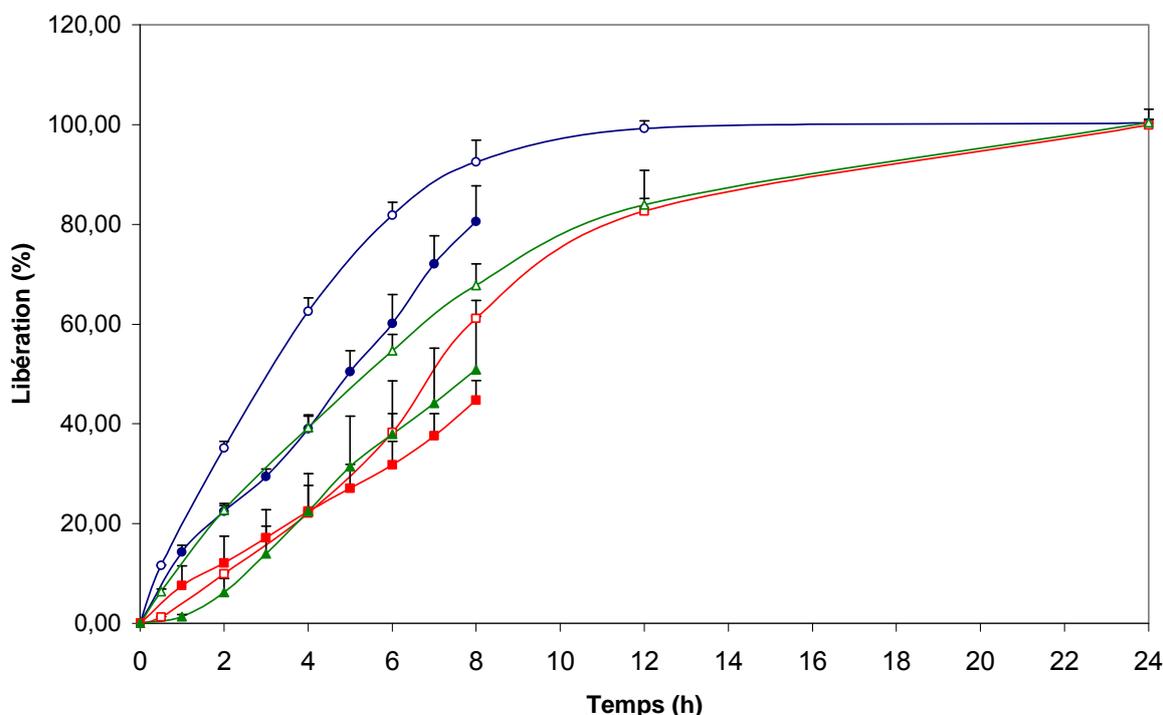


Figure 51 : Profils de dissolution de la levodopa à partir de la Prolopa® HBS 125 (Δ) et des MC matriciels (○) et enrobés (□), et profils de libération de la radioactivité à partir de la Prolopa® HBS 125 (▲) et des MC matriciels (●) et enrobés (■) (UPS type II ; pH 3.0 ; 50 rpm) (n=5).

L'indium-111 étant échangé avec les protons lorsque la résine entre en contact avec la solution aqueuse, la libération de la radioactivité ne s'est pas réalisée de la même façon pour les 3 formes évaluées. En effet, à partir des mini-comprimé matriciels et la Prolopa® HBS 125, la radioactivité a été libérée par diffusion et après érosion de la matrice à une vitesse dépendant essentiellement de la surface de contact solide-liquide. A partir des mini-comprimés enrobés, la radioactivité n'a pu être libérée que par diffusion. Toutefois, pour les 3 formes testées, le profil de dissolution de la levodopa est resté statiquement similaire à celui de la radioactivité pendant 8 heures. Les facteurs de similarité étaient respectivement égaux à 57, 73 et 59 pour la Prolopa® HBS 125 et les mini-comprimés matriciels et enrobés. La radioactivité est donc suffisamment retenue par les formes pour pouvoir visualiser leur rétention stomacale pendant l'étude.

III.6.2.2. Evaluation *in vivo*

La résine marquée par l'indium-111 ayant été incorporée aux 3 formes flottantes évaluées, il a été possible de visualiser leurs mouvements à l'intérieur de l'estomac grâce à l'utilisation d'une γ -caméra. Le comportement intra-gastrique des mini-comprimés flottants et enrobés est resté relativement constant d'un sujet à l'autre (**Figure 52**).

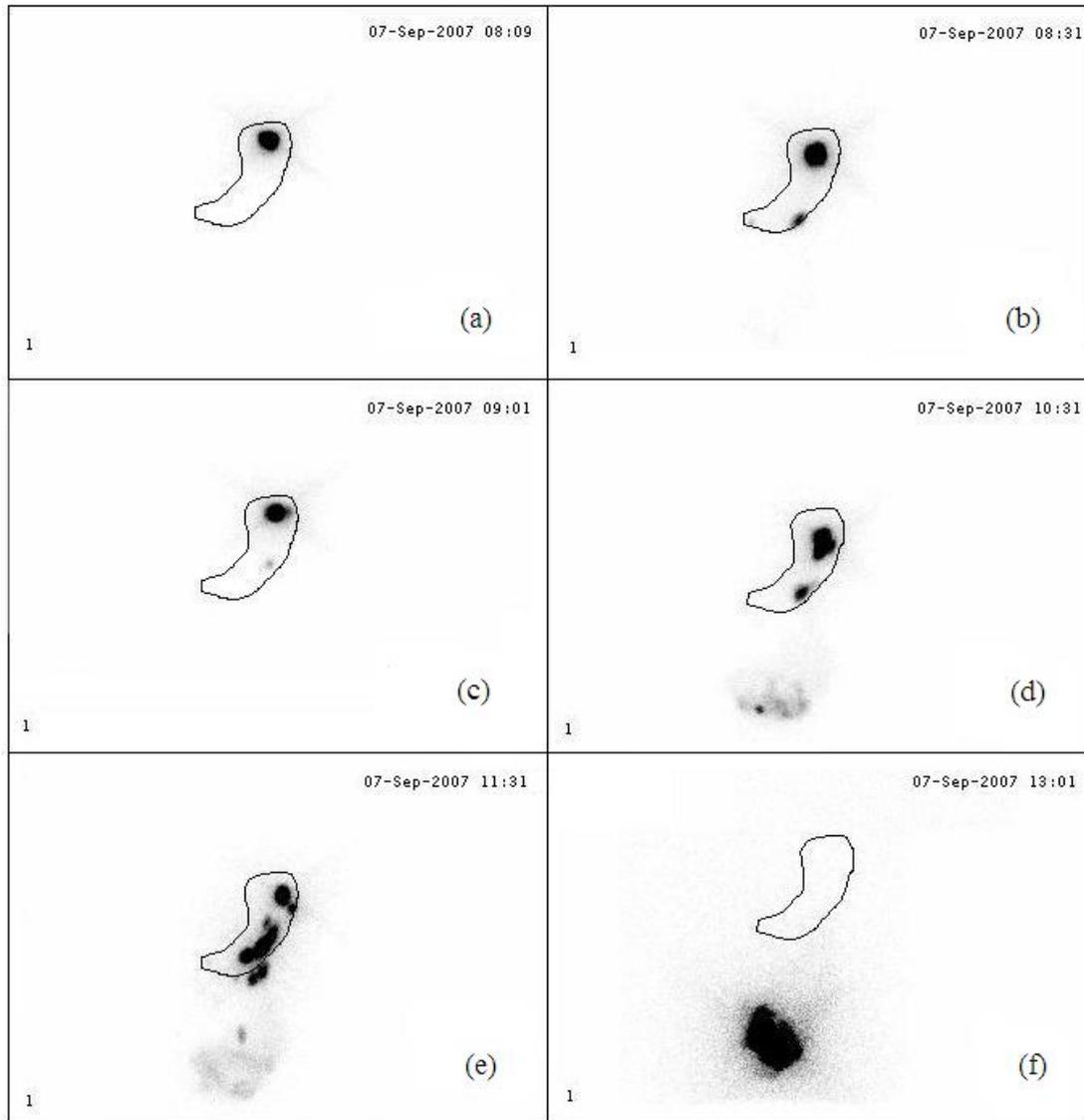


Figure 52 : Représentation d'un exemple de mouvements intra-gastriques typiques observés après administration des MC (images issues du volontaire 1, MC matriciels)

Immédiatement après ingestion, la gélule flottait à la surface du fluide stomacal. Les mini-comprimés étant confinés dans un petit espace, la radioactivité se concentrait en

un simple spot (**Figure 52a**). Après 30 min, la gélule a commencé à se dissoudre. Les mini-comprimés ont été libérés dans le milieu et coulaient au fond de l'estomac (**Figure 52b**). Une demi-heure plus tard, tous les mini-comprimés flottaient à la surface du fluide stomacal (**Figure 52c**). Les forces de flottaison étaient suffisamment élevées pour éviter une vidange précoce. Deux heures et demi après ingestion, deux spots lumineux distincts pouvaient être visualisés. Une partie des mini-comprimés se situait au niveau de l'antre tandis que la majorité d'entre eux flottait encore à la surface du fluide stomacal (**Figure 52d**). Trois heures et demi après administration de la forme, une partie des mini-comprimés a quitté l'estomac. De la radioactivité pouvait être visualisée en dehors de la région d'intérêt (**Figure 52e**). Après 5 heures, aucune activité n'irradiait de l'estomac. Tous les mini-comprimés avaient atteint l'intestin grêle (**Figure 52f**).

Lorsque les mini-comprimés enrobés étaient administrés, une dispersion de la radioactivité pouvait parfois être visualisée à l'intérieur de l'estomac et ce, à des temps très variables. Ce phénomène, déjà observé *in vitro* [Goole et col., 2008a], peut être expliqué par l'apparition de fissures à la surface de l'enrobage. Ce dernier est alors fragilisé et une partie du noyau se disperse dans le milieu extérieur. La capacité de flottaison s'en trouve également diminuée.

La Prolopa® HBS 125 n'a présenté aucun délai de flottaison. Immédiatement après ingestion, un spot de radioactivité similaire à celui montré à la **Figure 52a** pouvait être visualisé dans la partie supérieure de l'estomac. Toutefois, pour chacun des sujets, un élargissement du spot de radioactivité pouvait être observé lors de l'acquisition précédant celle où pouvait être visualisé la vidange gastrique de la forme. Cette dispersion de radioactivité était sans doute due à des phénomènes de fragmentation de la masse gélifiée.

Le **Tableau 24** contient l'ensemble des valeurs moyennes du temps de rétention gastrique, de l'aire sous la courbe (ASC), du C_{\max} et du T_{\max} de la levodopa, carbidopa et bensérazide pour les 3 formes évaluées.

Tableau 24 : Temps de résidence gastriques et valeurs moyennes d'ASC, de C_{\max} et de T_{\max} de la levodopa, carbidopa et bensérazide après administration de la Prolopa[®] HBS 125 et des MC matriciels et enrobés chez les volontaires sains (Moyenne \pm DS)

		Prolopa[®] HBS 125	MC matriciels	MC enrobés
GRT (min)	Femmes (n=6)	245 \pm 58	345 \pm 131	300 \pm 104
	Hommes (n=4)	203 \pm 57	218 \pm 45	203 \pm 15
	Moyenne (n=10)	228 \pm 59	294 \pm 121	261 \pm 93
Levodopa				
ASC (ng.h/ml)	Femmes	1554 \pm 771	926 \pm 428	1709 \pm 897
	Hommes	799 \pm 179	821 \pm 319	379 \pm 120
	Moyenne	1252 \pm 702	884 \pm 373	1177 \pm 961
C_{\max} (ng/ml)	Femmes	594 \pm 339	248 \pm 107	577 \pm 302
	Hommes	258 \pm 47	243 \pm 72	119 \pm 43
	Moyenne	459 \pm 308	246 \pm 90	394 \pm 327
T_{\max} (min)	Femmes	270 \pm 33	290 \pm 25	280 \pm 31
	Hommes	240 \pm 85	210 \pm 35	240 \pm 85
	Moyenne	258 \pm 57	258 \pm 49	264 \pm 58
		Bensérazide Prolopa[®] HBS 125	Carbidopa MC matriciels	Carbidopa MC enrobés
ASC (ng.h/ml)	Femmes	55 \pm 39	81 \pm 41	99 \pm 68
	Hommes	6 \pm 8	87 \pm 30	68 \pm 34
	Moyenne	36 \pm 39	84 \pm 35	87 \pm 56
C_{\max} (ng/ml)	Femmes	15 \pm 9	21 \pm 10	24 \pm 15
	Hommes	4 \pm 3	19 \pm 3	22 \pm 13
	Moyenne	11 \pm 9	20 \pm 8	23 \pm 14
T_{\max} (min)	Femmes	210 \pm 99	310 \pm 25	315 \pm 59
	Hommes	128 \pm 126	330 \pm 180	330 \pm 199
	Moyenne	177 \pm 112	318 \pm 106	321 \pm 124

Les 3 formes ont présenté un temps de résidence gastrique similaire. Il semblerait que celui des hommes soit en général inférieur à celui des femmes. Les T_{\max} de la levodopa, carbidopa et bensérazide sont également similaires d'un système à l'autre.

Les concentrations plasmatiques moyennes de la levodopa en fonction du temps sont montrées à la **Figure 53**.

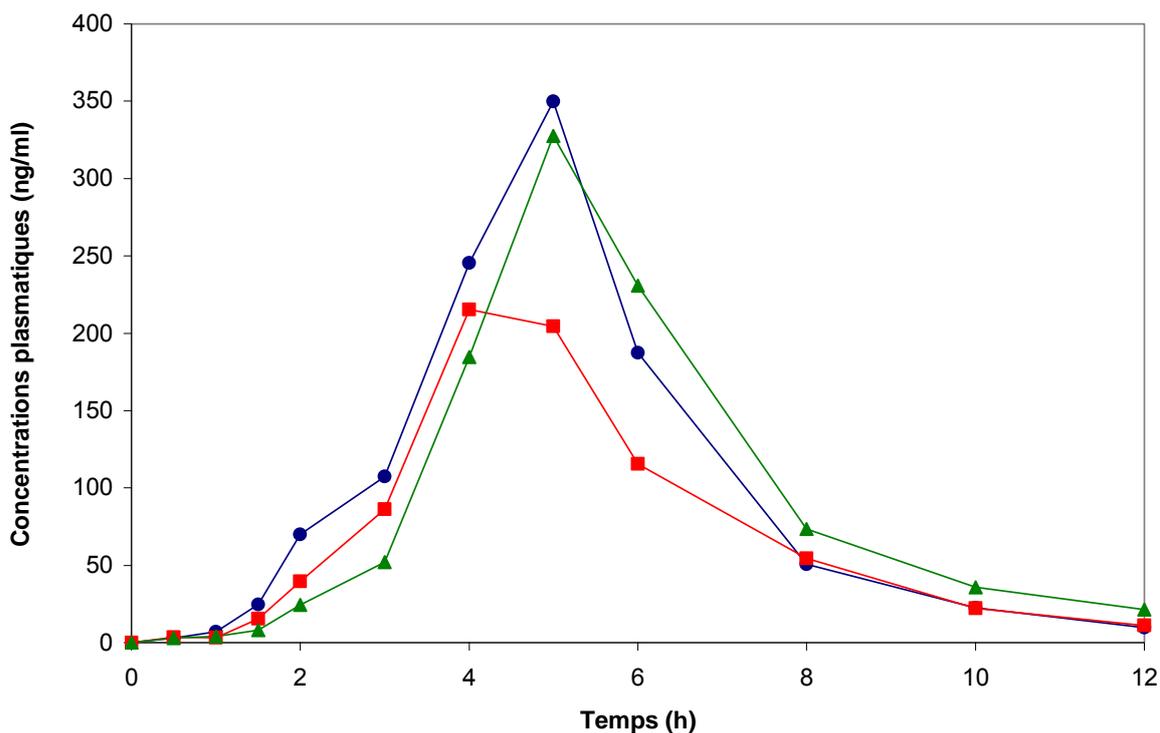


Figure 53 : Concentrations plasmatiques moyennes de la levodopa en fonction du temps à partir de la Prolopa® HBS 125 (●) et des MC matriciels (■) et enrobés (▲) (n=10)

L'augmentation et la décroissance progressive des concentrations plasmatiques au cours du temps sont caractéristiques des formes à libération prolongée. Les profils plasmatiques obtenus à partir de la Prolopa® HBS 125 et des mini-comprimés enrobés sont similaires. Dans les 2 cas, les concentrations plasmatiques en levodopa augmentent rapidement après 3 heures. Ce phénomène est sans doute dû aux problèmes de fragmentation observés *in vitro* et par scintigraphie (augmentation de la surface de contact solide-liquide).

A l'inverse, la courbe plasmatique obtenue après administration des mini-comprimés matriciels ne présente pas d'effet de pic. Aucun phénomène de désintégration ne se produit avec cette forme. Cette dernière a donné la valeur d'ASC la moins élevée. Si les mini-comprimés passent la fenêtre d'absorption avant d'avoir libéré l'entièreté de la levodopa, la quantité résorbée s'en trouve diminuée. Une solution serait de réduire la teneur en agent gélifiant pour augmenter la vitesse de libération du PA.

Toutefois, les mini-comprimés matriciels ont fourni la plus faible variabilité entre les hommes et les femmes au niveau des concentrations plasmatiques en levodopa et

carbidopa (**Figures 54 et 55**). La maladie de Parkinson affectant autant les hommes que les femmes, une forme capable d'engendrer des concentrations plasmatiques indépendantes du sexe permettrait de faciliter l'instauration d'un traitement unique.

A dose administrée égale, l'ASC, le C_{max} et le T_{max} moyens de la bensérazide étaient inférieurs à ceux de la carbidopa. Après prise orale, seulement 66 à 74% de la dose initiale en bensérazide est résorbée au niveau intestinal. Cette résorption incomplète est due à une oxydation rapide de la molécule en ses quinones correspondantes [Pinder et col., 1976]. D'importantes variations d'ASC au niveau de la courbe plasmatique de la bensérazide ont pu également être observées en fonction du sexe (**Figure 55**). De plus, comme décrit dans la littérature, contrairement à la carbidopa, le temps de demi-vie plasmatique de la bensérazide varie de façon importante d'un sujet à l'autre [Pinder et col., 1976].

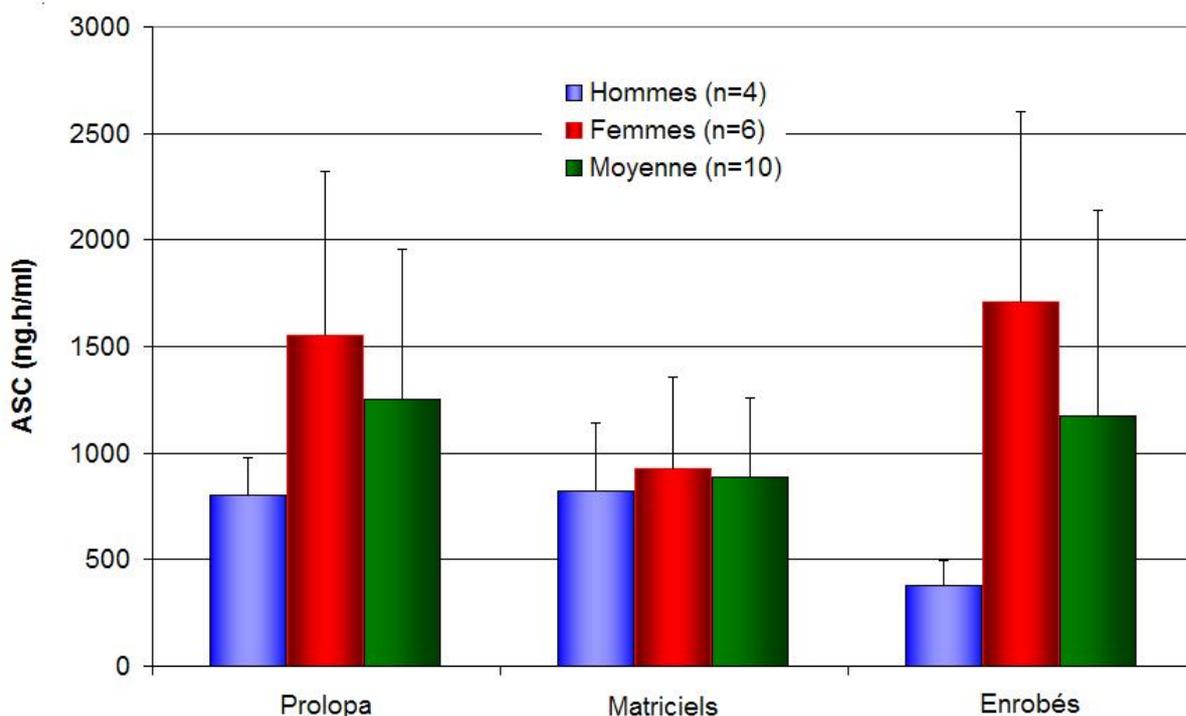


Figure 54 : Aires sous la courbe calculées à partir de la courbe des concentrations plasmatiques de la levodopa en fonction du temps, à partir des 3 formes testées (Moyenne \pm DS).

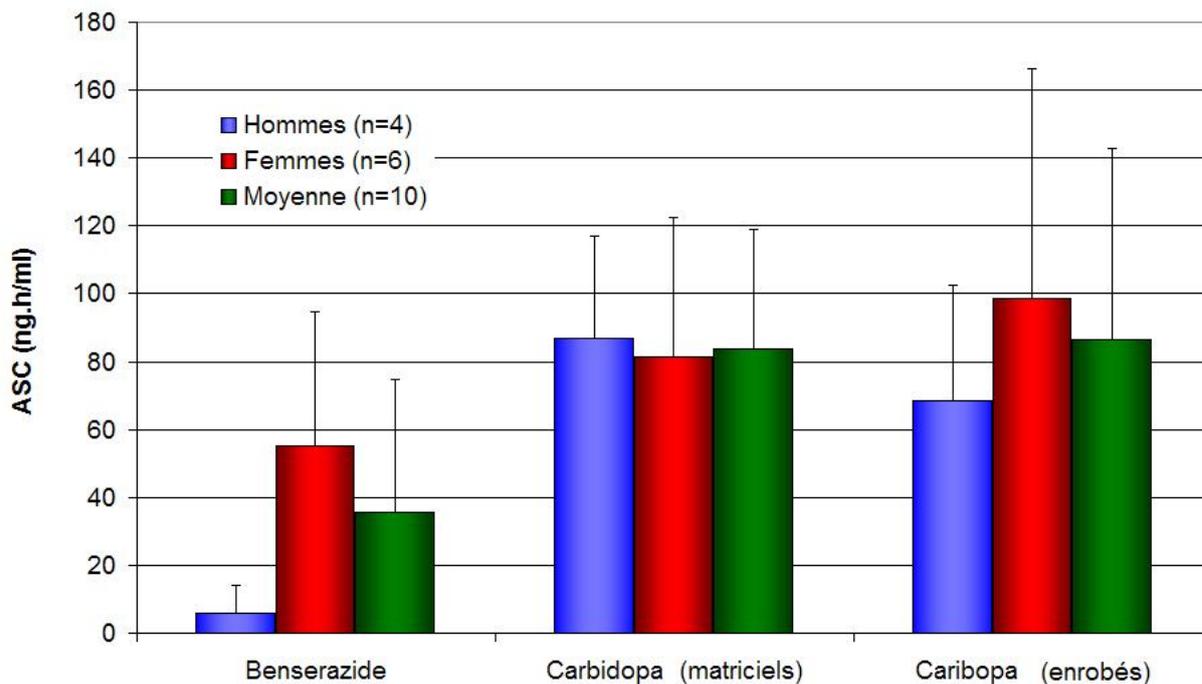


Figure 55 : Aires sous la courbe calculées à partir des courbes plasmatiques de la benserazide et la carbidopa en fonction du temps, après administration de la Prolopa[®] HBS 125 et des MC matriciels et enrobés (Moyenne \pm DS).

III.6.3. Conclusion

Cette étude a démontré que les mini-comprimés - *matriciels et enrobés* - présentaient une résidence gastrique supérieure à 4 heures. Ils ont également fourni des concentrations plasmatiques soutenues en levodopa et carbidopa. La courbe plasmatique de la levodopa obtenue à partir des mini-comprimés enrobés était similaire à celle obtenue après administration de la Prolopa[®] HBS 125. Toutefois, comparativement à la carbidopa, les concentrations plasmatiques en benserazide étaient inférieures et présentaient d'importantes variations en fonction du sexe.

Les mini-comprimés enrobés présentant une désintégration *in vitro* et *in vivo* difficilement contrôlable, leur développement semble compromis. La solution envisageable serait d'augmenter la teneur en enrobage. Cette solution présente néanmoins une sérieuse limitation puisque cela pourrait augmenter dangereusement le délai de flottaison.

Les mini-comprimés matriciels ont fourni quant à eux les résultats présentant le moins de variabilité - ASC , C_{max} - en fonction du sexe. De plus, ils n'ont présenté aucune désintégration intra-gastrique, ce qui a évité l'apparition d'effet de pic au niveau des concentrations plasmatiques en levodopa.

A l'avenir, il serait peut-être utile de réduire la quantité d'agent gélifiant incorporé dans les mini-comprimés matriciels afin d'augmenter la résorption de la levodopa. De plus, le nombre de sujet devrait être augmenté afin de réduire l'impact de variabilité sur l'interprétation des résultats.

IV. Etudes de stabilité

IV.1 Introduction

Les mini-comprimés matriciels et enrobés ayant été développés avec succès, il devenait important d'évaluer la stabilité des PA lorsque ces derniers y étaient incorporés. Nous avons décidé d'effectuer cette étude sur la levodopa et la carbidopa. La levodopa a été utilisée depuis les premières évaluations en tant que modèle de PA hydrosoluble et la carbidopa est l'inhibiteur de décarboxylase périphérique qui lui est majoritairement associé [Pinder et col., 1976]. La stabilité de l'agent gras liant ayant déjà été étudiée précédemment [Hamdani, 2005], les essais n'ont plus été réitérés.

A notre connaissance, aucune réaction, ni aucun produit de dégradation ne sont décrits dans la littérature lorsque la levodopa et la carbidopa se présentent sous forme sèche. Seules des réactions d'oxydation forcées, en présence d'oxydants puissants, ont été réalisées dans le cadre de dosages spectrophotométriques. Ainsi, après addition de periodate de potassium, la levodopa s'oxyde instantanément en son orthoquinone correspondante. Si le pH est supérieur à 4, ce dérivé se cyclise et s'oxyde de nouveau pour former un aminochrome. Deux moles de periodate sont nécessaires pour obtenir une oxydation complète d'une mole de levodopa. L'aminochrome formé absorbe dans l'UV à 300 nm et dans le visible à 480 nm. Ce produit est instable. Il se décompose pour former rapidement un dérivé incolore ce qui rend son analyse très difficile [Coello et col., 2000 ; Pistonesi et col., 2004]. Toutefois, Coello et col. ont démontré qu'en l'absence d'agent oxydant, les solutions de levodopa protégées de la lumière sont stables pendant 15 jours à 4-5°C [Coello et col., 2000]. A ce jour, aucune donnée bibliographique n'a pu être trouvée concernant la stabilité de la carbidopa sous forme sèche.

Ainsi, les mini-comprimés matriciels et enrobés (**Tableaux 25 et 26**), ont été préconditionnés dans des gélules en gélatine opaques n°0, elles-mêmes placées dans des pots en plastique opaques scellés (v=60ml) contenant une pastille dessiccatrice. Chaque gélule contenait 20 mini-comprimés, ce qui correspondait à un dosage équivalent à 100 mg de levodopa et 25 mg de carbidopa. Les conditions de stockage ont été fixées selon les normes ICH (**Tableau 27**).

Tableau 25 : Composition et caractéristiques des MC / noyaux ayant servis à réaliser les études de stabilités.

Composition (% m/m)	MC matriciels	MC enrobés
Levodopa	25.00	25.00
Carbidopa	6.25	6.25
Precirol [®] ATO5	12.00	12.00
Methocel [®] K15M	25.00	-
CaCO ₃	10.00	10.00
NaHCO ₃	4.00	4.00
Acide tartrique	3.00	15.00
Lactose 450 mesh	14.75	27.75

Diamètre	3 mm
Masse	20 mg
Force de compression	50 – 100 N
Dureté	9 ± 2 N

Tableau 26 : Formulation et conditions d'enrobage utilisées lors de la fabrication des mini-comprimés enrobés évalués lors des études de stabilité

Formulation de l'enrobage (g)	F1	Conditions	Pré-chauffage	Enrobages	Séchage
Eudragit [®] RL30D (sec)	200				
ATEC	40	t° entrée	40±2 °C	40±2 °C	40±2 °C
Lactose	20	t° sortie	35±2 °C	32±2 °C	35±2 °C
Talc	50	Débit		5 à 8 g/min	
Agent anti-mousse	2	Pression	1 bar	1 bar	1 bar
Eau	888	Durée	5 min.	± 4h	10 min.
Matière sèche (% m/m)	26				
Teneur (% m/m)	20				

Tableau 27 : Normes ICH pour la conservation des formes pharmaceutiques

Type d'étude	Conditions de stockage	Durée min.	Temps de prélèvement
Long terme	25±2°C / 60±5% HR	12 mois	1, 3, 6, 12 mois
Intermédiaire	30±2°C / 65±5% HR	12 mois	1, 3, 6, 12 mois
Accélérée	40±2°C / 75±5% HR	6 mois	1, 2, 3, 6 mois

Aux temps de prélèvement prescrits (**Tableau 27**), la détermination des teneurs en PA et des quantités de PA libérées dans le milieu de dissolution a été effectuée par HPLC. Parallèlement, l'évolution des profils de flottaison a été évaluée par la méthode du poids résultant [Timmermans et Moës, 1990a].

IV.2. Résultats et discussion

IV.2.1. Détermination de la teneur en PA

L'évolution des teneurs en levodopa et en carbidopa, contenues dans les mini-comprimés enrobés et non enrobés, a été relevée en fonction de la durée de stockage, suivant les normes ICH précitées.

Les résultats obtenus à $25\pm 2^\circ\text{C}$ sous une humidité relative contrôlée de $60\pm 5\%$ sont présentés à la **Figure 56** et au **Tableau 28**. Les résultats obtenus à $30\pm 2^\circ\text{C}$ sous une humidité relative contrôlée de $65\pm 5\%$ sont présentés à la **Figure 57** et au **Tableau 28**. Les résultats obtenus à $40\pm 2^\circ\text{C}$ sous une humidité relative contrôlée de $75\pm 5\%$ sont présentés à la **Figure 58** et au **Tableau 28**.

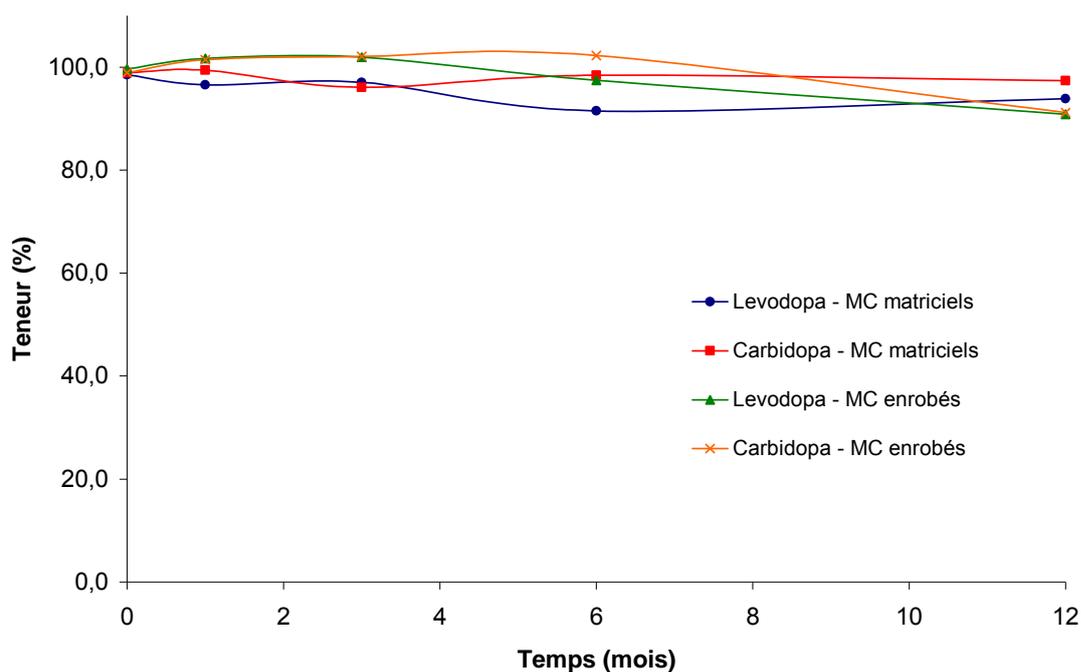


Figure 56 : Evolution de la teneur en levodopa et en carbidopa au cours du temps à $25\pm 2^\circ\text{C}$ / $60\pm 5\%$ HR (n=3)

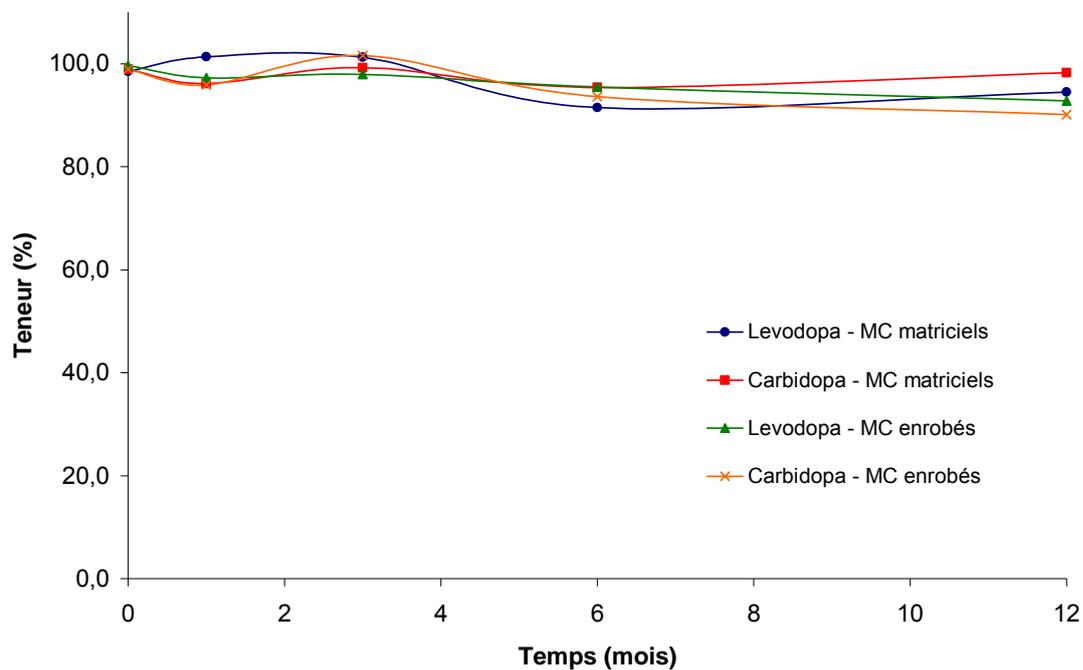


Figure 57 : Evolution de la teneur en levodopa et en carbidopa au cours du temps à $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $65\pm 5\%$ HR (n=3)

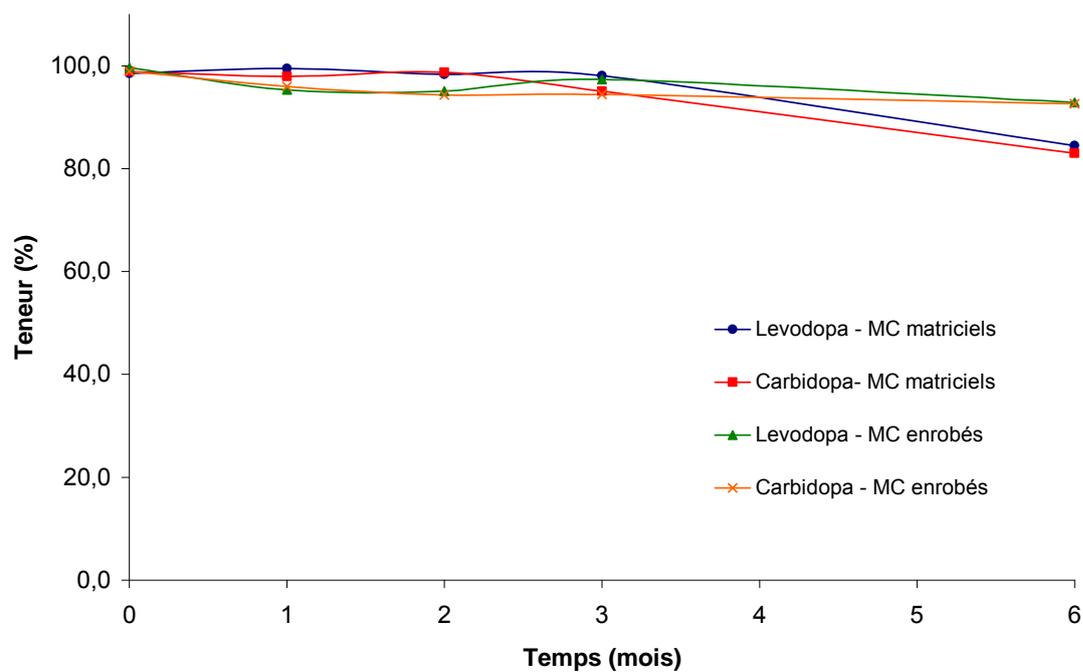


Figure 58 : Evolution de la teneur en levodopa et en carbidopa au cours du temps à $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\pm 5\%$ HR (n=3)

A $25\pm 2^\circ\text{C}$ et $30\pm 2^\circ\text{C}$, les teneurs en levodopa et en carbidopa sont restées statistiquement similaires pendant 12 mois, quelle que soit la forme (**Tableau 28**). Par contre, dans le cas des mini-comprimés matriciels, une diminution significative ($p < 0.05$) des teneurs en levodopa et carbidopa a pu être observée à $40\pm 2^\circ\text{C}$ après 6 mois de stockage. L'enrobage a sans doute eu un effet protecteur car les teneurs en levodopa et en carbidopa ont diminué dans une moindre mesure avec la forme enrobée, quelles que soient les conditions de stockage. Le manque d'information bibliographique ne nous permet pas d'expliquer avec certitude les causes de ces dégradations. Cependant, la levodopa et la carbidopa étant des PA très sensibles aux phénomènes oxydatifs, nous pouvons émettre l'hypothèse que des mécanismes similaires à ceux décrits pour expliquer leur dégradation en solution ont pu intervenir sur la forme sèche. En effet, après 6 mois à $40\pm 2^\circ\text{C}$, des spots brunâtres ont pu être visualisés à la surface des mini-comprimés matriciels. Ces derniers peuvent correspondre aux dérivés quinones issus de l'oxydation des groupements phénoliques [Coello et col., 2000 ; Pistonesi et col., 2004].

Selon l'USP 25^{ème} édition, les normes de teneurs concernant la levodopa et la carbidopa contenues dans une forme sèche de type comprimé peuvent être comprises entre 90 et 110% (m/m) [UPS 25, 2002]. Ainsi, seules les teneurs en levodopa et carbidopa mesurées à partir des mini-comprimés matriciels à $40\pm 2^\circ\text{C}$ sous une humidité relative de $75\pm 5\%$ après 6 mois sont non-conformes. Il serait peut-être possible de limiter cette diminution de teneur en incorporant un agent anti-oxydant à l'intérieur des mini-comprimés. Une fabrication et un conditionnement en atmosphère contrôlée en oxygène, sous courant d'azote, pourrait également réduire les risques de voir les teneurs en levodopa et carbidopa se réduire au cours du temps.

Tableau 28 : Résultats des études de stabilité - teneurs moyennes en levodopa (Levo) et carbidopa (Carbi) (% m/m) - présentés dans les **Figures 56, 57 et 58** (n=3).

	Temps (mois)	MC matriciels				MC enrobés			
		Levo	DS	Carbi	DS	Levo	DS	Carbi	DS
25°C 60% HR	0	98.5	0.4	98.9	2.2	99.7	5.2	98.9	4.6
	1	96.6	4.6	99.4	3.9	101.7	4.2	101.5	4.1
	3	97.0	4.2	96.1	3.4	101.9	3.0	102.1	4.0
	6	91.5	4.6	98.4	5.2	97.4	3.3	102.3	3.9
	12	93.9	1.2	97.4	1.5	90.9	0.9	91.2	1.1
30°C 65% HR	0	98.5	0.4	98.9	2.2	99.7	5.2	98.9	4.6
	1	101.3	4.2	96.1	4.4	97.3	0.2	95.9	0.9
	3	101.3	3.0	99.2	4.6	98.0	3.4	101.6	0.4
	6	91.5	3.5	95.4	4.5	95.5	2.9	93.7	1.5
	12	94.6	3.1	98.3	0.8	92.8	3.1	90.1	2.9
40°C 75% HR	0	98.5	0.4	98.9	2.2	99.7	5.2	98.9	4.6
	1	99.5	3.9	97.9	3.0	95.4	3.1	96.0	0.8
	2	98.4	0.2	98.7	1.5	95.0	1.3	94.4	2.5
	3	98.1	2.6	95.1	1.5	97.4	3.9	94.4	2.2
	6	84.5*	2.7	83.0*	2.9	92.9	1.1	92.6	0.8

* p < 0.05

IV.2.2. Essais de dissolution

Les essais de dissolution (Type II) ont été réalisés dans un tampon phosphate (0.05 M) à pH 3.0 sous une vitesse de rotation de 100 rpm.

Les formes à libération prolongée fournissant des profils de libération définis, il est important d'évaluer l'influence des conditions de stockage sur l'évolution des propriétés de dissolution des différents PA. En effet, une modification de la cinétique de libération - *accélérée ou retardée* - peut engendrer une variation de la réponse pharmacologique au cours du temps et donc, s'avérer être source d'échec thérapeutique. Ainsi, il est essentiel qu'aucun burst effect, ni aucune prolongation excessive de la libération des PA n'apparaisse pendant le stockage. Les profils de dissolution de la levodopa relevés à partir des mini-comprimés enrobés et non enrobés à 25±2°C (60±5% HR), 30±2°C (65±5% HR) et 40±2°C (75±5% HR) sont présentés respectivement aux **Figures 59, 60 et 61**.

Les profils de dissolution de la levodopa relevés à partir des mini-comprimés enrobés et non enrobés à $25\pm 2^\circ\text{C}$ ($60\pm 5\%$ HR), $30\pm 2^\circ\text{C}$ ($65\pm 5\%$ HR) et $40\pm 2^\circ\text{C}$ ($75\pm 5\%$ HR) sont exposés respectivement aux **Figures 62, 63 et 64**. Enfin, la similarité des différents profils de dissolution, obtenus aux temps prescrits par les normes ICH, par rapport aux profils relevés au temps 0, a été évaluée afin d'apprécier d'éventuelles modifications de cinétique de libération des 2 PA concernés (**Tableau 29**).

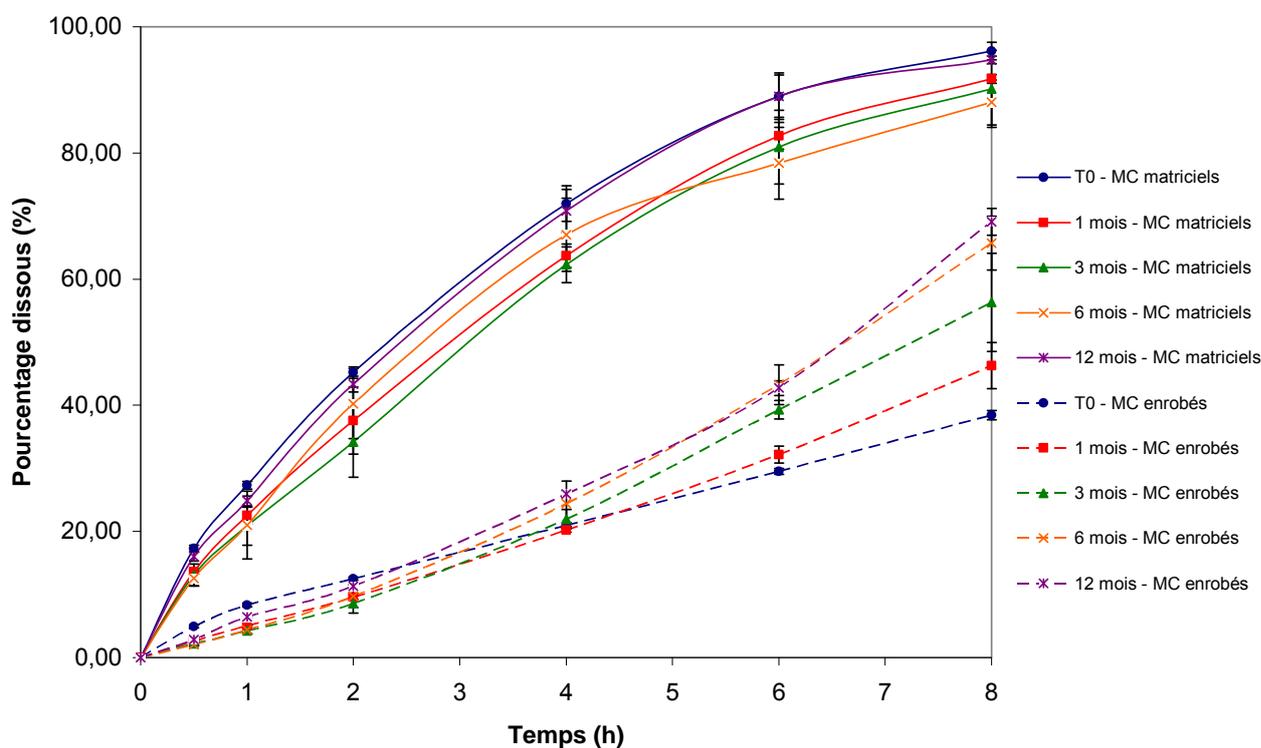


Figure 59 : Profils de dissolution de la levodopa au cours du temps en fonction du stockage à $25\pm 2^\circ\text{C}$ / $60\pm 5\%$ HR (n=5)

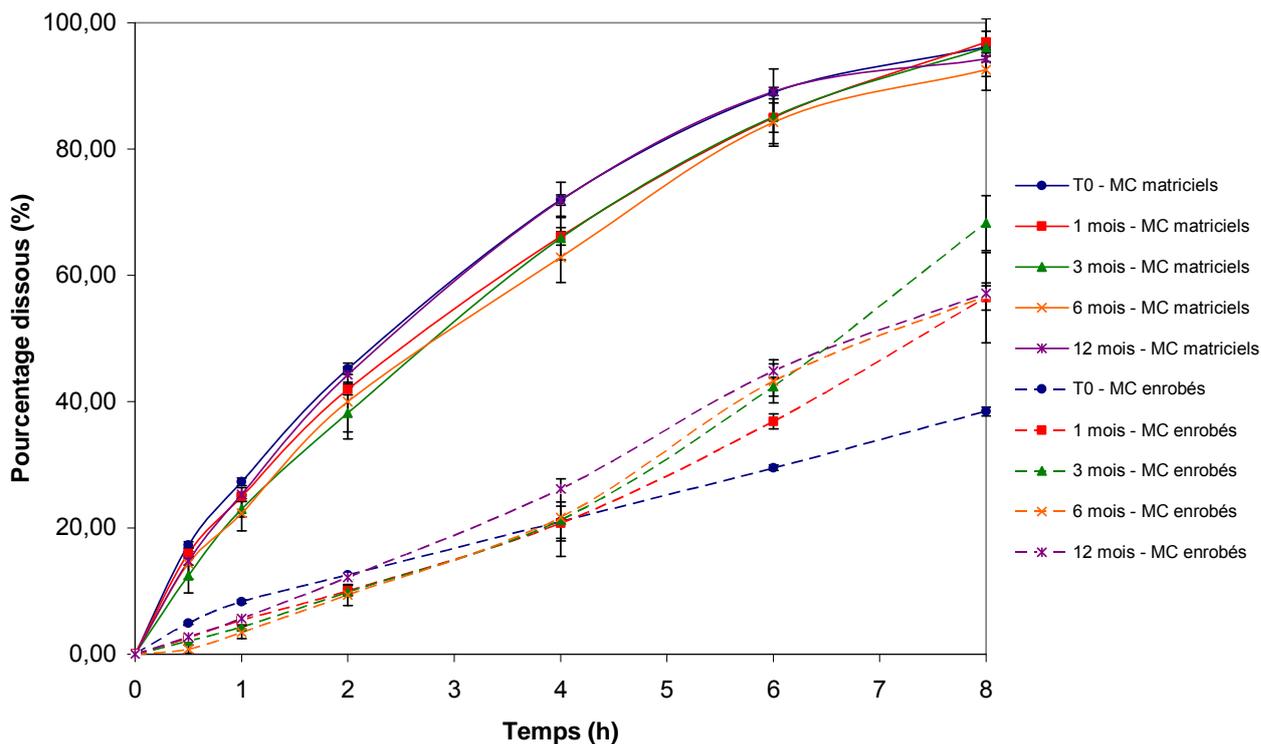


Figure 60 : Profils de dissolution de la levodopa au cours du temps en fonction du stockage à $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $65\pm 5\%$ HR (n=5)

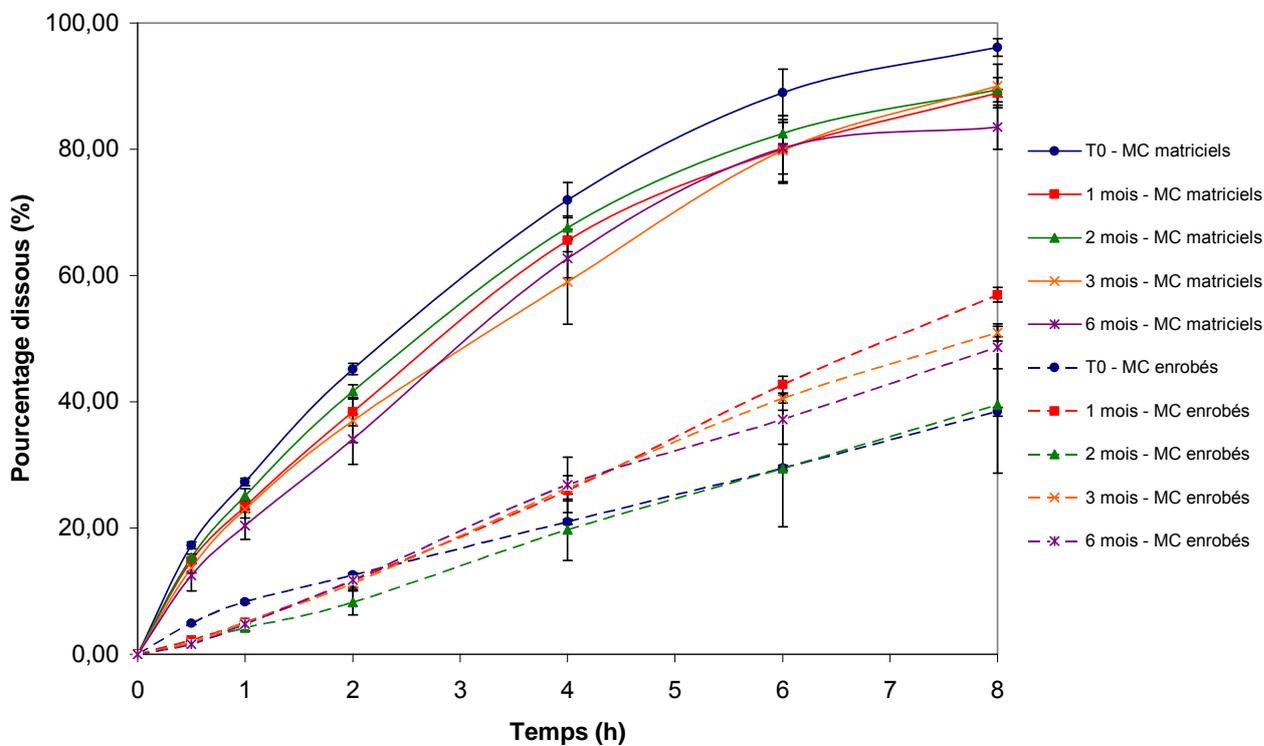


Figure 61 : Profils de dissolution de la levodopa au cours du temps en fonction du stockage à $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\pm 5\%$ HR (n=5)

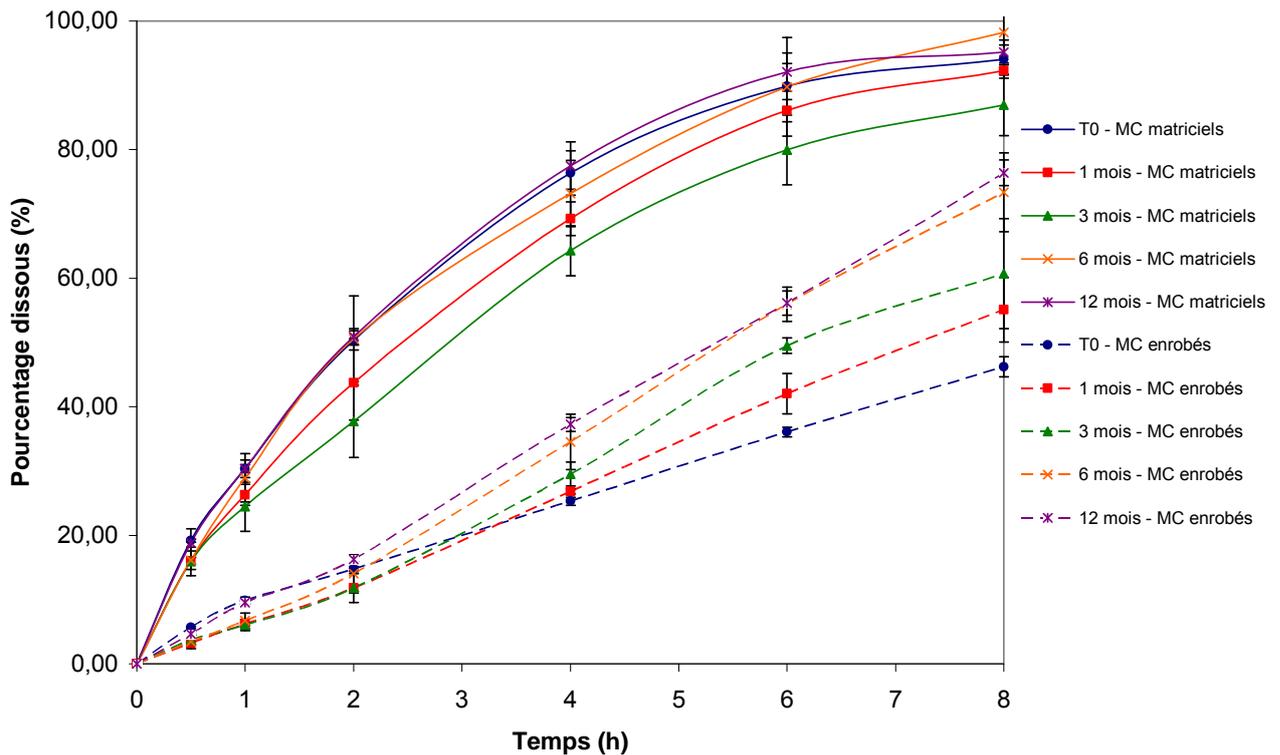


Figure 62 : Profils de dissolution de la carbidopa au cours du temps en fonction du stockage à 25±2°C / 60±5% HR (n=5)

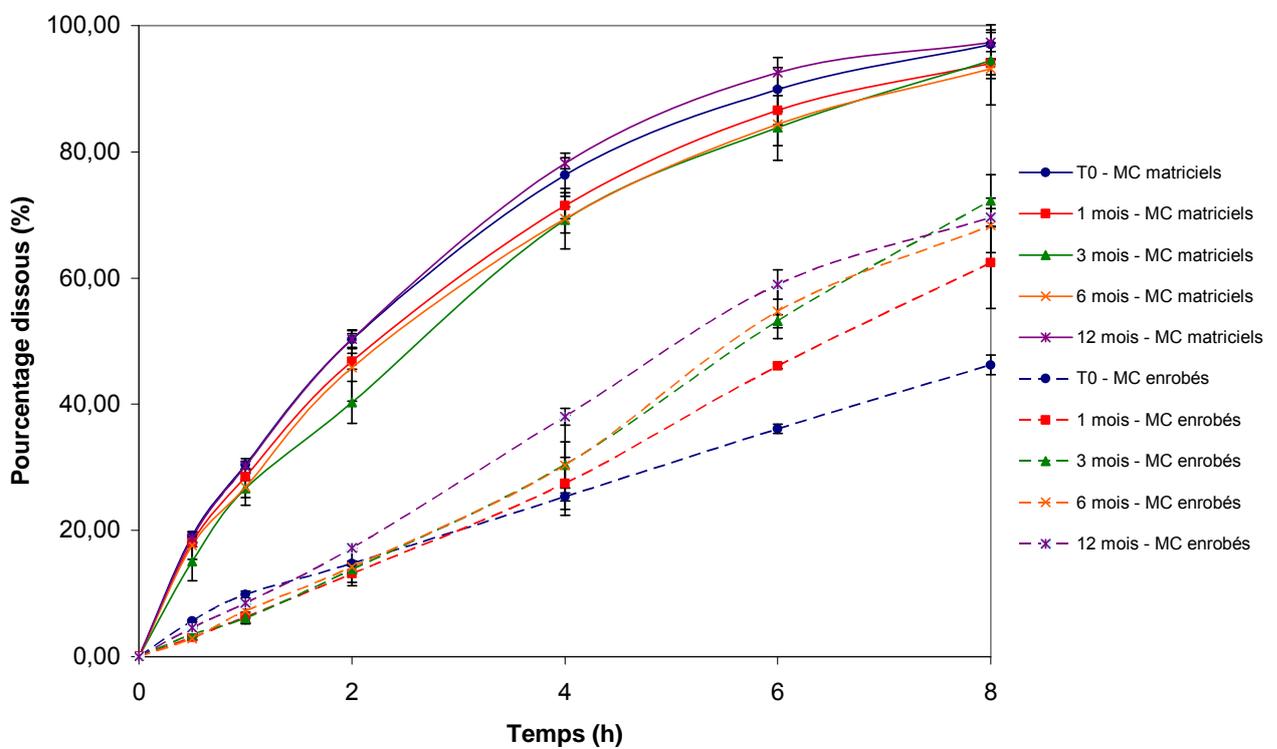


Figure 63 : Profils de dissolution de la carbidopa au cours du temps en fonction du stockage à 30±2°C / 65±5% HR (n=5)

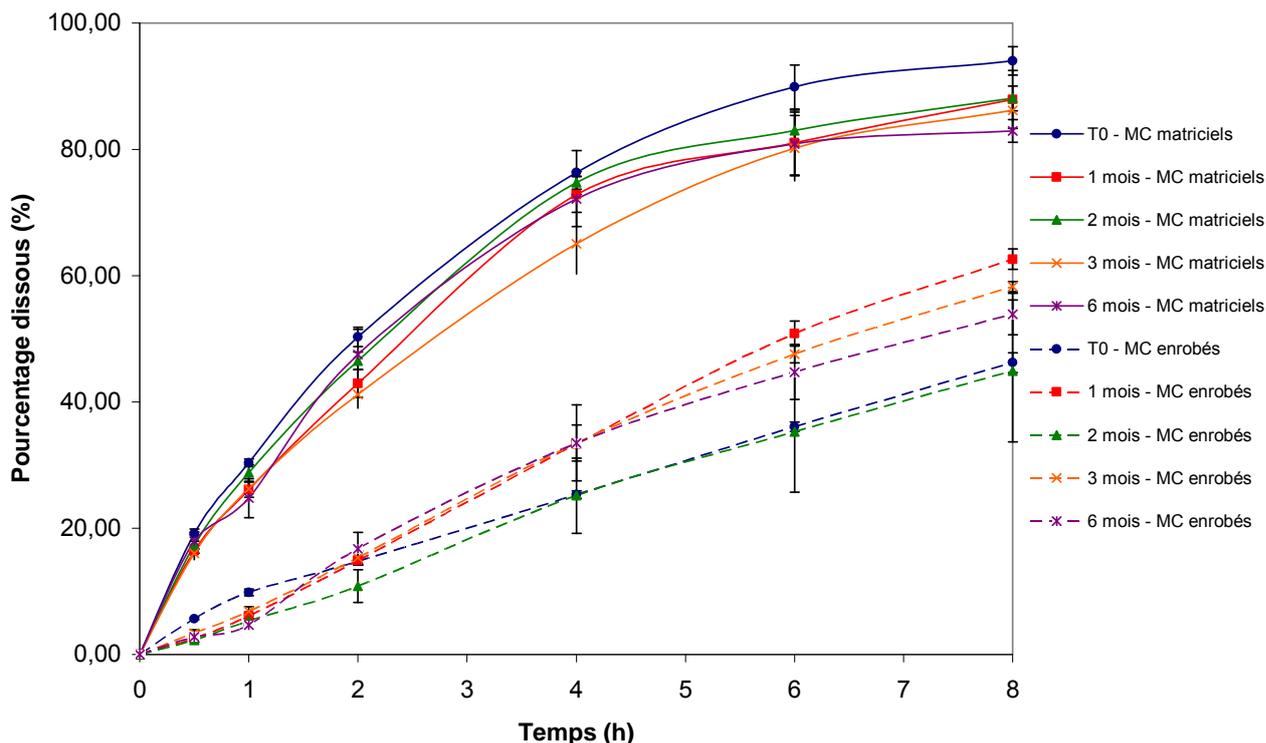


Figure 64 : Profils de dissolution de la carbidopa au cours du temps en fonction du stockage à $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\pm 5\%$ HR (n=5)

Mini-comprimés matriciels

Quel que soit le PA, aucun burst effect n'est apparu au cours du temps. De plus, les conditions de stockage n'ont pas influencé l'allure des profils de dissolution des PA. En effet, comme au temps 0, la libération de la levodopa et de la carbidopa s'est prolongée pendant 8 heures après 1, 2, 3, 6 et 12 mois de stockage aux 3 conditions prescrites. De même, toutes les courbes de dissolution obtenues aux temps d'analyses sont restées statistiquement similaires ($f_2 > 50$) à celle relevée au temps 0 (**Tableau 29**).

Mini-comprimés enrobés

Comme observé avec les mini-comprimés matriciels, les courbes de dissolution de la levodopa et de la carbidopa obtenues après 1, 2, 3, 6 et 12 mois de stockage sont restées statistiquement similaires à celle relevée au temps 0 (**Tableau 29**). Les essais de dissolution ne sont pas prolongés au-delà de 8 heures car, les tests se réalisant à 100 rpm,

l'enrobage se fragilisait plus rapidement qu'au cours des essais de développement où la vitesse de rotation des pales était fixée à 50 rpm. Or, cette fragilisation étant aléatoire, il aurait été difficile d'affirmer avec certitude qu'une éventuelle différence de profil de dissolution aurait été la conséquence directe d'une évolution liée aux conditions de stockage. En effet, comme observé pendant les essais préliminaires, l'augmentation progressive des écarts types au cours du temps démontre une variabilité croissante de la dissolution du PA. Or, il a été démontré précédemment qu'une diminution de l'intégrité de l'enrobage était responsable de ce phénomène [Goole et col., 2008a].

Tableau 29 : Facteurs f_2 de similarité des courbes de dissolution de la levodopa et la carbidopa à partir des MC non enrobés et enrobés après 1, 2, 3, 6 et 12 mois par rapport au profil obtenu au temps 0.

		MC matriciels		MC enrobés	
		Levodopa	Carbidopa	Levodopa	Carbidopa
25°C / 60% HR	1 mois	75.6	80.1	83.4	79.6
	3 mois	69.1	67.4	68.3	68.8
	6 mois	72.9	90.1	60.4	57.9
	12 mois	95.2	97.1	58.6	56.1
30°C / 65% HR	1 mois	83.3	86.1	69.7	70.0
	3 mois	75.8	73.9	59.2	60.0
	6 mois	77.6	80.7	66.0	61.5
	12 mois	95.1	96.3	65.0	57.8
40°C / 75% HR	1 mois	74.7	76.8	66.2	65.9
	2 mois	80.8	82.4	88.7	88.4
	3 mois	69.9	69.8	71.6	70.8
	6 mois	68.3	73.0	75.6	74.7

IV.2.3. Evaluation des propriétés de flottaison

Les mini-comprimés contenant un mélange effervescent, l'humidité relative pouvait influencer leurs propriétés de flottaison au cours du stockage. Les profils de PR des mini-comprimés enrobés et non enrobés ont donc été relevés aux temps prescrits par les normes ICH à chaque condition de température et d'humidité relative (Figures 65, 66 et 67). Le délai de flottaison, le PR maximal et les forces de flottaison relevés après 13h de test ont été utilisés comme paramètres de référence pour évaluer l'évolution des propriétés de flottaison des mini-comprimés. Les écarts types n'ont pas été indiqués sur les figures afin de faciliter leur lecture. De même, ils n'ont pas été incorporés dans un tableau en raison des trop nombreuses valeurs disponibles. Toutefois, comme déjà observé lors du développements des formes [Goole et col., 2007, 2008a, 2008b], les écarts types étaient compris entre 0 et 15 mg/100mg. Ainsi, lorsque nous citerons une valeur de PR, il faudra prendre en considération l'approximation liée aux déviations standards.

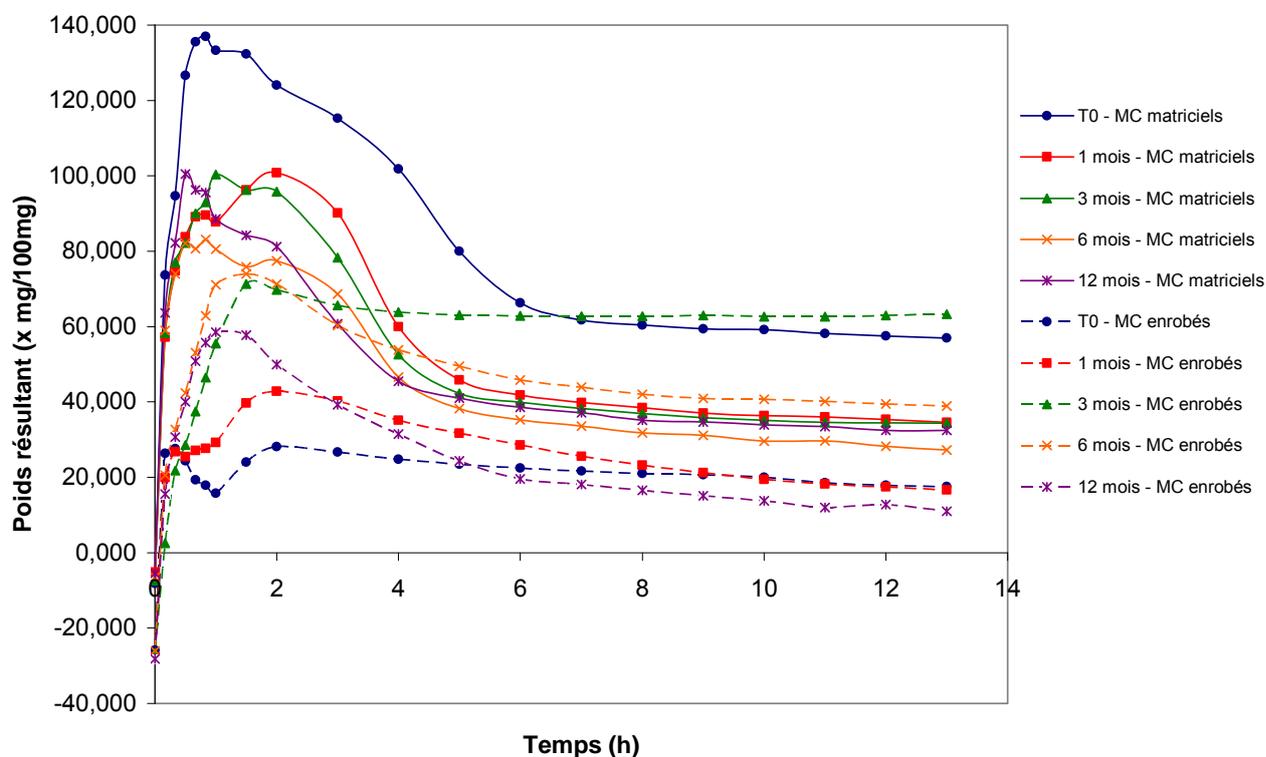


Figure 65 : Profils de poids résultant des mini-comprimés matriciels et enrobés, relevés en fonction du temps aux conditions de stockage 25±2°C / 60±5% HR (n=3)

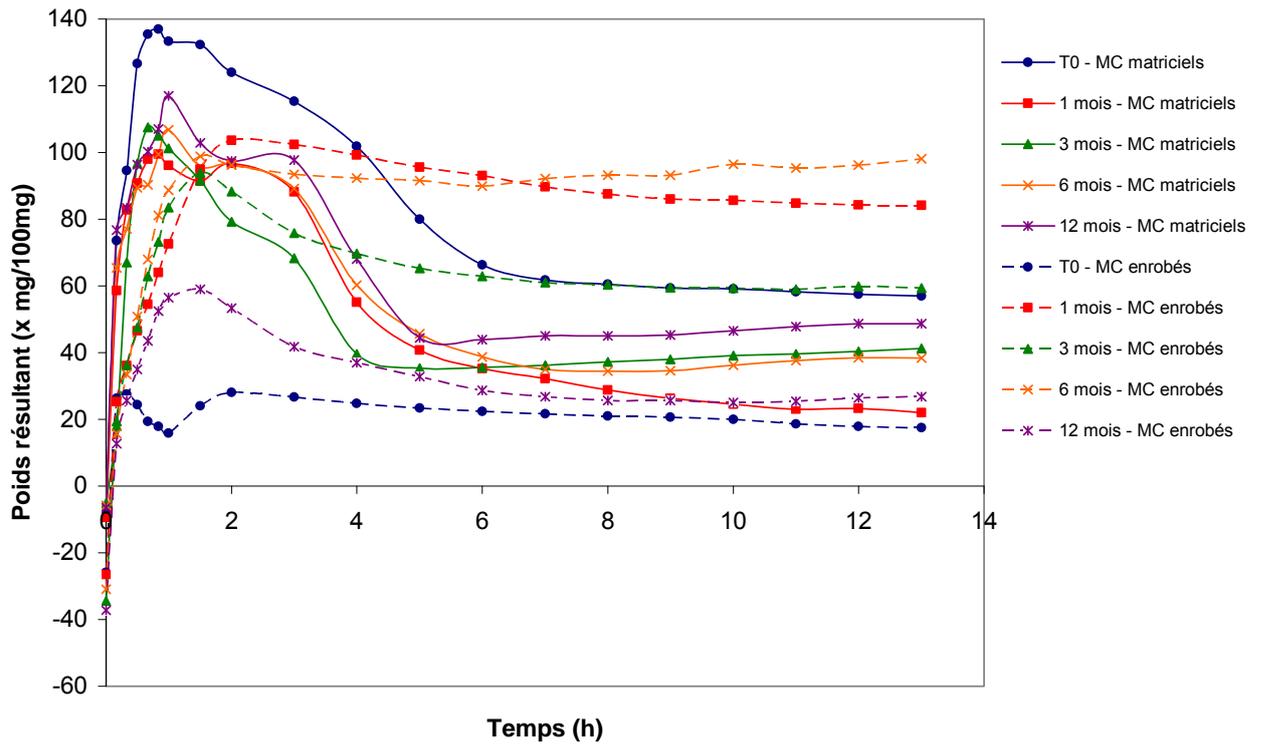


Figure 66 : Profils de poids résultant des mini-comprimés matriciels et enrobés, relevés en fonction du temps aux conditions de stockage 30±2°C / 65±2% HR (n=3)

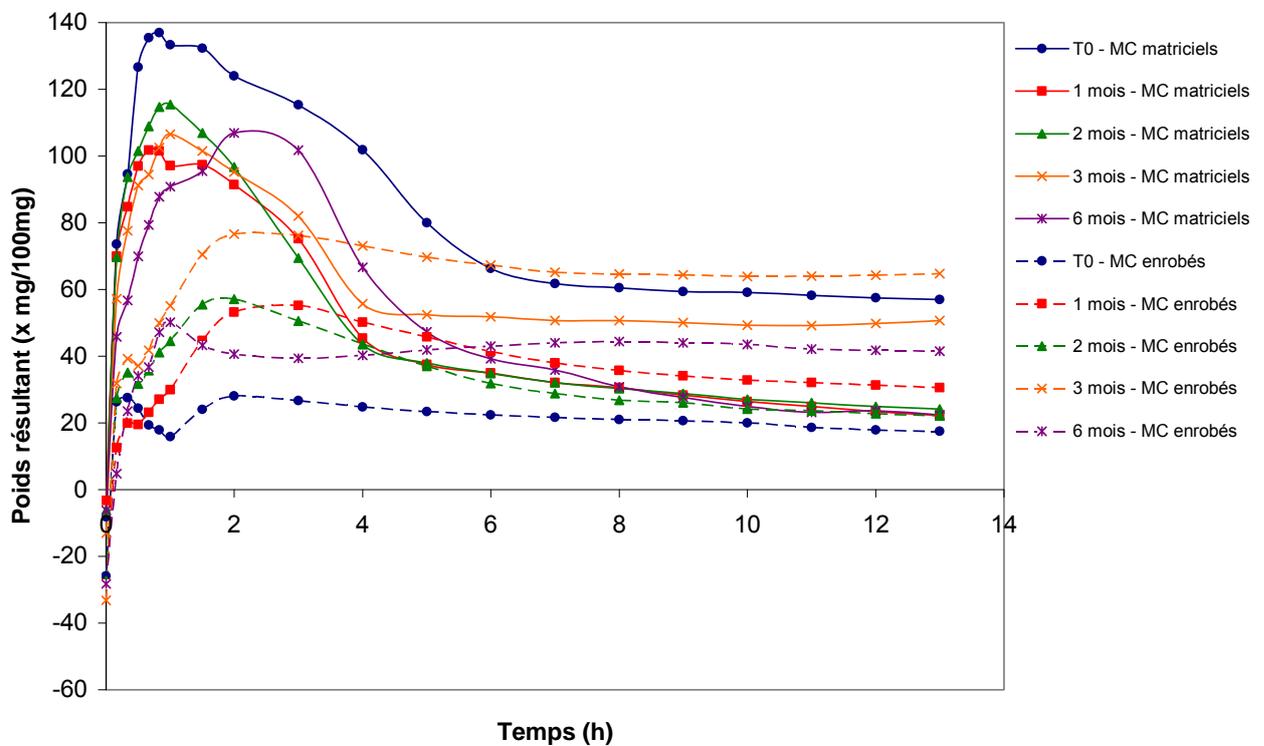


Figure 67 : Profils de poids résultant des mini-comprimés matriciels et enrobés, relevés en fonction du temps aux conditions de stockage 40±2°C / 75±5% HR (n=3)

Mini-comprimés matriciels

Le délai de flottaison est resté inférieur à 10 min au cours du temps, quelles que soient les conditions de stockage. Toutefois, les forces de flottaison ont diminué après 1 mois, mais sont restées stables passé ce délai, aux 3 conditions de stockage. De plus, il semble que la température et l'humidité relative aient influencé l'intensité de cette diminution. En effet, même si la réduction du PR maximal a été identique dans les 3 conditions (pertes d'environ 40 mg/100mg après le premier mois), l'importance de la diminution des valeurs de PR après 13 heures de test semble avoir augmenté avec la température - 20mg/100mg à $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$ HR ; 30mg/100mg à $30\pm 2^\circ\text{C}/65\pm 2\%$ HR et 40 mg/100mg à $40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%$ HR.

Mini-comprimés enrobés

Le délai de flottaison est resté inférieur à 10 min au cours du temps, quelles que soient les conditions de stockage. Toutefois, les valeurs de PR ont évolué pendant les 3 premiers mois pour atteindre une augmentation d'environ 50mg/100mg, 80mg/100mg et 50mg/100mg par rapport au temps 0, respectivement à $25\pm 2^\circ\text{C}$, $30\pm 2^\circ\text{C}$ et $40\pm 2^\circ\text{C}$. Après 6 mois, l'augmentation des valeurs de PR par rapport au temps 0 ne s'élevait plus qu'à 20mg/100mg, 40mg/100mg et 20mg/100mg, respectivement à $25\pm 2^\circ\text{C}$, $30\pm 2^\circ\text{C}$ et $40\pm 2^\circ\text{C}$. Même si, nous avons obtenu de plus grandes valeurs de PR après 6 mois par rapport au temps 0, il semble qu'un stockage prolongé soit néfaste à la flottaison. En effet, après 12 mois à 25 et 30°C , les valeurs de poids résultants ont encore baissé par rapport à celles observées après 6 mois de stockage.

Cette évolution positive des valeurs de poids résultant pendant les 3 premiers mois de stockage, quelles que soient la température et l'humidité, n'est pas acceptable. Ce problème pourrait venir des mauvaises conditions de mûrissement du film. En effet, l'humidité n'étant pas contrôlée, il était impossible de standardiser parfaitement cette étape. Une solution possible serait donc d'effectuer le mûrissement à température et humidité contrôlée. De plus, il serait peut-être utile de conditionner les mini-comprimés dans des gélules en HPMC plutôt qu'en gélatine car cette dernière est plus hygroscopique et contient plus d'eau.

IV.3. Conclusion

Nous avons constaté une diminution significative des teneurs en levodopa et carbidopa après 6 mois de stockage à 40°C à partir des mini-comprimés matriciels. Cette diminution de teneur ne s'étant pas produite en présence d'un enrobage, il semble que ce dernier ait joué un rôle protecteur, favorisant ainsi la stabilité des PA. Toutefois, afin de limiter un maximum l'incidence d'une possible oxydation des groupements phénoliques, il serait peut-être utile d'incorporer un agent anti-oxydant à la formulation. De même, les mini-comprimés pourraient être conditionnés sous courant d'azote afin de réduire leur exposition à l'oxygène. Ces propositions ne constituent que des hypothèses de travail et ne deviendraient judicieuses qu'après étude approfondie de la dégradation de la levodopa et la carbidopa sous forme sèche.

Quelle que soient la forme galénique et pour les 3 conditions de stockage, les profils de dissolution sont restés statistiquement similaires à ceux relevés directement après production. Après 12 mois, une évolution de la cinétique de libération des PA, et donc de la réponse thérapeutique, n'est donc pas à craindre.

A l'opposé, les propriétés de flottaison des mini-comprimés évoluent en fonction du temps et des conditions de stockage. Les forces de flottaison des mini-comprimés matriciels régressent après le premier mois pour ensuite rester stables pendant les 11 mois restants. Les mini-comprimés enrobés ont évolué d'un mois à l'autre, quelles que soient les conditions de stockage. Toutefois, après 6 mois, le délai de flottaison est resté identique quelles que soient les conditions de stockage et le PR maximal, ainsi que celui relevé après 13 heures, sont supérieurs à ceux observés directement après production. Pour résoudre ces problèmes, plusieurs solutions peuvent être envisagées. Une première consiste à contrôler l'humidité relative lors de l'étape de mûrissement du film d'enrobage. Une deuxième serait de placer les mini-comprimés dans une gélule en HPMC plutôt qu'en gélatine, cette dernière étant plus hygroscopique. Une autre solution serait de conditionner les mini-comprimés à l'abri de l'humidité sous atmosphère inerte.

CONCLUSIONS GENERALES

Afin de résoudre les problèmes de variabilité consécutifs à l'administration de formes monolithiques, des mini-comprimés flottants à libération prolongée ont été développés. Pour rappel, notre but était de concevoir une forme divisée capable de flotter dans l'estomac pendant une période de temps prolongée tout en assurant la délivrance constante et progressive du principe actif. Ces mini-comprimés devaient fournir une bonne flottaison et une libération prolongée pour divers principes actifs. Nous avons également essayé d'augmenter au maximum la teneur en PA afin réduire le nombre de mini-comprimés à incorporer dans une gélule. L'administration d'une gélule de plus petite taille étant plus facilement tolérée par le patient.

L'utilisation de la granulation thermoplastique suivie d'une compression directe a permis d'obtenir un procédé de fabrication rapide et peu coûteux. La composition des mini-comprimés était très simple puisqu'ils ne contenaient au minimum qu'un PA, un agent liant et un mélange effervescent favorisant la flottaison. La levodopa a d'abord été choisie comme modèle de PA hydrosoluble car elle possède une fenêtre d'absorption étroite au niveau du duodénum et un temps de demi-vie plasmatique relativement court.

La première forme développée renfermait un agent gélifiant cellulosique capable de retenir le dioxyde de carbone généré tout en assurant la libération prolongée du principe actif. Contrairement à la Prolopa® HBS 125, les mini-comprimés matriciels n'ont jamais présenté de problème de fragmentation ou de « désintégration » lors des essais de dissolution. Ils ont également montré une bonne robustesse aux variations de pH et d'agitation. Les mini-comprimés matriciels étaient caractérisés par un faible délai de flottaison (± 1 min.) quel que soit le pH (1.2 ou 3.0), des forces de flottaison élevées et une durée totale de flottaison supérieure à 13 heures. Une évaluation par la technique du poids résultant a montré qu'ils généraient des forces de flottaison supérieures à la spécialité commercialisée Prolopa® HBS 125.

Suite aux bons résultats obtenus *in vitro*, une étude préliminaire *in vivo* a été effectuée sur des sujets volontaires sains. La riboflavine a été préférée à la levodopa comme modèle hydrosoluble en raison du caractère non invasif des prélèvements (dosages urinaires). Même si nous n'avons pas pu conclure statistiquement, l'hypothèse

selon laquelle les mini-comprimés flottants offrent une rétention gastrique supérieure à celle obtenue avec les mini-comprimés non flottants semblait avoir été vérifiée.

Une seconde technologie a ensuite permis de remplacer l'agent gélifiant par un enrobage capable de maintenir le dioxyde de carbone à l'intérieur de la forme tout en assurant la libération prolongée du PA. Un agent plastifiant peu hydrosoluble - ATEC - a permis d'obtenir un film élastique résistant aux tensions engendrées par la génération du CO₂. En appliquant une teneur équivalente à 20% (m/m) d'enrobage autour du noyau, la libération de la levodopa n'a pas été retardée et s'est prolongée pendant plus de 20 heures sans variation de cinétique. Ces mini-comprimés ont flotté en 20 minutes à pH 1.2 et ont conservé leurs propriétés de flottaison pendant plus de 13 heures.

Le but défini en début de développement, n'étant pas encore atteint, l'incorporation de lactose au sein de l'enrobage a permis d'augmenter la vitesse de libération de la levodopa. De plus, en augmentant la teneur en acide dans le mélange effervescent, les mini-comprimés ont flotté en 10 minutes et pendant plus de 13 heures, à pH 1.2 et pH 3.0.

Ainsi, deux nouvelles formes de mini-comprimés flottants - *matricielles et enrobées* - ont été développées et optimisées avec succès. Il devenait ensuite intéressant d'évaluer leurs propriétés de flottaison et leurs capacités de libérer le PA de façon prolongée en y incorporant d'autres PA que la levodopa ou la riboflavine.

Cette partie du travail a démontré qu'à partir des mini-comprimés enrobés, un retard de libération pouvait survenir en fonction de la molécule incorporée. A l'inverse, les profils de dissolution obtenus à partir des mini-comprimés matriciels n'ont pas été influencés par la taille moléculaire de la substance. Les valeurs de poids résultant obtenues à partir des mini-comprimés matriciels et enrobés ont été largement influencées par le PA incorporé - *propriétés physico-chimiques, teneur*.

Il est donc nécessaire d'adapter la formulation en fonction des caractéristiques du PA afin d'optimiser l'efficacité de la libération prolongée et la flottaison des mini-comprimés.

Une étude pharmacoscintigraphique a finalement été réalisée sur les mini-comprimés matriciels et enrobés contenant une association de levodopa et de carbidopa. Cette étude a permis de comparer le temps de résidence gastrique des mini-comprimés par rapport à celui fourni par la Prolopa® HBS 125. L'ASC, la C_{\max} et le T_{\max} de la levodopa et de la carbidopa ont également été évalués afin d'être comparés aux valeurs obtenues après administration de la Prolopa® HBS 125.

Comme le système HBS™, les mini-comprimés – *matriciels et enrobés* – ont présenté un temps de résidence gastrique supérieur à 4 heures. Ils ont également fourni des concentrations plasmatiques soutenues en levodopa et carbidopa pendant plus de 12 heures. La courbe plasmatique de la levodopa obtenue à partir des mini-comprimés enrobés était similaire à celle obtenue après administration de la Prolopa® HBS 125. Dans les 2 cas, les concentrations plasmatiques en levodopa ont augmenté rapidement après 3 heures. Ce phénomène est sans dû aux phénomènes de désintégration observés *in vitro* et pas scintigraphie. Ces problèmes de désintégration étant difficilement contrôlable, la seule solution serait d'augmenter la teneur en enrobage. Néanmoins, cette solution présente des limitations car elle risquerait d'accroître dangereusement le délai de flottaison. Toutefois, comparativement à la bensérazide, les concentrations plasmatiques en carbidopa étaient supérieures et présentaient moins de variations en fonction du sexe. Les mini-comprimés matriciels ont fourni des résultats – ASC, C_{\max} , T_{\max} – moins variables en fonction du sexe. La maladie de Parkinson affectant autant les hommes que les femmes, une forme capable d'engendrer des concentrations plasmatiques indépendantes du sexe permettrait de faciliter la mise en place d'un traitement unique. De plus, ils n'ont présenté aucune désintégration intra-gastrique, ce qui permet d'éviter l'apparition d'effet de pic au niveau des concentrations plasmatiques en levodopa, réduisant ainsi le risque de stimulation pulsatiles des récepteurs dopaminergiques responsables de l'apparition de phénomènes *on-off* en cours de traitement. Toutefois, la biodisponibilité de la levodopa à partir de ces formes était inférieure à celle obtenue à partir des mini-comprimés enrobés et de la Prolopa® HBS 125. Une solution pratique pour résoudre ce problème serait de réduire la quantité d'agent gélifiant afin d'augmenter la vitesse de libération de la levodopa ou d'accroître d'avantage le temps de résidence gastrique ou de moduler la teneur en mélange effervescent afin d'augmenter le temps de résidence gastrique. En

effet, une faible biodisponibilité pourrait venir du fait que les mini-comprimés soient vidangés de l'estomac avant libération complète de l'agent actif.

Finalement, des études de stabilité ont été réalisées sur les mini-comprimés matriciels et enrobés contenant une association de levodopa et de carbidopa. Les teneurs en PA, ainsi que les profils de dissolution et de flottaison sont restés similaires pendant un an à $25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$ HR et à $30\pm 2^\circ\text{C}/65\pm 5\%$ HR. A $40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%$, seules les teneurs en PA contenus dans les mini-comprimés matriciels ont diminué de façon significative après 6 mois de stockage. Pour résoudre ce problème, un agent anti-oxydant pourrait être incorporé dans la formulation. Le conditionnement des mini-comprimés devrait se faire en atmosphère inerte, dans des gélules en HPMC, moins hygroscopiques que la gélatine.

En conclusion, nous avons développé avec succès deux concepts de mini-comprimés flottants à libération prolongée. Les deux concepts de mini-comprimés enrobés ont montré un temps de résidence gastrique accru. Toutefois, la variabilité liée à la fragilisation de l'enrobage limite sérieusement le développement futur des mini-comprimés enrobés. A l'inverse, les mini-comprimés flottants matriciels offrent d'excellentes perspectives. De composition simple, leur production industrielle devrait être aisée en raison de leur méthode de fabrication facilement transposable. De plus, comme il est possible d'y incorporer différentes catégories de PA en teneur élevée, ils pourraient être utilisés dans le traitement de diverses pathologies. L'absence de fragmentation limite la variabilité inter et intra-individuelle. La libération du ou des PA peut être modulée en fonction de la teneur en agent gélifiant. Enfin, leurs très bonnes propriétés de flottaison font des mini-comprimés matriciels, une alternative d'avenir aux systèmes HBS™.

BIBLIOGRAPHIE

- Agyilirah** G.A., Green M., DuCret R., Banker G.S., **1991**, Evaluation of the gastric retention properties of a cross-linked polymer coated tablet versus those of a non-disintegrating tablet, *Int. J. Pharm.* 75, 241
- Amighi** K., **1995**, Etude de l'influence des paramètres de formulation, de fabrication et de conservation sur les propriétés de formes orales multi-unitaires à libération prolongée, enrobées à l'aide de dispersions aqueuses de polymères acryliques, Thèse présentée à l'Université Libre de Bruxelles en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences pharmaceutiques.
- Amighi** K., Moës A-J, **1996**, Influence of plasticizer concentration and storage conditions on the drug release rate from Eudragit® RS30D Film-coated sustained-release theophylline pellets, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 42, 29-35
- Amighi** K., Moës A-J., **1997**, Influence of curing conditions on the drug release rate from Eudragit NE30D film coated sustained-release theophylline pellets, *S.T.P. Pharma Sci.* 7, 141-147
- Amighi** K., **2007a**, In: *Biopharmacie et Biodisponibilité; Cours de Pharmacie Galénique et Biopharmacie*, Université Libre de Bruxelles, p.66
- Amighi** K., **2007b**, In: *Formes à action ou à libération modifiée ; Cours de Pharmacie Galénique et Biopharmacie*, Université Libre de Bruxelles, p.7
- Anadon** A., Martinez-Larranaga M.R., Iturbe J., Martinez M.A., Diaz M.J., Frejo M.T., Mertinez M., **2001**, Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens, *Res. Vet. Sci.* 71, 101-109
- Ansari** M., Kazemipour M., Aklamli M., **2006**, The study of drug permeation through natural membranes, *Int. J. Pharm.* 327, 6-11
- Atyabi** F., Sharma H.L., Mohammad H.A.H., Fell J.T., **1994**, A novel floating system using ion exchange resins, *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 21, 806-807
- Atyabi** F., Sharma H.L., Mohammad H.A.H., Fell J.T., **1996**, Controlled drug release from coated floating ion exchange resin beads, *J. Control. Release* 42, 25-28
- Bannister** L.H., **1995**, Alimentary system, in: P.L. Williams (ed.) *Gray's Anatomy*, XXXVIII, Churchill Livingstone, New York, 125-156
- Bardin** M., Knight P.C., Seville J.P.K., **2004**, On control of particle size distribution in granulation using high-shear mixers, *Powder Tech.* 140, 169-175
- Baumgartner** S., Kristl J., Vrečer F., Vodopivec P., Zorko B., **2000**, Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time, *Int. J. Pharm.* 195, 125-135
- Bechgaard** H., Christensen F.N., Davis S.S., **1985**, Gastrointestinal transit of pellet systems in ileostomy subjects and the effect of density, *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 718-723

- Bezard** E., Brotchie J.M., Gross C.E., **2001**, Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia : potential for new therapies, *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 577-588
- Bindschaedler** C., Gurny R., Doelker E., **1983**, Notions théoriques sur la formation de films obtenus à partir de microdispersions aqueuses et application à l'enrobage, *Labo Pharma Probl. Tech.* 31, 389-394
- Bodmeier** R., Paeratakul O., **1992**, Leaching of water-soluble plasticizers from polymeric films prepared from aqueous colloidal polymer dispersions, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18, 1865-1882
- Bodmeier** R., Paeratakul O., **1993**, Dry and wet strengths of polymeric films prepared from an aqueous colloidal polymer dispersion, *Eudragit RS30D*, *Int. J. Pharm.* 96, 129-138
- Bolton** S., Desai S., **1989**, Floating sustained-release therapeutic compositions, *US Patent* 4, 814, 179
- Burch** H.B., Bessey O.A., Lowry O.H., **1948**, Fluorimetric measurements of riboflavin and its natural derivatives in small quantities of blood, serums and cells, *J. Biol. Chem.* 175, 457-470
- Bugarelli** E., Forni F., Bernabei M.T., **2000**, Effect of matrix composition and process conditions on casein-gelatin beads floating properties, *Int. J. Pharm.* 198, 157-165
- Burton** S., Washington N., Steele R.J.C., Russon R., Fehly L., **1995**, Intra-gastric distribution of ion-exchange resins: a drug delivery system for the topical treatment of the gastric mucosa, *J. Pharm. Pharmacol.* 47, 901-906
- Chang** R.K., Price J.C., Hsiao Ch., **1989**, Preparation and preliminary evaluation of Eudragit® RL/RS pseudolatices for controlled drug release, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15, 361-372
- Chavanpatil** M., Jain P., Chaudhari S., Shear R., Vavia P., **2005**, Development of sustained-release gastroretentive drug delivery system for ofloxacin: *In vitro* and *in vivo* evaluation, *Int. J. Pharm.* 304, 178-184
- Chen** X., Zhang J., Zhai H., Chen X., Hu Z., **2005**, Determination of levodopa by capillary zone electrophoresis using an acidic phosphate buffer and its application in the analysis of beans, *Food Chemistry* 92, 381-386
- Coello** J., Maspoch, Villegas N., **2000**, Simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of levodopa and benserazide by bi- and three-way partial least squares calibration, *Talanta* 53, 627-637
- Colombo** P., Santi P., Bettini R., Brazel C.S., **2000**, Drug Release from Swelling-Controlled Systems, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences : Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, New York, 183-209
- Coupe** A.J., Davis S.S., Evans D.F., Wilding I.R., **1991**, Correlation of the gastric emptying of nondisintegrating tablets with gastrointestinal motility, *Pharm. Res.* 8, 1281-1288

- Crevoisier** Ch., Hoevels B., Zürcher G., Da Prada M., **1987**, Bioavailability of levodopa after Madropar[®] HBS administration in healthy subjects, *Eur. Neurol.* 27, 36-46
- Dandelot** M.P., **1990**, Importance des lipases du tractus digestif sur la libération de substances incorporées dans les excipients glycéridiques. Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences pharmaceutiques.
- Davis** D.W., **1968**, Method of swallowing a pill, US Patent 3, 418, 999
- Davis** S.S., Hardy J.G., Taylor M.J., Whalley D.R., Wilson C.C., **1984**, A comparative study of the gastrointestinal transit of a pellet and tablet formulation, *Int. J. Pharm.* 21, 167-177
- Davis** S.S., **1986**, Evaluation of the gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms using the technique of gamma scintigraphy, *S.T.P. Pharma. Sci.* 22, 1015-1022
- Davis** S.S., Christensen F.N., Khosla R., **1988**, Gastric emptying of large single unit dosage forms, *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 205-215
- Deogaonkar** M., Subramanian T., **2005**, Pathophysiological basis of drug-induced dyskinesias in Parkinson's disease, *Brain Res. Rev.* 50, 156-168
- Désévaux** C., Lenaerts V., Girard C., Dubreuil P., **2002**, Characterization of crosslinked high amylose starch matrix implants, *J. Control. Release* 82, 95-103
- Deshpande** A.A., Rhodes C.T., Shah N.H., Malick A.W., **1996**, Controlled-release drug delivery systems for prolonged gastric residence: An overview, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 22, 531-539
- Dolezalova** M., Tkaczykova M., **1999**, Direct high-performance liquid chromatographic determination of the enantiometric purity of levodopa and methyl dopa: comparison with pharmacopoeial polarimetric methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19, 555-567
- Dressman** J.B., Berardi R.R., Dermentzoglou L.C., Russel T.L., Schmaltz S.P., Barnett J.L., Jarvenpaa K.M., **1990**, Upper gastrointestinal pH in young, healthy men and women, *Pharm. Res.* 7, 756-761
- Duvoisin** R.C., **1974**, Variation in the "on-off" phenomenon, *Adv. Neurol.* 5, 339-340
- El-Gibaly** I., **2002**, Development and *in vitro* evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres, *Int. J. Pharm.* 249, 7-21
- El-Kamel** A.H., Sokar M.S., Al Gamal S.S., Naggar V.F., **2001**, Preparation and evaluation of ketoprofen floating oral delivery system, *Int. J. Pharm.* 220, 13-21

- Evrard** B., Amighi K., Beten D., Delattre L., Moës A-J., **1999**, Influence of melting and rheological properties of fatty binders on the melt granulation process in a high-shear mixer, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25, 1177-1184
- Fahn** S., **1998**, Medical treatment of Parkinson's disease, *J. Neurol.* (suppl 3), 15-24
- Ferrero** Rodriguez C., Bruneau N., Barra J., Alfonso D., Doelker E., **2000**, In : *Hydrophilic Cellulose Derivatives as Drug Delivery Carriers*, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences : Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, New York, 1-30
- Firestone** B.A, Dickason M.A., Tran T., **1998**, Solubility characteristics of three fluorouinolone ophthalmic solutions in an *in vitro* tear model, *Int. J. Pharm.* 164, 119-128
- Follonier** N., Doelker E., **1992**, Biopharmaceutical comparison of oral multiple-unit and single-unit sustained-release dosage forms, *S.T.P. Pharma Sci.* 2, 141-158
- Forte** G., Alimonti A., Violante N., Di Gregorio M., Senofonte O., Petrucci F., Sancesario G., Bocca B., **2005**, Calcium, copper, iron, magnesium, silicon and zinc content of hair in Parkinson's disease, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 195-201
- Fraix** V., **2004**, Gene therapy for Parkinson's disease, *La revue de médecine interne* 25, 524-527
- Franz** M.R., Oth M.P., **1993**, Sustained-release bilayer buoyant dosage form, *US Patent* 5, 232, 704
- Fuh** J-L, Lee R-C, Wang S-J, Lin C-H, Wang P-N, Chiang J-H, Liu H-C, **1997**, Swallowing difficulty in Parkinson's disease, *Clin. Neur. Neurosur.* 99, 106-112
- Fukunaka** T., Yaegashi Y., Nunoko T., Ito R., Golman B., Shinohara K., **2006**, Dissolution characteristics of cylindrical particles and tablets, *Int. J. Pharm.* 310, 146-153
- Fukumori** Y., Yamaoka Y., Ichikawa H., Takeuchi Y., Fukuda T. & Osako Y., **1988**, Coating of pharmaceutical powders by fluidized-bed process. IV. Softening temperature of acrylic copolymers and its relation to film-formation in aqueous coating, *Chem. Pharm. Bull.* 36, 4927-4932
- Goole** J., Hamdani J., Vanderbist F., Amighi K., **2006**, *In vitro* and *in vivo* evaluation in healthy human volunteers of floating riboflavin minitables, *J. Drug Del. Sci. Tech.* 16, 351-356
- Goole** J., Vanderbist F., Amighi K., **2007**, Development and evaluation of new multiple-unit levodopa sustained-release floating dosage forms, *Int. J. Pharm.* 334, 35-41

- Goole** J., Deleuze Ph., Vanderbist F., Amighi K., **2008a**, New levodopa sustained-release floating minitabets coated with insoluble acrylic polymer, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 310-318
- Goole** J., Vanderbist F., Amighi K., **2008b**, Evaluation and floating enhancement of levodopa sustained-release floating minitabets coated with insoluble acrylic polymer, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *In press*
- Goole** J., Vanderbist F., Amighi K., **2008c**, *In vitro* evaluation of two concepts of sustained release floating minitabets according to the model drug used, *J. Drug Del. Sci. Tech.* 18, 133-138
- Guo** J-H, **1994**, An investigation into the formation of plasticizer channels in plasticized polymer films, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20, 1883-1893
- Gutiérrez** - Rocca J.C., McGinity J.W., **1994**, Influence of water soluble and insoluble plasticizers on the physical and mechanical properties of acrylic resin copolymers, *Int. J. Pharm.* 103, 293-301
- Hamdani** J., Moës A.J., Amighi K., **2002**, Development and evaluation of prolonged release pellets obtained by the melt pelletization process, *Int. J. Pharm.* 245, 167-177
- Hamdani** J., Moës A.J., Amighi K., **2003**, Physical and thermal characterization of Precirol and Compritol as lipophilic glycerides used for the preparation of controlled-release matrix pellets, *Int. J. Pharm.* 260, 47-57
- Hamdani** J., **2005**, Développement de formes orales divisées à libération prolongée par la technique de la pelletisation thermoplastique, Thèse présentée à l'Université Libre de Bruxelles en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences pharmaceutiques.
- Hamdani** J., Moës A.J., Amighi K., **2006**, Development and *in vitro* evaluation of a novel floating multiple unit dosage form obtained by melt pelletization, *Int. J. Pharm.* 322, 96-103
- Harland** R.S., Gazzaniga A., Sangalli M.E., Colombo P., Peppas N.A., **1988**, Drug/polymer matrix swelling and dissolution, *Pharm. Res.* 5, 488-494
- Harrigan** R.M., **1977**, Drug delivery device for preventing contact of undissolved drug with the stomach lining, US Patent 4, 055, 178
- Harris** D., Fell J.T., Sharma H.L., Taylor D.C., **1990**, GI transit of potential bioadhesive formulations in man: a scintigraphic study, *J. Control. Release* 12, 45-62
- Hasan** B.A., Khalaf K.D., De La Guardia M., **1995**, Flow analysis-spectrophotometric determination of L-Dopa in pharmaceutical formulations by reaction with p-aminophenol, *Talanta* 42, 627-633
- Helliwell** M., **1993**, The use of bioadhésives in targeted delivery within the gastrointestinal tract, *Adv. Drug Del. Rev.* 11, 257-278

- Hoener** B-A., Benet L.Z., **2002**, In: Factors Influencing Drug Absorption and Drug Availability, Drugs and the Pharmaceutical Sciences: Modern Pharmaceutics, Volume 121, Ed. G.S. Banker, C.T. Rhodes, Marcel Dekker, New York, 93-117
- Hoffman** A., Stepensky D., **1999**, Pharmacodynamic aspects of mode of drug administration for optimization of drug therapy, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 16, 571-639
- Hoffman** A., Stepensky D., Lavy A., Eyal S., Klausner E., Friedman M., **2004**, Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms, Int. J. Pharm. 277, 141-153
- Hogan** J.E., **1982**, Aqueous versus organic solvent film coating, Int. J. Pharm. Tech. Prod. Manuf. 3, 17-20
- Hörter** D., Dressman J.B., **2001**, Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract, Adv. Drug. Del. Rev. 46, 75-87
- Hou** W-M, Miyazaki S., Takada M., Komai T., **1985**, Sustained release of indomethacin from chitosan granules, Chem. Pharm. Bull. 33, 3986-3992
- Hui** H-W., Robinson J.R. Lee V.H., **1987**, In : Design and Fabrication of Oral Controlled Release Drug Delivery Systems, Drugs and the Pharmaceutical Sciences : Controlled Drug Delivery Fundamentals and Applications, Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, New York, 373-432
- Hwang** S-J, Park H., Park K., **1998**, Gastric retentive drug-delivery systems, Crit. Rev. Th. Drug Car. Sys. 15, 243-284
- Iannuccelli** V., Coppi G., Bernabei M.T., Cameroni R., **1998a**, Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence. Part I. Formulation study, Int. J. Pharm. 174, 47-54
- Iannuccelli** V., Coppi G., Sansone R., Ferolla G., **1998b**, Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence. Part II. *In vivo* evaluation, Int. J. Pharm. 174, 55-62
- Ichikawa** M., Watanabe S., Miyake Y., **1991**, A New Multiple-Unit Oral Floating Dosage System. I: Preparation and *In Vitro* Evaluation of Floating and Sustained-Release Characteristics, J. Pharm. Sc. 80, 1062-1066
- Ingani** H.M., **1987a**, Etude des paramètres de formulation influençant les caractéristiques de libération de principes actifs à partir de matrices hydrophiles à base de gomme xanthane et conception de comprimés matriciels bicouches flottants, Thèse présentée à l'Université Libre de Bruxelles en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences pharmaceutiques.
- Ingani** H.M., Timmermans J., Moës A.J., **1987b**, Conception and *in vivo* investigation of peroral sustained release floating dosage forms with enhanced gastrointestinal transit, Int. J. Pharm. 35, 157-164

- Iveson** S.M., Litser J.D., Hapgood K., Ennis B.J., **2001**, Nucleation, growth and breakage phenomena in agitated wet granulation processes: a review, Powder Tech. 117, 3-39
- Jantzen** G.W., Robinson J.R., **2002**, In: Sustained- and Controlled-Release Drug-Delivery Systems, Drugs and Pharmaceutical Sciences; Modern Pharmaceutics, Ed. G.S. Banker, C.T. Rhodes, Marcel Dekker, New York, 501-528
- Joseph** N.J., Lakshmi S., Jayakrishnan A., **2002**, A floating-type oral dosage form for piroxicam based on hollow polycarbonate microsphere: *in vitro* and *in vivo* evaluation in rabbits, J. Control. Release 79, 71-79
- Kamba** M., Seta Y., Kusai A., Ikeda M., Nishimura K., **2000**, A unique dosage form to evaluate the mechanical destructive force in the gastrointestinal tract, Int. J. Pharm. 208, 61-70
- Kaus** L.C., Fell J.T., Sharma H., **1984**, On the intestinal transit of a single non-disintegrating object, Int. J. Pharm. 20, 315-321
- Kawashiwa** Y., Niwa T., Takeuchi H., Hino T., Ito Y., **1991**, Preparation of multiple unit hollow microspheres (microballoons) with acrylic resin containing tranilast and their drug release characteristics (*in vitro*) and floating behavior (*in vivo*), J. Control. Release 16, 279-290
- Kenyon** C.J., Hooper G., Tierney D., **1995**, The effect of food on the gastrointestinal transit and systemic absorption of naproxen from novel sustained release formulation, J. Control. Release 34, 31-39
- Khosla** R., Davis S.S., **1987**, The effect of polycarbophil on the gastric emptying pellets, J. Pharm. Pharmacol. 39, 23-34
- Khosla** R., Davis S.S., **1990**, Effect of tablet size on the gastric emptying of dosage forms, J. Pharm. Sci. 82, 854-861
- Kiil** S., Dam-Johansen K., **2003**, Controlled drug delivery from swellable hydroxypropylmethylcellulose matrices: model-based analysis of observed radial front movements, J. Control. Release 90, 1-21.
- Kiortsis** S., Kachrimanis K., Broussali Th., Malamataris S., **2005**, Drug release from tableted wet granulations comprising cellulosic (HPMC or HPC) and hydrophobic component, Eur. J. Pharm. Biopharm. 59, 73-83
- Klausner** E.A., Lavy E., Friedman M., Hoffman A., **2003a**, Expandable gastroretentive dosage forms, J. Control. Release 90, 143-162
- Klausner** E.A., Eyal S., Lavy E., Friedman M., Hoffman A., **2003b**, Novel levodopa gastroretentive dosage form: *in-vivo* evaluation in dogs, J. Control. Release 88, 117-126
- Kordower** J.H., Goetz C.G., **1999**, The first miracle in neurodegenerative disease: The discovery of oral levodopa, Brain Res. Bulletin 50, 377-378

- Lee** P.I., Peppas N.A., **1987**, Prediction of polymer dissolution in swellable controlled-release systems, *J. Control. Release* 6, 207-215
- Lehmann** K., **1989**, Chemistry and application properties of polymethacrylate coating system, In: *Aqueous polymeric coating for pharmaceutical dosage forms*, *Drugs and pharmaceutical science*, Volume 36, Ed. Mc Ginity J.W., Marcel Dekker, New York, 153-245
- Lehmann** K., **1993**, Particle coating with acrylic resins, 22nd proceeding of the international colloquium on industrial pharmacy, Gent, 45-58
- Lehmann** K., **1996**, Practical Course in Film Coating of Pharmaceutical Dosage Forms with Eudragit[®], Rohm[®] Pharma
- Levy** G., Hewit R.R., **1971**, Evidence in man for different specialized intestinal transport mechanisms for riboflavin and thiamine, *Am. Clin. Nutr.* 24, 401-404
- Li** V.H., Robinson J.R., Lee V.H., **1987**, In : Influence of Drug properties and routes of drug administration on the design of sustained and controlled release systems, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences : Controlled Drug Delivery Fundamentals and Applications*, Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, New York, 3-61
- Louie-Helm** J., Fell R., Shell J.N., Dye D., Levy G., Gorsline J., Mueller M., Dilger C., Berner B., **2001**, Pharmacokinetics of ciprofloxacin gastric retentive tablets in healthy volunteers, *Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 28, # 6044
- Losi** E., Bettini R., Santi P., Sonvico F., Colombo G., Lofthus K., Colombo P. Peppas N.A., **2006**, Assemblage of novel release modules for the development of adaptable drug delivery systems, *J. Control. Release* 111, 212-218
- Mao** Z., Ma L., Gao C., Shen J., **2005**, Preformed microcapsules for loading and sustained-release of ciprofloxacin hydrochloride, *J. Control. Release* 104, 193-202
- Mardsen** C.D., Parkes J.D., **1977**, Success and problems of long-term L-Dopa therapy in Parkinson's disease, *Lancet*, 345-349
- Mayersohn** M., **2002**, In: Principles of drug absorption, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences: Modern Pharmaceutics*, Volume 121, Ed. G.S. Banker, C.T. Rhodes, Marcel Dekker, New York, 23-66
- Mazer** N., Abisch E., Gfeller J.C., Laplanche R., Bauerfeind P., Cucula M., Lukahich M., Blum A., **1988**, Intragastric behavior and absorption kinetics of a normal and floating modified release capsule of isradipine under fasted and fed conditions, *J. Pharm. Sci.* 77, 647-655
- Michaels** A.S., **1974**, Drug delivery device with self actuated mechanism for retaining device in selected area, US Patent 3, 786, 813

- Michaels** A.S., Bashwa J.D., Zaffaroni A., **1975**, Integrated device for administering beneficial drug at programmed rate, US Patent 3, 901, 232
- Minami** H., McCallum R.W., **1984**, The physiology and pathophysiology of gastric emptying in humans, *Gastroenterol.* 86, 1592-1610
- Minko** T., **2004**, Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates, *Adv. Drug Del. Rev.* 56, 491-509
- Mitra** S.B., **1984**, Sustained release oral medicinal delivery device, US Patent 4, 451, 260
- Moës** A.J., **1989**, Recherche et développement de formes orales à libération contrôlée, *J. Pharm. Belg.* 44, 60-70
- Moës** A.J., **1993**, Gastroretentive drug-delivery systems, *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems* 15, 243-284
- Monville** C., Torres E.M., Dunnett S.B., **2005**, Validation of the L-Dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model and evaluation of the effects of selective dopamine receptor agonists and antagonists, *Brain Research Bulletin* 68, 16-23
- Müller-Lissner** S.A., Blum A.L., **1981**, The effect of specific gravity and eating on gastric emptying of slow-release capsules, *N. Engl. J. Med.* 304, 1365-1371
- Munk** J., Gannaway R., Hoare M., Johnson A., **1978**, In: *Gastrointestinal motility in health and disease*, Ed. H.L. Duthie, MTP Press, Lancaster, 349-359
- Murata** Y., Sasaki N., Miyamoto E., Kawashima S., **2000**, Use of floating alginate gel beads for stomach-specific drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 221-226
- Nagaralli** B.S., Seetharamappa J., Melwanki M.B., **2002**, Sensitive spectrophotometric methods for the determination of amoxicillin, ciprofloxacin and piroxicam in pure and pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biopharm. Anal.* 29, 859-864
- Oth** M., Franz M., Timmermans J., Moës A.J., **1992**, The bilayer floating capsule: a stomach-directed drug delivery system for misoprostol, *Pharm. Res.* 9, 298-302
- Ozturk** A.G., Ozturk S.S., Palson B.O., Wheatley T.A., Dressman J.B., **1990**, Mechanism of release from pellets coated with an ethylcellulose-based film, *J. Control. Release* 14, 203-213
- Patel** V.R., Amiji M.M., **1996**, Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethyleneoxide) hydrogels for site specific antibiotic delivery in the stomach, *Pharm. Res.* 13, 588-593
- Peppas** N.A., Buri P.A., **1985**, Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues, *J. Control. Release* 257, 345-356

- Peppas** N.A., Little M.D., Huang Y., **2000**, In : Bioadhesive Controlled Release Systems, Drugs and the Pharmaceutical Sciences : Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology, Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, New York, 255-266
- Pinder** R.M., Brogden R.N., Sawyer P.R., Speight T.M., Avery G.S., **1976**, Levodopa and Decarboxylase Inhibitors: A Review of their Clinical Pharmacology and Use in the Treatment of Parkinsonism, *Drugs* 11, 329-377
- Pistonesi** M., Centurion M.E., Band B.S.F., Damiani P.C., Olivieri A.C., **2004**, Simultaneous determination of levodopa and benserazide by stopped-flow injection analysis and three-way multivariate calibration of kinetic-spectrophotometric data, *J. Pharm. Bio. Anal.* 36, 541-547
- Pondell** R.E., **1984**, From solvent to aqueous coating, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 10, 191-202
- Porter** S.C., Hogan J.E., **1984**, Tablet film-coating, *Pharm. Int.* 4, 122-127
- Porter** S.C., Ghebre-Sellassie I., **1994**, In: Key factors in the development of modified-release pellets, Multiparticulate oral drug delivery. *Drugs and pharmaceutical science*, vol. 65, Marcel Dekker, Inc., New York, 217-284
- Pro-C-epT** Manuel d'utilisation du Mi-Pro®. Pro-C-epT. Belgique
- Qiu** Y., Zhang G., **2000**, In : Research and development aspects of oral controlled-release dosage forms, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences : Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, New York, 465-504
- Roca** J.G., Shah K.U., **2004**, Gastric Retention of Solid Dosage Form: A Review of the Current Climate, *AAPS Newsmagazine*, 22-23
- Ross** D.L., Riley C.M., **1990**, Aqueous solubilities of some variously substituted quinolone antimicrobials, *Int. J. Pharm.* 63, 237-250
- Rouge** N., Buri P., Doelker E., **1996**, Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for the site-specific delivery, *Int. J. Pharm.* 136, 117-139
- Russel** T.L., Berardi R.R., Barnett J.L., Dermentzoglou L.C., Jarvenpaa K.M., Schmaltz S.P., Dressman J.B., **1993**, Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, north american man and women, *Pharm. Res.* 10, 187-196
- Sangalli** M.E., Maroni A., Zema L., Buseti C., Giordano F., Gazzaniga A., **2001**, *In vitro* and *in vivo* evaluation of an oral system for time and/or site-specific drug delivery, *J. Control. Release* 73, 103-110
- Sangalli** M.E., Maroni A., Foppoli A., Zema L., Giordano F., Gazzaniga A., **2004**, Different HPMC viscosity grades as coating agents for an oral time and/or site-controlled delivery system: a study on process parameters and *in vitro* performances, *Eur. J. Pharm. Sci.* 22, 469-476

- Sato** Y., Kawashima Y., Takeuchi H., Yamamoto H., **2003**, *In vivo* evaluation of riboflavin-containing microballoons for floating controlled drug delivery system in healthy human volunteers, *J. Control. Release* 93, 39-47
- Sato** Y., Kawashima Y., Takeuchi H., Yamamoto H., **2004a**, *In vitro* and *in vivo* evaluation of riboflavin-containing microballoons for a floating controlled drug delivery system in healthy humans, *Int. J. Pharm.* 275, 97-107
- Sato** Y., Kawashima Y., Takeuchi H., Yamamoto H., Fujibayashi Y., **2004b**, Pharmacoscintigraphic evaluation of riboflavin-containing microballoons for a floating controlled drug delivery system in healthy humans, *J. Control. Release* 98, 75-85
- Schaefer** T., Holm P., Kristensen H.G., **1990**, Melt granulation in a laboratory scale high shear mixer, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 16, 1249-1277
- Schaefer** T., Johnsen D., Johansen A., **1994**, Effects of powder particle size and binder viscosity on intergranular and intragranular particle size heterogeneity during high shear granulation, *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 525-531
- Schaefer** T., **1996**, Melt granulation with polyethylene glycols in high-shear mixers, Ph.D. Thesis, The Royal Danish School of Pharmacy, Copenhagen
- Seitz** J.A., Mehta S.P., Yeager J.L., **1986**, Tablet coating. In: *The theory and practice of industrial pharmacy*, Lachman L., Liebermann H.A., Kanig J.L., Third Edition, Lea & Febinger, Philadelphia, 346-373
- Seth** P.R., Tossounian J.L., **1978**, Sustained-release pharmaceutical capsules, US Patent 4, 126, 672
- Seth** P.R., Tossounian J.L., **1979**, Novel sustained-release tablet formulations, US Patent 4, 167, 558
- Seth** P.R., Tossounian J.L., **1984**, Hydrodynamically balanced controlled release compositions containing L-Dopa and a decarboxylase inhibitor, U.S. Patent 4, 424, 235
- Scharg** A., **2005**, Entacapone in the treatment of Parkinson's disease, *Lancet Neurol.* 4, 360-370
- Shah** V.P., Tsong Y., Sathe P., Liu J-P, **1998**, *In vitro* dissolution profile comparison-Statistics and analysis of the similarity factor, f_2 , *Pharm. Res.* 15, 889-896
- Shastry** B.S., **2001**, Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy, *Neurosci. Res.* 41, 5-12
- Siddhuraju** P., Becker K., **2001**, Rapid reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the quantification of L-Dopa, non-methylated and methylated tetrahydroisoquinoline compounds from Mucuna beans, *Food Chem.* 72, 389-394

- Siepmann** J., Lecomte F., Bodmeier R., **1999**, Diffusion-controlled drug delivery systems: calculation of the required composition to achieve desired release profiles, *J. Control. Release* 60, 379-389
- Siepmann** J., Peppas N.A., **2001**, Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), *Adv. Drug Del. Rev.* 48, 139-157
- Singh** N.B., Kim K.H., **2000**, Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention, *J. Control. Release* 63, 235-259
- Skelly** J.P., Barr W.H., **1987**, In : *Regulatory Assessment, Drugs and the Pharmaceutical Sciences : Controlled Drug Delivery Fundamentals and Applications*, Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, New York, 293-334
- Soppimath** K. S., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E., Aminabhavi T. M., **2001**, Microspheres as floating drug-delivery systems to increase gastric retention of drugs, *Drug Metabolism Review*, 33, 149-160
- Stevenson** C.L., Theeuwes F., Wright J.C., **2000**, In : *Osmotic Implantable Delivery Systems, Drugs and the Pharmaceutical Sciences : Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, New York, 225-253
- Stocchi** F., Quinn N.P., Barbato L., Patsalos P.N., O'Connell M.T., Ruggieri S., Mardsen C.D., **1994**, Comparison between a fast and a slow release preparation of levodopa and combination of the two : a clinical and pharmacokinetic study, *Clinical Neuropharmacology* 17, 38-44
- Streubel** A., Siepmann J., Bodmeier R., **2003**, Floating matrix tablets based on low density foam powder: effects of formulation and processing parameters on drug release, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18, 37-45
- Sugito** K., Ogata H., Goto H., Noguchi M., Kogure T., Takano M., Maruyama Y., Sasaki Y., **1990**, Gastrointestinal transit of non-disintegrating solid formulations in humans, *Int. J. Pharm.*, 60, 178-183
- Sungthongjeen** S., Paeratakul O., Limmatvapirat S., Puttipipatkachorn S., **2006**, Preparation and *in vitro* evaluation of a multiple-unit floating drug delivery system based on gas formation technique, *Int. J. Pharm.* 324, 136-143
- Talwar** N., Sen H., Staniforth J.N., **2001**, Orally administered controlled drug delivery system providing temporal and spatial control, *US Patent* 6, 261, 601
- Thanoo** B.C., Sunny M.C., Jakakrishnan A., **1993**, Oral sustained-release drug delivery systems using polycarbonate microspheres capable of floating on the gastric fluid, *J. Pharm. Pharmacol.* 45, 21-24
- Timmermans** J., Moës A.J., **1990a**, Measuring the resultant-weight of an immersed test material. I. Validation of an apparatus and a method dedicated to pharmaceutical applications, *Acta Pharm. Technol.* 36, 171-175

- Timmermans** J., Moës A.J., **1990b**, How well do floating dosage forms float? *Int. J. Pharm.* 62, 207-216
- Tolokan** A., Klebovich I., Balogh-Nemes K., Horvai G., **1997**, Automated determination of levodopa and carbidopa in plasma by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection using an on-line flow injection analysis sample pre-treatment unit, *J. Chromatogr. B* 698, 201-207
- Tomisic** Z.B., Kujundzic N., Krajacic M.B., Visnjevac A., Kojic-Prodic B., **2002**, Molecular structures of new ciprofloxacin derivatives, *J. Mol. Struct.* 611, 73-81
- Torrado** S., Prada P., de la Torres P., Torrado S., **2004**, Chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complex : *in vivo* study to demonstrate prolonged gastric retention, *Biomat.* 25, 917-923
- Umezawa** H., **1978**, Pepstatin floating minicapsules, US Patent 4, 101, 650
- Ushimaru** K., Nakamichi K., Saito H., **1987**, Pharmaceutical preparations and a method of manufacturing them, US Patent 4, 702, 918.
- Venkatraman** S., Davar N., Chester A., Kleiner L., **2000**, In : An overview of Controlled Release Systems, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences : Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, New York, 431-463
- Vilches** A.P., Jimenez-Kairuz A., Alovero F., Olivera M.E., Allemandi D.A., Manzo R.H., **2002**, Release kinetics and up-take studies of model fluoroquinolones from carbomer hydrogels, *Int. J. Pharm.* 246, 17-24
- Voinovich** D., Moneghini M., Perissutti B., Filipovic-Grcic J., Grabnar I., **2000**, Preparation in high-shear of sustained-release pellets by melt pelletisation, *Int. J. Pharm.* 203, 235-244
- Warrington** S.J., Barclay S.P., John V.A., Shotton P.A., Wardle H.M., **1985**, Good W., Influence of site of drug delivery on the systemic availability of metoprolol: Comparison of intragastric infusion and 14/190 Oros administration, *Br. J. Clin. Pharmac.* 19, 219S
- Welling** P.G.; Dobrinska M.R., **1987**, In : Dosing Consideration and Bioavailability Assessment of Controlled Drug Delivery Systems, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences : Controlled Drug Delivery Fundamentals and Applications*, Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, New York, 253-291
- Wilson** C.G., **2000**, In: Gastrointestinal transit and drug absorption, *Drugs and the Pharmaceutical Sciences: Oral drug absorption: Prediction and assessment*, Volume 106, Ed. J.B. Dressman, H. Lennernäs, Marcel Dekker, New York, 1-9
- Whitehead** L., Fell J.T., Collett J.H., **1996**, Development of a gastroretentive dosage form, *Eur. J. Pharm. Sci.* 4 (suppl.) S182

- Whitehead** L., Fell J.T., Collett J.H., Sharma H.L., Smith A.-M., **1998**, Floating dosage forms: an *in vivo* study demonstrating prolonged gastric retention, *J. Control. Release* 55, 3-12
- Xiaoqiang** X., Minjie S., Feng Z., Yiqiao H., **2006**, Floating matrix dosage form for phenoprolamine hydrochloride based on gas forming agent: *In vitro* and *in vivo* evaluation in healthy volunteers, *Int. J. Pharm.* 310, 139-145
- Zhang** L., Chen G., Hu Q., Fang Y., **2001**, Separation and determination of levodopa and carbidopa in composite tablets by capillary zone electrophoresis with amperometric detection, *Analytica Chimica Acta* 431, 287-292

Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post-Mortem Material, **1986**, 2nd ed., The Pharmaceutical Press, London

Cipla[®] company, **2007**, <http://www.cipladoc.com/slides/ciprofloxacin/ciploxod-san1.ppt> (consulté le 07/08/2007)

McGraw-Hill Companies, **2007**, <http://www.6abib.com/album/articles.php?id=171> (consulté le 02/08/2007)

National Cancer Institute, **2007**, <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/CDR0000062959.html> (consulté le 02/08/2007)

Normes ICH, ICH-Q1F, **2002**, Stability data package for registration in climatic zones III and IV, <http://www.tga.gov.au/docs/pdf/euguide/ich/042102.pdf>

Systat – Deskop Data Analysis, 1996, L. Wilkinson, G. Blank, C. Gruber, Ed. Prentice Hall, New Jersey, Etats-Unis

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Augustus **1997**, Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms

U.S.P. 25^{ième} Edition, 2002

ANNEXES

Annexes

Annexe 1

CLINIQUES UNIVERSITAIRES DE BRUXELLES
**UNIVERSITE LIBRE
 DE BRUXELLES**
HOPITAL ERASME

ULB

ROUTE DE LENNIK 808 - B-1070 BRUXELLES

Brussel, the 22 March 2005

Pr. Karim AMIGHI
 Department of Pharmacy

TÉL.: 02/555 31 11
 FAX: 02/555 44 05
 BANQUE: 004-2500344-85

Dear Pr. AMIGHI,

Please find further on the answer of the Ethics Committee concerning the below mentioned study.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

We, undersigned,
 Chairman & Secretary of

Pr. A. HERCHUELZ & Mr. G. NISSET
 Ethics Committee Erasme Hospital
 808, route de Lennik
 B-1070 Brussels, Belgium
 N° of agreement by "Ordre des Médecins": OM021

During the meeting held on 22/03/2005 (dd/mm/yyyy), the Ethics Committee gave its agreement on the following documents:

- Protocol (Our Ref.: P2005/057) entitled: "Etude in vivo de la capacité de flottabilité de formes divisées de riboflavine sur des volontaires humains sains."
- French Patient Information Sheet: Version undefined and French Informed Consent Form: Version undefined
- Dutch Patient Information Sheet: Version undefined and Dutch Informed Consent Form: Version undefined
- Investigator's Curriculum Vitae
- Certificate of Insurance: Ethias, Nr. 45.127.563

The list of the names and qualifications of the members of the Ethics Committee present at the meeting is added in appendix.

The Committee reminds the investigator of his personal responsibility for this project. We consider **your responsibility**, in accordance with the recommendations of ICH GCP, that **each suspected and unexpected severe adverse reaction (SUSAR)** will be transmitted to this Ethics Committee with your appreciation of the relationship between drug and adverse reaction, and the impact on the security of all participants to the assay, that annual trial status and end trial results will be transmitted to the Committee.

We hereby confirm that this Ethics Committee is organized and operates according to ICH GCP and the applicable law and regulations.

Mr. G. NISSET
 Secretary

Pr. A. HERCHUELZ
 Chairman

- e-mail : ethique.hopitalerasme@ulb.ac.be
- Internet : <http://www.hopitalerasme.org/ethique.htm>

INTERNET: <http://www.hopitalerasme.be>



Annexe 2**Information du sujet volontaire****Etude *in Vivo* de la capacité de flottabilité de formes divisées de riboflavine sur des volontaires humains sains****1. But de l'étude / Notion de recherche :**

Le but de cette étude est d'estimer la capacité de flottabilité dans l'estomac et l'intestin grêle, de microbilles et de mini-comprimés contenus dans une gélule en fonction du temps et du type de repas administré. Cette étude entre dans le cadre d'un travail de recherche pour une thèse de doctorat, elle ne revêt aucun aspect commercial et n'est pas financé par une industrie Pharmaceutique ou autre. Les microbilles et mini-comprimés utilisés contiennent des excipients, c'est-à-dire des produits non actifs et de la riboflavine 5' phosphate sodique qui est un dérivé de la vitamine B₂ comme traceur urinaire. La liste des excipients utilisés est renseignée par le tableau ci-dessous (tableau 1) ces produits sont inoffensifs pour autant que le patient ne présente pas d'allergie connue à leur rencontre.

Tableau 1 : récapitulatif des excipients utilisés

<i>Produits</i>
Compritol [®]
Béhénate de glycérol
Précirol [®]
Palmitostéarate de glycérol
Lactose 450Me
Bicarbonate Sodique
Carbonate calcique
Acide tartrique
Hydroxypropylmethylcellulose

L'estimation de la capacité de flottabilité des formes est effectuée de manière indirecte en suivant l'élimination de cette vitamine par l'urine. En effet, la riboflavine 5' phosphate sodique est essentiellement absorbée au niveau proximal de l'intestin grêle, ce qui en fait un bon traceur pour estimer la capacité de flottabilité de la forme. En effet, étant donné qu'une forme flottante séjournera plus longuement dans l'estomac qu'une forme non flottante, le délai de résorption de cette vitamine et son élimination par les urines seront différentes entre les deux formes (flottantes et non flottante). Par ailleurs, l'élimination de cette molécule s'effectue presque exclusivement par voie urinaire ce qui rend son étude chez des volontaires humains facile et

non contraignante : le volontaire devra simplement récolter ses urines selon un protocole préétabli.

2. Design de l'étude :

L'administration des gélules contenant les formes flottantes ou non se fera de manière randomisée, c'est-à-dire que c'est le hasard qui déterminera quel type de gélule recevra le volontaire. Il en est de même pour l'attribution de son groupe « groupe à jeun » ou « groupe repas ». Le code reliant les numéros d'échantillons aux volontaires ne sera rompu qu'à la fin de l'étude.

3. Bénéfices thérapeutiques:

L'essai clinique proposé ici n'a aucune visée thérapeutique, il est simplement destiné à estimer la capacité de flottabilité des formes administrées. Le volontaire n'en retire donc aucun bénéfice thérapeutique.

4. Caractère volontaire de la participation:

La fiche signalétique du sujet volontaire doit être complétée avant l'étude. Ce questionnaire est conçu pour établir les critères médicaux d'exclusion et d'inclusion d'un sujet dans l'étude.

Il est dès lors dans l'intérêt du sujet volontaire de répondre le plus complètement possible et en toute honnêteté aux questions posées.

La présente étude ne débutera qu'après approbation et autorisation du Comité d'Ethique Médicale de l'Hôpital Erasme. Cette étude sera réalisée selon les normes scientifiques et éthiques actuelles et en respectant les droits du sujet volontaire.

Ce formulaire de consentement éclairé est destiné à informer le sujet volontaire quant à la nature de l'étude ainsi que ses droits et devoirs. Il doit obligatoirement être signé pour accord par le volontaire avant toute participation à l'étude. Il pourra également en discuter avec le coordonnateur de l'étude et/ou toute autre personne de son choix, y compris son médecin traitant, avant de donner son accord. Le sujet dispose d'un temps de réflexion de trois jours ouvrables avant de signer le présent formulaire. Si le sujet accepte de participer à cette étude, il reste libre de la quitter à tout moment sans devoir se justifier.

La participation de cette étude se faisant sur des bases volontaires, en cas de refus de participation ou abandon de l'étude. Le chercheur, doctorant, membre du corps technique, scientifique ou académique ne fera en aucun cas l'objet de pression de la part de ses supérieurs et collègues dans l'optique de maintenir une bonne entente entre collègues.

5. Contraintes avant la session d'étude

Durant la semaine précédant la session d'étude (durant 7 jours), le sujet ne prendra aucun médicament. En cas de besoin majeur (ou de prescription médicale), il prévendra le responsable de l'étude avant la date de convocation et l'informerá sur le type de médicament pris.

Un à deux jours avant la session d'étude, le sujet ne consommera pas de manière excessive des jus de fruits ou des aliments pouvant provoquer un trouble du transit gastro-intestinal (diarrhée, flatulence,...).

Le volontaire ne devra pas avoir subi d'intervention chirurgicale au niveau du tractus gastro-intestinal.

6. Contraintes en cours d'étude (déroulement d'une session), durée de l'étude

Les volontaires sont répartis en deux groupes tirés au sort : « groupe à jeun » et « groupe repas »

Le jour de l'étude, le sujet se présentera à jeun depuis la veille à minuit.

A **7 h 45 min**, les volontaires seront invités à vider leur vessie dans un petit pot brun qui leur sera distribué. Ensuite, ils seront invités à respecter le régime alimentaire, décrit par le tableau ci-dessous, suivant leur groupe, ainsi que les différents temps de prélèvement d'urine.

A **8 h 30 min**, les volontaires sont invités à prendre leur gélule (temps = t_0). Ensuite, tous les prélèvements d'urine seront récoltés par les volontaires dans des petits pots bruns, étiquetés à leur code, selon un timing prédéterminé : 1h, 2 h, 3h, 4 h, 6 h, 8 h, 14 h et 23 h. Les heures de prélèvements sont indiquées sur chaque flacon. Ces flacons seront remis au fur et mesure au coordonnateur de l'étude, sauf pour ce qui est des prélèvements de 14 h et 23 h, le volontaire les conservera dans son frigo (température : 4°C à 6°C) jusqu'au lendemain. Si pour une quelconque raison, le volontaire ne peut procurer son échantillon d'urine au coordonnateur, juste après son prélèvement, il doit impérativement le conserver au frigo. Par ailleurs, le volontaire ne devra pas se mettre en position couchée entre les temps t_0 et t_{8h} .

L'étude se déroulera sur **quatre périodes (journées complètes)** durant lesquelles le volontaire s'engage à être disponible de **7h 45 du matin à 17h le soir** et à effectuer deux prélèvements d'urine **à son domicile** dans un flaconnage spécial qui lui sera fourni. Ces deux échantillons seront gardés par le volontaire dans son réfrigérateur avant leur restitution au responsable de l'étude le lendemain du jour de l'étude.

Les quatre périodes de l'étude seront **espacées de six jours**.

Le régime suivi par les volontaires et les heures prévues pour les prélèvements d'échantillons durant une session

Repas	Groupe à jeun (n=5)	Groupe repas (n=5)	Prélèvements
7h45			Blanc
8h00	-	200 ml de jus d'orange 105 g de pain gris (3 tranches) 10 g de margarine 20 g de confiture 50 g de fromage maigre 150 ml de thé + 1 sucre	
8h30	Administration d'une gélule avec 200 ml d'eau plate Aucun repas n'est autorisé pendant 4h	Administration d'une gélule avec 200 ml d'eau plate	t₀ (pas de prélèvement)
9h30			t_{1h}
10h20	200 ml d'eau	85 g carré confiture 150 ml de thé+ 1 sucre	
10h30			t_{2h}
11h30			t_{3 h}
12h30			t_{4h}
Déjeuner 12h45	200 ml potage vert 150 g de poulet rôti 50 g sauce tomate 100 g pommes de terres cuites à l'eau 175 ml d'eau minérale 150 ml de thé + 1 sucre	200 ml potage vert 150 g de poulet rôti 50 g sauce tomate 100 g pommes de terres cuites à l'eau 175 ml d'eau minérale 150 ml de thé + 1 sucre	
14h30			t_{6 h}
Goûter 15h15	75 g de tarte aux pommes 150 ml de thé+ 1 sucre	75 g de tarte aux pommes + 150 ml de thé+ 1 sucre	
16h30			t_{8 h}
Energie totale (Kcal)	729	1634	
Apport hydrique total (g)	1290	1530	
Le soir	Repas Libre et récolte des urines à domicile		
22h30			t_{14 h}
7h30 du matin			t_{23 h}

7. Participation, recrutement et durée

La durée d'une session est de 7h 45 à 17h, deux prélèvements d'urine sont à effectuer par le volontaire **à son domicile**. Il les fournira le lendemain de l'étude après leur conservation **au frigo** (température entre 4°C et 6°C).

Le nombre de sujets recrutés pour l'étude est de dix volontaires

La durée totale de l'étude est de 4 sessions ou périodes espacées chacune de 6 jours, soit un total de 28 jours.

8. Lieu des sessions d'étude

Université Libre de Bruxelles
Institut de Pharmacie
Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie (niveau 6)
Campus Plaine – CP 207
Bd du Triomphe 1050 Bruxelles

9. Date et heure de la convocation

Pour des raisons techniques, un retard de maximum 15 minutes est autorisé avant l'exclusion du sujet de l'étude.

10. Contact pour information

Prof. K. Amighi, ULB (Institut de Pharmacie), tél : 02/ 650 52 52

Email : kamighi@ulb.ac.be

Service Médical de l'ULB : Bâtiment M, Campus du Solbosch, Tél : 02/650.29.29

11. Risques prévisibles :

Une étude similaire a été effectuée au sein du laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie en 1987 dans le cadre du travail de recherche de M. Ingani sous la direction du Prof. Moës, aucun effet indésirable dû à l'ingestion des comprimés de riboflavine n'a été relaté. Ce travail est d'ailleurs relaté dans la thèse de doctorat de M. Ingani, celle-ci disponible à la bibliothèque de Pharmacie (ULB, Campus Plaine, Bâtiment BC, niveau 4, tél : 02/ 650 51 48).

12. Assurance RC :

Le directeur du laboratoire de Pharmacie galénique s'engage à souscrire à une assurance RC destinée à fournir au volontaire une compensation financière pour d'éventuels événements graves survenus du fait de sa participation à l'étude.

13. Paiement, frais et rémunération :

Aucun frais lié à sa participation à l'étude n'est réclamé au volontaire.

Les volontaires faisant partie du corps académique, scientifique et technique de l'Institut de Pharmacie, aucune rémunération n'est prévue à leur participation à l'étude.

14. Confidentialité des données :

Les données sont confidentielles et tenues sous forme d'une base de données anonymisée par l'investigateur principal. En cas de besoin, seuls l'investigateur principal et un médecin du centre médical de l'ULB (bâtiment M, campus du solbosch) pourront y avoir accès. Auquel cas le médecin est bien évidemment tenu par le secret médical.

15. Approbation du volontaire:

L'étude ne débutera qu'après l'approbation du comité d'éthique de l'Hôpital Universitaire Erasme et après une lecture attentive de ce formulaire d'information au sujet volontaire et la signature de celui-ci par le sujet. Cette signature doit être précédée de la mention « lu et approuvé ».

Bruxelles le :

Nom et Prénom du volontaire :

Signature du volontaire précédée de la mention « lu et approuvé » :

Annexe 3

Formulaire de consentement éclairé du patient (Confidentiel)

Intitulé de l'étude : Etude *in Vivo* de la capacité de flottabilité de formes divisées de riboflavine chez des volontaires humains sains

Responsable de l'étude : Prof. K. Amighi.

Service de Pharmacie galénique et de Biopharmacie. Université Libre de Bruxelles. Campus Plaine, CP 207. BD du Triomphe 1050 Bruxelles.

Tél : 02/ 650 52 52

Email : kamighi@ulb.ac.be

Fiche signalétique du patient :

Nom et Prénom :

Sexe :

Age :

Poids :

Coordonnées complètes :

Durée de l'étude :

L'étude se déroulera sur **quatre périodes (journées complètes)** durant lesquelles le volontaire s'engage à être disponible de **7h 45 du matin à 17h** le soir et à effectuer deux prélèvements d'urine **à son domicile** dans un flaconnage spécial qui lui sera fourni. Ces deux échantillons seront gardés par le volontaire dans son réfrigérateur avant leur restitution au responsable de l'étude le lendemain du jour de l'étude.

Les quatre périodes de l'étude seront **espacées de six jours**.

Lieu de l'étude :

Université Libre de Bruxelles

Campus Plaine, CP 207. BD du Triomphe 1050 Bruxelles.

Service de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie, Bâtiment BC, niveau 6.

Personne de contact : Prof. K. Amighi

Tél : 02/ 650 52 52

Email : kamighi@ulb.ac.be

Questions : (biffer la mention inutile)

1. Avez-vous récemment souffert d'une affection quelconque ?

- OUI

- NON

2. Suivez-vous une quelconque médication actuellement ?

- OUI

- NON

3. Avez-vous subi une quelconque intervention chirurgicale du tractus gastro-intestinal :

- OUI

- NON

Si la réponse à l'une de ces questions est positive, le volontaire ne participera pas à l'étude.

Connaissance du formulaire information au patient :

Le patient volontaire sain déclare avoir pris connaissance du document « information au patient », d'en avoir compris le sens et y avoir mûrement réfléchi, en foi de quoi, il consent à rejoindre l'étude dont l'intitulé est : « Etude *in Vivo* de la capacité de flottabilité de formes divisées de riboflavine chez des volontaires humains sains ».

Fait à Bruxelles le :

Nom, Prénom, Signature :

Annexe 4

CLINQUES UNIVERSITAIRES DE BRUXELLES
**UNIVERSITE LIBRE
 DE BRUXELLES**
HOPITAL ERASME

ULB

ROUITE DE LENNIK 808 - B-1070 BRUXELLES

Brussels, May 9, 2007

COMITE D'ETHIQUE
 Agréation: N°OM021

Pr. Massimo PANDOLFO
 Department of Neurology
 CUB Hôpital Erasme
 Route de Lennik 808
 B-1070Bruxelles

Secrétariat: Tél.: 32.2.555.37.07
 Fax: 32.2.555.46.20
 E-mail: ethique.hop-erasme@ulb.ac.be

Dear Pr. PANDOLFO,

Please find further on the answer of the Ethics Committee concerning the below mentioned study.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

We, undersigned,
 Chairman & Secretary of

Pr. A. HERCHUELZ & Mr. G. NISÉT
 Ethics Committee Erasme Hospital
 808, route de Lennik
 B-1070 Brussels, Belgium
 N° of agréation by "Ordre des Médecins": OM021

confirm that the documents submitted for approval were initially examined during the meeting held on 03/04/2007 (dd/mm/yyyy).

After examination of the answers to the comments and of the new version of the information sheet and consent form received the 08/05/2007, the Ethics Committee gave its agreement on 09/05/2007 to the following documents:

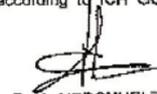
- Protocol (Our Ref.: P2007/086) entitled: "Comparative pharmacokinetic evaluation of the bioavailability and the gastric residence time of floating sustained release levodopa delivery systems after oral dose of three formulations of levodopa and carbidopa or benserazide in healthy human volunteers: Protopa® HBS (floating capsule), Levodopa Form 1, Levodopa Form 2." (Your Ref.: Levo-2 Final version, dated February 2007)
- French Patient Information Sheet: Version 2, dated May 8, 2007 and French Informed Consent Form: Version 2, dated May 8, 2007
- Dutch Patient Information Sheet: Version 2, dated May 8, 2007 and Dutch Informed Consent Form: Version 2, dated May 8, 2007
- Investigator's Curriculum Vitae
- National Application Form dated February 21, 2007
- Patient's declaration in French and Dutch
- Clinical Trial Agreement for sponsored research in ULB Pharmacy institutes, dated March 15, 2007
- CRF

The list of the names and qualifications of the members of the Ethics Committee present at the meeting is added in appendix.

The Committee reminds the investigator of his personal responsibility for this project. We consider your responsibility, in accordance with the recommendations of ICH GCP, that each suspected and unexpected severe adverse reaction (SUSAR) will be transmitted to this Ethics Committee with your appreciation of the relationship between drug and adverse reaction, and the impact on the security of all participants to the assay, that annual trial status and end trial results will be transmitted to the Committee.

We hereby confirm that this Ethics Committee is organized and operates according to ICH GCP and the applicable law and regulations.


 Mr. G. NISÉT
 Secretary


 Pr. A. HERCHUELZ
 Chairman

CC : Mr. Jonathan Goole, Institut de Pharmacie, ULB ; Service de Pharmacie Galénique et Biopharmacie



INTERNET: <http://www.hopitalerasme.org/ethique.html>

Annexe 5

Federal Agency for Medicines and Health Products

Research and Development

YOUR LETTRE FROM

YOUR REF.

OUR REF.

DATE

ANNEX

CONTACT

TEL.

FAK

E-MAIL

AFMPS/R&D/TBR/2007/05/3254

29 MAI 2007

Tania Bruwier

+ 32 (2) 524 83 90

+ 32 (2) 524 80 01

Tania.bruwier@afmps.be

Prof. K. Amighi

Université Libre de Bruxelles

Service de Pharmacie Galénique et
BiopharmacieCampus de la Plaine accès 2
1050 Bruxelles

Subject: Comparative pharmacoscintigraphic evaluation of the bioavailability and the gastric residence time of floating sustained release levodopa delivery systems after oral dose of three formulations of levodopa and carbidopa or benserazide in healthy human volunteers : Prolopa HBS (floating capsule), Levodopa Form 1, Levodopa Form 2, single dose, 3 way, cross-over study

Concerning : Authorisation of clinical trial on 25/05/2007

EudraCT no: 2007-000708-33

Dear Madam, Dear Sir,

Conform article 14 of the Law of 7 May 2004 concerning experiments on the human person, I have decided to authorize the clinical trial mentioned below. However, the points as mentioned in annex are to be followed up.

Comparative pharmacoscintigraphic evaluation of the bioavailability and the gastric residence time of floating sustained release levodopa delivery systems after oral dose of three formulations of levodopa and carbidopa or benserazide in healthy human volunteers : Prolopa HBS (floating capsule), Levodopa Form 1, Levodopa Form 2, single dose, 3 way, cross-over study

EudraCT n°2007-000708-33

Yours sincerely,

The Minister of Social Affairs
and Public Health

Rudy DEMOTTE

Federal Agency for Medicines and Health Products
Eurostation II
Place Victor Horta 40/40
1060 Brussels
www.afmps.be

Annexe 6



AGENCE FEDERALE DE CONTROLE NUCLEAIRE

Département Réglementation et Autorisations
Service Applications Médicales

Bruxelles, le 03 MEI 2007

Prof. K. AMIGHI
Université Libre de Bruxelles
Service de Pharmacie Galénique et Biopharmacie
Institut de Pharmacie
Boulevard du Triomphe CP 207
Campus de la Plaine
1050 Bruxelles

Votre courrier de: 13/04/2007	Vos références:	Nos références: /3-1-MV-04/07-044	Annexe(s): /
Objet: Demande d'une autorisation en vertu de l'article 45 de l'Arrêté Royal du 20/07/2001 portant règlement général de la protection de la population, des travailleurs et de l'environnement contre le danger des rayonnements ionisants			
CC : G. Musch, Direction Général Médicaments, Département R&D			

Professeur,

Nous avons minutieusement examiné votre demande d'autorisation « d'importation, de fabrication, de préparation, d'offre en vente et de vente de radionucléides ou des préparations en contenant destinés à être utilisés sous forme non scellée en médecine humaine ou vétérinaire pour le diagnostic « *in vivo* » ou « *in vitro* » et pour la thérapie » en vertu de l'article 45 de l'Arrêté Royal susmentionné, dans le cadre d'une étude clinique avec du pertechnétate de technétium-99m et des mini-comprimés marqués à l'indium-111 (EudraCT 2007-00708-33). De cet examen, il apparaît que la demande est complète et que les autorisations nécessaires sont présentes :

- Art 3 : Autorisation d'établissement classé : Hôpital Erasme (AFCN 2349/BHA-2402-B et AFCN 2348/BH-2402-A)
- Art 47 : Pharmacien chargé du contrôle : Ph. B. Vangansbeke
- Art 53 : Médecin agréé pour la médecine nucléaire : Dr. S. Goldman (AFCN/109/NM/F/1) et Dr. D. Blocklet
- Art 74 : Organisme agréé : AV Controlatom
- Art 75 : Médecin agréé pour exercer les contrôles médicaux : Dr. De Brouwer (AFCN/532/75/P/1) et Dr. Vilao Silva (FANC/305/75/P/1)

Une autorisation en vertu de l'article 45 de l'Arrêté Royal susmentionné n'est pas exigée pour cette étude clinique.

Par conséquent, l'avis de l'AFCN, quant à l'étude clinique susmentionnée est positif.

Veillez agréer, Professeur, l'expression de nos considérations distinguées.

Marleen Vandecapelle
Expert Applications Médicales

Yvan Pouleur
Chef de Département

« L'AFCN, responsable du traitement, traite vos données à caractère personnel à des fins de gestion interne dans le cadre de votre demande d'autorisation et d'une communication limitée au public. Vous disposez d'un droit d'accès aux données traitées et dans le cas où celles-ci seraient erronées, du droit de les faire corriger. Vous êtes également en mesure d'obtenir des renseignements concernant la description du traitement en consultant le registre public tenu par la Commission de la protection de la vie privée. »

Des renseignements quant à la présente lettre peuvent être obtenus auprès de	Marleen Vandecapelle
Correspondance	AFCN, Rue Ravenstein 36 - 1000 Bruxelles
marleen.vandecapelle@fanc.fgov.be	Tél.: 02/289.21.78 Fax: 02/289.21.12

Annexe 7

Réf. Dossier 2006/INT 62

ATTESTATION D'ASSURANCE

Ethias Droit Commun, Association d'assurances mutuelles, rue des Croisiers n° 24 à Liège, certifiée que par la police n° **45.118.698** souscrite par l'ULB – Hôpital Erasme, route de Lennik 808 à 1070 Bruxelles, elle garantit, conformément aux dispositions de la loi du 7 mai 2004 relative aux expérimentations sur la personne humaine et dans les limites des conditions générales et spéciales du contrat, la responsabilité civile qui pourrait incomber au **Professeur Karim Amighi** en sa qualité de promoteur, du chef de dommages causés aux participants et/ou à leurs ayants droit dans le cadre de l'étude clinique suivante menée en Belgique :

« **Comparative pharmacoscintigraphic evaluation of the bioavailability and the gastric residence time of floating sustained release levodopa delivery systems after oral dose of three formulations of levodopa and carbidopa or benserazide in healthy human volunteers : Prolopa HBS (floating capsule), Levodopa Form 1, Levodopa Form 2 Single dose, 3 way, cross-over study** »

Nombre de patients : 10 volontaires sains ;
 Classe : III ;
 Etude monocentrique ;
 Durée de l'expérimentation : 18 jours.

Montants de Garantie :

La garantie est acquise à raison de **2.500.000 €** par sinistre, tous dommages corporels, matériels et immatériels consécutifs confondus. Ce montant constitue également la limite de la garantie pour toute la durée de l'essai.

Par ailleurs, la garantie est limitée à **500.000 €** par victime.

Franchise :

Il sera déduit de tout sinistre une franchise fixée à **250 €** par victime.

Fait en double à Liège
 Le 08 mars 2007

Pour le directeur général,

Daniel Pirotte
 Responsable de service

Annexe 8

Initiated: 1964

17.C
Original: English**WORLD MEDICAL ASSOCIATION DECLARATION OF HELSINKI****Ethical Principles
for
Medical Research Involving Human Subjects**

Adopted by the 18th WMA General Assembly
Helsinki, Finland, June 1964
and amended by the
29th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 1975
35th WMA General Assembly, Venice, Italy, October 1983
41st WMA General Assembly, Hong Kong, September 1989
48th WMA General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa, October 1996
and the
52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000

A. INTRODUCTION

1. The World Medical Association has developed the Declaration of Helsinki as a statement of ethical principles to provide guidance to physicians and other participants in medical research involving human subjects. Medical research involving human subjects includes research on identifiable human material or identifiable data.
2. It is the duty of the physician to promote and safeguard the health of the people. The physician's knowledge and conscience are dedicated to the fulfillment of this duty.
3. The Declaration of Geneva of the World Medical Association binds the physician with the words, "The health of my patient will be my first consideration," and the International Code of Medical Ethics declares that, "A physician shall act only in the patient's interest when providing medical care which might have the effect of weakening the physical and mental condition of the patient."
4. Medical progress is based on research which ultimately must rest in part on experimentation involving human subjects.
5. In medical research on human subjects, considerations related to the well-being of the human subject should take precedence over the interests of science and society.
6. The primary purpose of medical research involving human subjects is to improve prophylactic, diagnostic and therapeutic procedures and the understanding of the aetiology and pathogenesis of disease. Even the best proven prophylactic, diagnostic, and therapeutic methods must

continuously be challenged through research for their effectiveness, efficiency, accessibility and quality.

7. In current medical practice and in medical research, most prophylactic, diagnostic and therapeutic procedures involve risks and burdens.
8. Medical research is subject to ethical standards that promote respect for all human beings and protect their health and rights. Some research populations are vulnerable and need special protection. The particular needs of the economically and medically disadvantaged must be recognized. Special attention is also required for those who cannot give or refuse consent for themselves, for those who may be subject to giving consent under duress, for those who will not benefit personally from the research and for those for whom the research is combined with care.
9. Research Investigators should be aware of the ethical, legal and regulatory requirements for research on human subjects in their own countries as well as applicable international requirements. No national ethical, legal or regulatory requirement should be allowed to reduce or eliminate any of the protections for human subjects set forth in this Declaration.

B. BASIC PRINCIPLES FOR ALL MEDICAL RESEARCH

10. It is the duty of the physician in medical research to protect the life, health, privacy, and dignity of the human subject.
11. Medical research involving human subjects must conform to generally accepted scientific principles, be based on a thorough knowledge of the scientific literature, other relevant sources of information, and on adequate laboratory and, where appropriate, animal experimentation.
12. Appropriate caution must be exercised in the conduct of research which may affect the environment, and the welfare of animals used for research must be respected.
13. The design and performance of each experimental procedure involving human subjects should be clearly formulated in an experimental protocol. This protocol should be submitted for consideration, comment, guidance, and where appropriate, approval to a specially appointed ethical review committee, which must be independent of the investigator, the sponsor or any other kind of undue influence. This independent committee should be in conformity with the laws and regulations of the country in which the research experiment is performed. The committee has the right to monitor ongoing trials. The researcher has the obligation to provide monitoring information to the committee, especially any serious adverse events. The researcher should also submit to the committee, for review, information regarding funding, sponsors, institutional affiliations, other potential conflicts of interest and incentives for subjects.
14. The research protocol should always contain a statement of the ethical considerations involved and should indicate that there is compliance with the principles enunciated in this Declaration.

15. Medical research involving human subjects should be conducted only by scientifically qualified persons and under the supervision of a clinically competent medical person. The responsibility for the human subject must always rest with a medically qualified person and never rest on the subject of the research, even though the subject has given consent.
16. Every medical research project involving human subjects should be preceded by careful assessment of predictable risks and burdens in comparison with foreseeable benefits to the subject or to others. This does not preclude the participation of healthy volunteers in medical research. The design of all studies should be publicly available.
17. Physicians should abstain from engaging in research projects involving human subjects unless they are confident that the risks involved have been adequately assessed and can be satisfactorily managed. Physicians should cease any investigation if the risks are found to outweigh the potential benefits or if there is conclusive proof of positive and beneficial results.
18. Medical research involving human subjects should only be conducted if the importance of the objective outweighs the inherent risks and burdens to the subject. This is especially important when the human subjects are healthy volunteers.
19. Medical research is only justified if there is a reasonable likelihood that the populations in which the research is carried out stand to benefit from the results of the research.
20. The subjects must be volunteers and informed participants in the research project.
21. The right of research subjects to safeguard their integrity must always be respected. Every precaution should be taken to respect the privacy of the subject, the confidentiality of the patient's information and to minimize the impact of the study on the subject's physical and mental integrity and on the personality of the subject.
22. In any research on human beings, each potential subject must be adequately informed of the aims, methods, sources of funding, any possible conflicts of interest, institutional affiliations of the researcher, the anticipated benefits and potential risks of the study and the discomfort it may entail. The subject should be informed of the right to abstain from participation in the study or to withdraw consent to participate at any time without reprisal. After ensuring that the subject has understood the information, the physician should then obtain the subject's freely-given informed consent, preferably in writing. If the consent cannot be obtained in writing, the non-written consent must be formally documented and witnessed.
23. When obtaining informed consent for the research project the physician should be particularly cautious if the subject is in a dependent relationship with the physician or may consent under duress. In that case the informed consent should be obtained by a well-informed physician who is not engaged in the investigation and who is completely independent of this relationship.

24. For a research subject who is legally incompetent, physically or mentally incapable of giving consent or is a legally incompetent minor, the investigator must obtain informed consent from the legally authorized representative in accordance with applicable law. These groups should not be included in research unless the research is necessary to promote the health of the population represented and this research cannot instead be performed on legally competent persons.
25. When a subject deemed legally incompetent, such as a minor child, is able to give assent to decisions about participation in research, the investigator must obtain that assent in addition to the consent of the legally authorized representative.
26. Research on individuals from whom it is not possible to obtain consent, including proxy or advance consent, should be done only if the physical/mental condition that prevents obtaining informed consent is a necessary characteristic of the research population. The specific reasons for involving research subjects with a condition that renders them unable to give informed consent should be stated in the experimental protocol for consideration and approval of the review committee. The protocol should state that consent to remain in the research should be obtained as soon as possible from the individual or a legally authorized surrogate.
27. Both authors and publishers have ethical obligations. In publication of the results of research, the investigators are obliged to preserve the accuracy of the results. Negative as well as positive results should be published or otherwise publicly available. Sources of funding, institutional affiliations and any possible conflicts of interest should be declared in the publication. Reports of experimentation not in accordance with the principles laid down in this Declaration should not be accepted for publication.

C. ADDITIONAL PRINCIPLES FOR MEDICAL RESEARCH COMBINED WITH MEDICAL CARE

28. The physician may combine medical research with medical care, only to the extent that the research is justified by its potential prophylactic, diagnostic or therapeutic value. When medical research is combined with medical care, additional standards apply to protect the patients who are research subjects.
29. The benefits, risks, burdens and effectiveness of a new method should be tested against those of the best current prophylactic, diagnostic, and therapeutic methods. This does not exclude the use of placebo, or no treatment, in studies where no proven prophylactic, diagnostic or therapeutic method exists.
30. At the conclusion of the study, every patient entered into the study should be assured of access to the best proven prophylactic, diagnostic and therapeutic methods identified by the study.
31. The physician should fully inform the patient which aspects of the care are related to the research. The refusal of a patient to participate in a study must never interfere with the patient-physician relationship.

32. In the treatment of a patient, where proven prophylactic, diagnostic and therapeutic methods do not exist or have been ineffective, the physician, with informed consent from the patient, must be free to use unproven or new prophylactic, diagnostic and therapeutic measures, if in the physician's judgement it offers hope of saving life, re-establishing health or alleviating suffering. Where possible, these measures should be made the object of research, designed to evaluate their safety and efficacy. In all cases, new information should be recorded and, where appropriate, published. The other relevant guidelines of this Declaration should be followed.

7.10.2000 09h14

Annexe 9

Fiche signalétique

Titre	Comparative pharmacoscintigraphic evaluation of the bioavailability and the gastric residence time of floating sustained release levodopa delivery systems after oral dose of three formulations of levodopa and carbidopa or benserazide in healthy human volunteers : Prolopa [®] HBS (floating capsule), Levodopa Form 1, Levodopa Form 2 Single dose, 3 way, cross-over study			
Identification	Réf. sponsor : LEVO-02		Réf. Comité d’Ethique :	
Investigateur(s)				
Nom - Prénom	téléphone	fax	Bip	email
Pandolfo Massimo	02/5553429			massimo.pandolfo@ulb.ac.be
Assistant(e) de Recherche Clinique - Erasme				
Nom - Prénom	téléphone	fax	Bip	email
Alaerts Nick	02/5553349		02/5555874	
Promoteur – Sponsor				
Nom	Service de Pharmacie Galénique et Biopharmacie Institut de Pharmacie Université Libre de Bruxelles			
Adresse	Campus de la Plaine – CP 207 Boulevard du Triomphe 1050 Bruxelles Belgique			
Personne de contact	Amighi Karim	email	kamighi@ulb.ac.be	
Téléphone	02/6505252	Fax	02/6505269	
Organisme de Recherche sous contrat (ORC) - Contract Research Organisation (CRO)				
Nom				
Adresse				
Personne de contact		email		
Téléphone		Fax		

Annexe 10

Information au volontaire

Etude randomisée, en simple aveugle, pour comparer l'efficacité et la tolérance de deux nouveaux produits (ULB-GALLEVO 1 et ULB-GALLEVO 2) à la Prolopa[®] HBS chez le sujet humain volontaire sain.

Protocole

Vous êtes invité à participer à une étude clinique utilisant un médicament couramment utilisé chez les patients atteints par la maladie de Parkinson (Prolopa[®] HBS 125) ainsi que deux nouveaux médicaments expérimentaux (ULB-GALLEVO 1 et ULB-GALLEVO 2) contenant des principes actifs identiques ou équivalents à ceux contenus dans la Prolopa[®] HBS 125. En effet, la levodopa est présente dans les trois formulations. La carbidopa, présente dans les deux formulations expérimentales, appartient à la même classe chimique de la bensérazide, présente dans la Prolopa[®] HBS 125. La carbidopa et la bensérazide ont un mode d'action identique et des propriétés physico-chimiques similaires.

Il vous appartient de décider si vous souhaitez participer ou non à l'étude. Si vous décidez d'y participer, vous pouvez quitter l'étude à tout moment. Si vous ne comprenez pas quelque chose après avoir lu la présente information, interrogez le médecin de l'étude ou un membre de son équipe. Avant que vous n'acceptiez de participer à cette étude, vous devez connaître l'organisation mise en place pour votre participation ainsi que les risques et avantages liés à votre participation afin de pouvoir prendre une décision informée. C'est ce qu'on appelle donner un « consentement éclairé ».

Le but de cette étude est de comparer les deux médicaments expérimentaux à la Prolopa[®] HBS afin de pouvoir prévoir dans quelle mesure ils seraient susceptibles d'améliorer le traitement de la maladie de Parkinson. Les trois formes sont supposées flotter dans l'estomac en délivrant de manière prolongée les deux principes actifs. Une évaluation du temps de résidence gastrique par scintigraphie et le relevé d'une courbe de concentration plasmatique à l'aide de prélèvements sanguins nous permettront de comparer les deux formes expérimentales à la spécialité Prolopa[®] HBS déjà commercialisée.

Vous serez 10 volontaires à participer à cette étude durant 3 semaines à raison d'un jour par semaine (plus un jour, le lendemain du jour d'étude principal afin de réaliser un seul prélèvement sanguin supplémentaire). Les 3 jours d'étude seront entrecoupés de 7 jours de repos.

Il vous sera demandé de prendre les trois traitements (ULB-GALLEVO 1, ULB-GALLEVO 2 et Prolopa[®] HBS 125) le premier jour de chaque période. L'ordre de la prise de ces traitements sera déterminé par le hasard.

Par exemple, vous prendrez le premier jour une dose de ULB-GALLEVO 1, puis vous prendrez une dose de Prolopa[®] HBS 125 le neuvième jour et une dose de ULB-GALLEVO 2 le dix-septième jour. Cela se fera en simple aveugle, ce qui signifie que le médecin investigateur saura quel produit vous recevez tel jour mais vous ne le saurez pas.

Quel que soit la forme que vous recevrez, du médecin investigateur surveillera vos fonctions et des procédures de sécurité très strictes seront appliquées en cas de besoin.

Que se passe-t-il si vous décidez de participer à l'étude ?

Comme indiqué dans le tableau ci-dessous, vous devrez vous présenter 8 fois à l'hôpital. Avant le début de l'étude, le médecin investigateur vous posera des questions sur votre état général. Vous subirez un examen physique et on précèdera à une prise de sang pour des tests de contrôle (27 ml de sang). On vous demandera également un échantillon d'urine pour des tests de contrôle et la détection de drogues. On mesurera aussi votre pression sanguine et votre pouls. On testera enfin vos fonctions pulmonaires au moyen d'un appareil appelé spiromètre.

Le tableau ci-dessous vous indique les tests et activités qui auront lieu à chacune de vos visites pour l'étude. Quelques informations supplémentaires sont expliquées plus en détails après le tableau.

Nombre de visites	1	2	3	4	5	6	7	8
	Avant le début de l'étude	Jour 1	Jour 2	Jour 9	Jour 10	Jour 17	Jour 18	Jour 20
Discussion avec le docteur ou un collaborateur et consentement pour entrer dans l'étude	X							
Antécédents médicaux	X							
Examen physique	X							
Pression artérielle et pouls	X							
Echantillon d'urine	X							X
Echantillon sanguin*	X	X	X	X	X	X	X	X
Tests pulmonaires et signes vitaux	X							
Prise des médicaments		X		X		X		
Image de l'estomac		X		X		X		

* Au total, un maximum de 91 ml de sang par période (jours 1-2, 9-10 et 17-18) seront prélevés, via un cathéter (pour éviter de piquer les veines plusieurs fois dans la journée)

Le premier jour, à 7h00, vous serez admis à jeun à l'hôpital, un numéro vous sera attribué au hasard, un cathéter vous sera placé et une première prise de sang sera effectuée. A 7h30, vous prendrez le petit déjeuner standard (jus d'orange, pain, margarine, confiture, fromage blanc). A 8h00, vous prendrez le médicament avec un grand verre d'eau. A partir de 8h30 et jusque 20h00, on vous prélèvera 11 fois 7 ml de sang. Après les 11 prises, vous pourrez quitter l'établissement. A

12h30, vous prendrez le dîner standard (soupe verte, poulet rôti, pommes de terre, eau). A 18h30, vous prendrez le souper standard (tagliatelle au fromage et jambon, pain, beurre, banane, eau). A 10h00 et 16h30, vous prendrez un snack standard (couque aux pommes, café ou thé). Le lendemain de la journée de l'étude, vous devrez revenir à l'hôpital afin d'effectuer une dernière prise de sang. Entre 8h30 et 20h00, vous allez effectuer 18 passages de 2 min à la caméra scintigraphique. Les 3 formes pharmaceutiques testées contiendront une faible quantité d'Indium 111, un élément radioactif qui permettra de les visualiser dans l'estomac. La dose de radioactivité utilisée engendre un rayonnement inférieur à celui engendré par une radio de routine aux rayons X. De plus, afin de visualiser l'estomac, une solution radioactive de pertechnetate vous sera injectée par le cathéter. La dose de pertechnetate injectée est identique à celle utilisée lors des examens de la thyroïde et donc, comme la dose d'Indium, ne présente aucun risque pour l'organisme.

Toutes ces démarches seront répétées aux neuvième et dix-septième jours avec les autres médicaments.

Enfin, une dernière visite à l'hôpital aura lieu le vingtième jour pour faire une analyse de sang (27 ml) et d'urine pour des tests de contrôle et clôturer le dossier.

Quels sont les avantages à participer à l'étude ?

Vous n'allez pas tirer un avantage direct en prenant ces médicaments, mais en participant, vous aidez les chercheurs à déterminer si les nouveaux produits testés peuvent améliorer l'efficacité des traitements utilisés pour soigner la maladie de Parkinson.

Y a-t-il des effets secondaires ou des risques ?

La levodopa, la carbidopa et la bensérazide sont connus et utilisées pour le traitement de la maladie de Parkinson depuis le début des années 70. Ces molécules ont été largement testées et il existe une somme très importante d'informations concernant la tolérance de l'organisme à leur égard.

Pour la carbidopa et la bensérazide, aucun effet secondaire n'a été répertorié à ce jour.

La levodopa peut engendrer provisoirement des troubles gastro-intestinaux minimes et de l'hypotension. Ces effets secondaires apparaissent et disparaissent rapidement.

Les effets secondaires tardifs, liés à une utilisation prolongée de la levodopa, peuvent comprendre des mouvements involontaires, des hallucinations, des insomnies, des cauchemars ou de la somnolence. L'apparition de ces effets secondaires ne peut avoir lieu qu'après un traitement prolongé et pas après seulement 3 administrations de levodopa.

L'absence totale de risque n'existant pas lors d'étude clinique, conformément à l'article 29 de la loi belge relative aux expérimentations sur la personne humaine (7 mai 2004), le promoteur est responsable de tous les préjudices subis par le participant et/ou son ayant droit légal, même si aucune faute n'a été commise, si les préjudices sont directement ou indirectement liés aux expériences effectuées. Dans cette optique, le promoteur a souscrit un contrat d'assurance RC (Responsabilité Civile) destinée à vous fournir une compensation financière si vous subissez un dommage lié à l'étude. Par « dommage lié à l'étude », on entend toute lésion physique causée par les médicaments testés ou par des actes médicaux requis pour l'étude.

Que se passe-t-il si vous désirez stopper l'étude ?

Votre participation à l'étude est volontaire : ceci signifie que vous avez le droit de ne pas y participer ou de vous retirer sans justification même si vous aviez accepté préalablement d'y participer. Votre décision ne modifiera en rien vos relations avec l'investigateur.

Vous pouvez décider de quitter l'étude à tout moment. Le médecin investigateur peut aussi décider de vous retirer de l'étude si vous ne suivez pas les instructions, pour des raisons médicales ou pour d'autres raisons. Il y a aussi une possibilité que l'étude soit arrêtée par le sponsor, ULB Galénique, avant que votre participation ne soit complète. Si cela arrive, vous ne continuerez pas à recevoir la médication à l'étude ni les évaluations planifiées. Si vous quittez l'étude pour quelque raison que ce soit, vous devez retourner chez le médecin de l'étude pour effectuer les examens de clôture de dossier. Toutes les données collectées jusqu'à ce que vous quittiez l'étude et refusiez de continuer les évaluations seront gardées et utilisées par ULB galénique.

Dédommagement

Il ne vous coûte rien de participer à cette étude. Vous serez remboursé de tout frais raisonnable que vous auriez dépensé pour vous rendre à l'hôpital pour les visites de l'étude.

Un membre de l'équipe du médecin investigateur vous informera de quel genre de dépenses seront couvertes.

Vous recevrez une compensation financière pour dédommagement des inconvénients liés à votre participation:

200,00 € au jour 1

200,00 € au jour 9

200,00 € au jour 17

Soit un montant total de 600,00 €

Cette compensation est entièrement due si l'investigateur interrompt votre participation à l'expérimentation. Par contre, elle sera due au prorata de votre participation si vous interrompez votre participation à l'expérimentation.

Confidentialité et traitement des données

Votre participation à l'étude signifie que vous acceptez que l'investigateur recueille des données vous concernant et les utilise dans un objectif de recherche.

Vous avez le droit de demander à l'investigateur quelles sont les données collectées à votre sujet et quelle est leur utilité dans le cadre de l'étude. Vous disposez d'un droit de regard sur les données dites personnelles (données démographiques) et le droit d'y apporter des rectifications au cas où elles seraient incorrectes (*Ces droits vous sont garantis par la loi du 8 décembre 1992, amendée par la loi du 11 décembre 1998, suivie de la directive 95/46/CE du 24 octobre 2002 qui protège la vie privée et par les droits des patients définis par la loi du 22 août 2002*).

L'investigateur a un devoir de confidentialité vis à vis des données collectées. Ceci veut dire qu'il s'engage non seulement à ne jamais divulguer votre nom dans le cadre d'une publication ou d'une conférence mais aussi qu'il prendra toutes les mesures indispensables à la protection de vos données (code d'identification, protection par mot de passe des bases de données). En pratique, il constituera 2 bases de données différentes. L'une contiendra vos nom, prénom, numéro de dossier à l'hôpital et un code d'identification qu'il créera. Ce code d'identification sera utilisé dans la 2^{ème} base de données en regard de tous les résultats expérimentaux recueillis pendant votre

participation à l'étude. Ces 2 bases de données seront conservées séparément et seront protégées par un mot de passe. Si l'investigateur confie vos données pour traitement statistique, seule la seconde base de données sera confiée à cette tierce personne. Les données personnelles collectées ne contiendront pas d'association d'éléments qui puissent permettre de malgré tout vous identifier (*la base de données contenant les résultats de l'étude ne contiendra donc pas d'association d'éléments comme vos initiales, votre sexe et votre date de naissance complète*)

Quand l'étude sera terminée, l'investigateur s'engage à détruire la base de données qui contient votre code d'identification, vos nom, prénom et numéro dossier, de sorte qu'il ne sera plus possible de faire le lien entre les données recueillies pendant l'étude et votre dossier médical.

En cas de problème ou d'inquiétude de votre part, vous pouvez contacter l'investigateur (Dr. Massimo Pandolfo) ou un membre de l'équipe de recherche (Goole Jonathan) au numéro de téléphone suivant (02/555-34-29).

Cette étude a été évaluée par un Comité d'Ethique indépendant, à savoir le Comité d'Ethique de l'Hôpital Erasme, qui a émis un avis favorable. Un Comité d'Ethique est chargé de la protection des sujets qui se prêtent à des recherches cliniques conformément à la loi du 7 mai 2004 relative aux expérimentations sur la personne humaine. En aucun cas vous ne devez prendre l'avis favorable du Comité d'Ethique comme une incitation à participer à cette étude.

Si vous acceptez de participer à cette étude, vous signerez le formulaire de consentement éclairé. L'investigateur signera également ce formulaire et confirmera ainsi qu'il vous a fourni les informations nécessaires sur l'étude, que vous avez reçu le présent formulaire d'information, qu'aucune pression n'a été exercée pour que vous acceptiez de participer à l'étude et qu'il est prêt à répondre à toutes vos questions supplémentaires, le cas échéant.

Consentement du volontaire

Etude randomisée, en simple aveugle, pour comparer l'efficacité et la tolérance de deux nouveaux produits (ULB-GALLEVO 1 et ULB-GALLEVO 2) à la Prolopa[®] HBS chez le sujet humain volontaire sain.

Vos responsabilités

Si vous décidez de participer à cette étude, vous devrez :

- Respecter le calendrier des rendez-vous
- S'abstenir de l'usage de drogues et de médicaments autre que le paracétamol (sauf en cas d'usage local), et ne participer à d'autres études cliniques
- Informer votre médecin de tout médicament que vous prenez, même s'il s'agit d'un médicament acheté sans ordonnance.
- Informer votre médecin de tout problème médical survenu.

Si vous ne suivez pas les indications qui précèdent, vous pouvez être retiré de l'étude.

Si vous avez des questions concernant vos responsabilités ou les activités de l'étude, contactez :

Dr Pandolfo

Service de Neurologie

Tel : 02/555 34 29

Date et signature

Je soussigné, Docteur Massimo Pandolfo, confirme avoir fourni oralement les informations nécessaires sur l'étude, avoir remis un exemplaire du formulaire d'information et de consentement signé par les diverses parties, être prêt à répondre à toutes les questions supplémentaires, le cas échéant et n'avoir exercé aucune pression pour que le patient participe à l'étude. Je déclare travailler en accord avec les principes éthiques notamment dans la « Déclaration d'Helsinki » et dans la loi belge du 7 mai 2004, relative aux expérimentations sur la personne humaine.

Date et signature

Annexe 11**Déclaration du patient**

Etude randomisée, en Simple Aveugle, pour comparer l'efficacité et la tolérance de deux nouveaux produits (ULB-GALLEVO 1 et ULB-GALLEVO 2) à la Prolopa[®] HBS chez le volontaire sain.

- ✓ J'accepte de mon plein gré de participer à cette étude.
- ✓ Je sais que le sponsor de l'étude, ULB Galénique, peut interrompre l'étude à tout moment. Si cela se produit, je ne recevrai plus de médicaments à l'étude ni les évaluations prévues.
- ✓ J'ai lu et je comprends cette déclaration de consentement éclairé ainsi que les risques qui y sont décrits.
- ✓ Je sais que je recevrai une copie signée et datée de ce formulaire de consentement.
- ✓ Je sais que je peux retirer mon consentement à tout moment.
- ✓ J'ai eu la possibilité de poser des questions et j'ai compris les réponses qui ont été données à toutes mes questions

Nom du patient : _____

(en caractère d'imprimerie)

Signature du patient : _____ Date : _____

Nom de la personne ayant conduit la discussion de consentement éclairé :

(en caractère d'imprimerie)

Signature de la personne ayant conduit la discussion de consentement éclairé :

Date :

PUBLICATIONS

ARTICLE

1

International Journal of Pharmaceutics 334

(2007) 35-41

Development and evaluation of new multiple-unit levodopa sustained-release floating dosage forms

J. Goole^a, F. Vanderbist^b, K. Amighi^{a,*}

^a *Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 207, Boulevard du Triomphe, Brussels 1050, Belgium*

^b *Laboratoires SMB S.A., Rue de la Pastorale, Brussels 1080, Belgium*

Received 7 July 2006; received in revised form 4 October 2006; accepted 9 October 2006

Available online 13 October 2006

Abstract

This work relates to the development and the *in vitro* evaluation of sustained-release minitables (MT), prepared by melt granulation and subsequent compression, which are designed to float over an extended period of time. Levodopa was used as a model drug. The importance of the composition and manufacturing parameters of the MT on their floating and dissolution properties was then examined. The investigation showed that MT composition and MT diameter had the greatest influence on drug release, which was sustained for more than 8 h. By using the same formulation, the best floating properties were obtained with 3 mm MT prepared at low compression forces ranging between 50 and 100 N. Their resultant-weight (RW) values were always higher than those obtained with a marketed HBS dosage form within 13 h. When they were filled into gelatin capsules, no sticking was observed. By evaluating the dissolution profiles of levodopa at different pH values, it was found that dissolution profiles depend more on the prolonged-release ability of Methocel[®] K15M than on the pH-dependent solubility of levodopa. Finally, the robustness of the floating MT was assessed by testing the drug release variability in function of the stirring conditions during dissolution tests.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Minitables; Floating; Sustained-release; Melt granulation; Levodopa

1. Introduction

Oral sustained-drug-delivery formulations show some limitations connected with the gastric emptying time (GET). In particular, unpredictable GET leads to variations in the amount of drug absorbed. Moreover, a too rapid gastrointestinal transit can result in incomplete drug release from the device above the absorption zone, leading to diminish effectiveness of the administered dose when the drug presents an absorption window. A prolongation of gastric residence time (GRT) of a rate-controlled oral drug delivery system can overcome these problems by reducing the inter-subject variability, the so called “peak and trough” effect, and leads to a more predictable effect with increased bioavailability, especially for drugs with a narrow absorption window (NAW) in the upper part of the gastrointestinal tract (Hoffman et al., 2004). Moreover, extended-release dosage forms with prolonged residence time in the stomach are also highly desirable

for drugs (i) that are locally active in the stomach, (ii) that are unstable in the intestinal or colonic environment, and/or (iii) have low solubility at higher pH values (Streubel et al., 2003). As the total gastrointestinal transit time is also prolonged, the number of doses in the regimen can be reduced and so the patient compliance is improved.

Among the various attempts made to increase the retention of an oral dosage form (Moës, 1993; Iannucelli et al., 1998a; Talwar et al., 2001; Klausner et al., 2003; Sato et al., 2004), it seems that the floating drug delivery systems offer the most effective and rational protection against early and random gastric emptying compared to the other methods proposed for prolonging the GRT of solid dosage forms (Moës, 1993). In this way, Seth and Tossounian (1978, 1984) have developed a Hydrodynamically Balanced capsule System (HBSTM) based on a mixture of drugs and hydrocolloid. Upon contact with gastric fluids, the capsule shell dissolves and the hydrocolloid begins to swell, maintaining a relative integrity of shape, a bulk density lower than 1 g/ml and regulating the drug release. Unfortunately, most single-unit floating systems are generally unreliable and non-reproducible in prolonging the GRT. They also show a higher

* Corresponding author. Tel.: +32 2 650 5252; fax: +32 2 650 5269.
E-mail address: kamighi@ulb.ac.be (K. Amighi).

inter- and intra-subject variability resulting from their unpredictable all-or-nothing emptying process (Hwang et al., 1998). In contrast, multiple-unit dosage forms, such as pellets or MT, have a more reproducible GRT, a reduced inter-subject variability in absorption and offer a better dispersion through the gastrointestinal tract which offers less chance of localised mucosal damage (Singh and Kim, 2000). Co-administration of units with different release profiles or containing non-compatible substances is also possible with multiple-unit dosage forms. Rouge et al. have described 3 mm floating MT based on HPMC and using sodium bicarbonate as the gas-generating agent, prepared by direct compression. By using Methocel[®] K15M as the swellable polymer, the lag time of the MT was 17 min in water containing 0.05% (m/v) Polysorbate 20, and 42 min in artificial gastric fluid containing 0.05% (m/v) Polysorbate 20. The floating duration was above 8 h in both solutions (Rouge et al., 1997a). Floating properties of these systems may be improved by introducing a granulation step (Streubel et al., 2003).

Up to now, when a granulation step has been needed, wet granulation has been commonly used. In this work, granulates are made by a melt granulation process, followed by direct compression. Melt granulation, in which granulation is obtained through the melting or softening of a binder with a low melting point, is a very short one-step single-pot production process. As it is a solvent-free process, the drying phase is eliminated and thus it becomes less consuming in terms of time and energy (Hamdani et al., 2002).

The present investigation concerns the development and the in vitro evaluation of oral sustained-release floating granulates, made by melt granulation and compressed into MT, which are designed to float on the surface of aqueous fluids – including gastric juice and intestinal fluids – over an extended period of time. The drug used as a model was levodopa because of its NAW in the upper part of the small intestine (Rouge et al., 1996). Moreover, this drug is characterized by a relatively short elimination plasma half-life time in humans ($t_{1/2} = 1$ h) (Clarke, 1986), which makes it an attractive candidate for a gastric retentive dosage form.

This paper aims to evaluate the influence of formulation and manufacturing parameters and dissolution test conditions on the in vitro release profiles of levodopa.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Levodopa (Newsmart, China) was used as a model drug. Dissolution tests were performed in a dark room to avoid possible drug alteration. Glyceryl palmitostearate (Precirol[®] ATO 5 = Gelucire[®] 54/02) and glyceryl behenate (Compritol[®] 888 = Gelucire[®] 70/02), supplied by Gattefosse (France), were used as a meltable binder and a lipophilic diluent, respectively. The lipidic materials have to occur as fine white free-flowing powders. High and low viscosity grades HPMC (Methocel[®] K15M and Methocel[®] E5, Colorcon, England) were used as a gel-forming polymer and a coating agent, respectively. Tartaric acid (Federa, Belgium), sodium bicarbonate (Merck, Germany) and calcium carbonate (Welpher, Belgium)

were employed as carbon dioxide-generating agents. Lactose 450 mesh (DMV International, Netherlands) was used as a hydrophilic diluent. The disintegrating agent used as protective filler against MT sticking and filled into capsules in some tests was sodium croscarmellose (Ac-Di-Sol[®], FMC, Philadelphia, USA). Prolopa[®] HBS 125 (Roche, Belgium) is used as a model to compare its resultant-weight profiles with our multiple-units dosage form.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of minitables

2.2.1.1. Granulate manufacture. Granulates were made in a small vertical laboratory-scale high-shear mixer, Mi-Pro[®] (Pro-C-epT, Belgium), equipped with a transparent bowl and a heating jacket (Hamdani et al., 2002). The granulate compositions are listed in Table 1.

All experiments were started at an impeller speed (IS) of 1800 rpm and a chopper speed (CS) of 130 rpm while the temperature of the heating jacket was set at 60 °C. When the product temperature reaches sufficiently high values to soften the binder, torque increases sharply due to granule formation (Hamdani et al., 2002). In order to avoid any further product temperature increase, the IS was reduced to 600 rpm after the granule formation step while the CS was increased to 1000 rpm to break the possible agglomerates. The massing time was kept constant at 5 min. The length of the whole granulate manufacturing process was around 20 min. At the end of the process, the granulates were cooled at ambient temperature.

The volume size distribution of the granulates was measured with a Mastersizer 2000 Laser Diffractometer in dry powder

Table 1
Compositions of the investigated granulates (all quantities are given as percentages, w/w) and corresponding MT properties

	Formulation number			
	F1	F2	F3	F4
Levodopa	37.5	37.5	37.5	37.5
Precirol [®] ATO5	12.0	12.0	12.0	12.0
Compritol [®] 888	–	–	–	6.0
Methocel [®] K15M	25.0	15.0	15.0	15.0
CaCO ₃	10.0	10.0	5.0	5.0
NaHCO ₃	4.0	4.0	4.0	4.0
Tartaric acid	3.0	3.0	3.0	3.0
Lactose 450 mesh	8.5	18.5	23.5	17.5
	Diameter (mm)			
	3	4	5	
Weight (mg)	20	40	60	
Compression forces (N)	(a) 50–100			
	(b) 100–200	2000–3000	3000–4000	
	(c) 200–400			
	(d) 1000–2000			
Hardness (N) ($n = 10$)	(a) 5 ± 1			
	(b) 8 ± 1	22 ± 3	28 ± 2	
	(c) 11 ± 1			
	(d) 14 ± 1			

form (Sciocco 2000, Malvern Instrument, UK) with a suitable Standard Operating Procedure (SOP) (refractive index 1.52, dispersive air pressure 1 bar, vibration rate 50%, measurement time 30 s). The mean particle size, represented by the equivalent volume diameter $D[4,3]$, of granulates should be around 150 μm to provide good flow properties.

2.2.1.2. Minitablet preparation. MT were prepared by direct compression. Granulates were fed manually into the die of an instrumented single-punch tableting machine (Korch, Germany) to produce FMT using concave-faced punches and dies. The compression forces, the weight and the hardness according to the diameter of the FMT are summarized in Table 1. The hardness was measured with a hardness tester (Computest, Kreamer GmbH, EL Elektronik, Darmstadt, Germany).

2.2.2. Determination of physicochemical properties of FMT

2.2.2.1. In vitro evaluation of floating capabilities. The FMT ($n=3$) were placed in 70 ml of 0.1N HCl solution containing 0.05% (w/v) Polysorbate 20 (pH 1.2, 37 °C), followed by horizontal shaking at 100 cycles/min (GFL 1086, Germany). The floating lag time and floating duration were determined by visual observation.

To determine the buoyancy capabilities of the FMT, an apparatus designed for dynamic measurement of the total force acting vertically on an immersed object was also used. This is the RW apparatus proposed by Timmermans and Moës (1990) for studying floating magnitude evolution as a function of time. By convention, a positive RW signifies that the object is able to float, whereas a negative RW means that the object sinks. FMT were placed in a specially designed basket sample holder, which was immersed in 1200 ml of preheated 0.1N HCl solution containing 0.05% (w/v) Polysorbate 20 (pH 1.2, 37 °C). The RW was measured every minute for 13 h.

2.2.2.2. Dissolution studies. A Distek 2100C USP 29 dissolution apparatus (Distek Inc., North Brunswick, NJ, USA) Type II (paddle method) was used for the dissolution tests. The rotational speeds employed were 50, 60, 75 and 100 rpm. Release testing was carried out in 900 ml of phosphate buffer solutions (0.05 M) containing 0.05% (w/v) Polysorbate 20 at pH 1.5, 3.0 and 6.5. The temperature of the dissolution media was maintained at 37.0 ± 0.2 °C. Dissolutions were carried out on an equivalent of 150 mg of levodopa and the amount of drug released was detected spectrophotometrically at 280 nm (Agilent 8453 UV–vis Dissolution Testing System, Agilent, USA). The percentages of drug release were measured at preselected time intervals and averaged ($n=5$).

2.2.3. Statistical evaluation

As recommended in the FDAs Guidances for Industry, the similarity factor f_2 was used as a determination for assessing the similarity of dissolution profiles (FDA, 1997; Shah et al., 1998). The compared dissolution profiles were obtained under the same test conditions and their dissolution time points were the same, e.g. for controlled release products, they were 1, 3, 5 and 8 h. As indicated by Shah et al. (1998), the similarity factor

f_2 value has to be higher than 50 in order to assess the similarity between two dissolution profiles.

3. Results and discussion

3.1. Influence of the formulation on the drug release and the floating behaviour

In order to develop the desired sustained-release FMT, it was necessary to optimize both the floating properties and the release rate of the drug from the system. A swelling agent was used both to trap the carbon dioxide generated by the effervescent components and to provide the sustained release of the drug. Methocel® K15M was used because Wan et al. showed that the normalized increase in matrix thickness after 30 min swelling for HPMC matrix tablets increased with molecular weight (Wan et al., 1995). Moreover, compared to polymers that had a lower molecular weight, the higher molecular weight HPMC polymers, such as Methocel® K15M, swelled but did not erode to a significant extent because of their higher intrinsic water-holding capacity (Kavanah and Corrigan, 2004). These properties consequently allowed avoidance of the burst effect and improved prolonged release. Rouge et al. have also shown that the lag time decreased with increased molecular weight of Methocel® type K (Rouge et al., 1997a). The gas-generating blend decreases the lag time by accelerating the hydration of the swelling polymer, thus allowing a higher floating duration because of the constant generation and subsequent trapping of carbon dioxide. Tartaric acid permits the generation of carbon dioxide even if gastric pH is abnormally high.

Precirol® was used as lipidic binder, softening at a relatively low temperature. After softening, the binder acts like a liquid binder. Moreover Precirol® and Compritol®, as lipidic agents, are able to slow down the water diffusion inside the dosage form providing a prolonged release of the incorporated drugs.

The influence of the formulation was evaluated for the 4 mm minitables at pH 3.0 with a rotational speed of 60 rpm. The F1 provided a sustained release of levodopa immediately after immersion with no burst effect (Fig. 1a). The polymer percentage, 25% (w/w), was high enough to prolong the release of the drug. In fact, in the time interval of 8 h, approximately 70% of the incorporated drug was released with the whole dose being released after 20 h. Floating capabilities of F1 were then evaluated using the RW method (Fig. 1b). The FMT floated after 12 min and they remained buoyant for more than 780 min. The maximal RW value reached was 29/100 mg. The lag time value was corroborated by the horizontal shaking method, which also showed that the FMT remained buoyant until complete erosion.

The percentage of Methocel® K15M was then decreased to 15% in F2. Unfortunately, by preserving the same percentage of gas-generating agents, the amount of HPMC was not high enough to preserve the integrity of the dosage form. As can be seen in Fig. 1a, the entire dose of levodopa was released after only 1.5 h and the MT showed no floating capability because of their early disintegration. A coating based on Methocel® E5 (2%, w/w) neither preserved the integrity of the shape nor allowed sustained release to occur (data not shown).

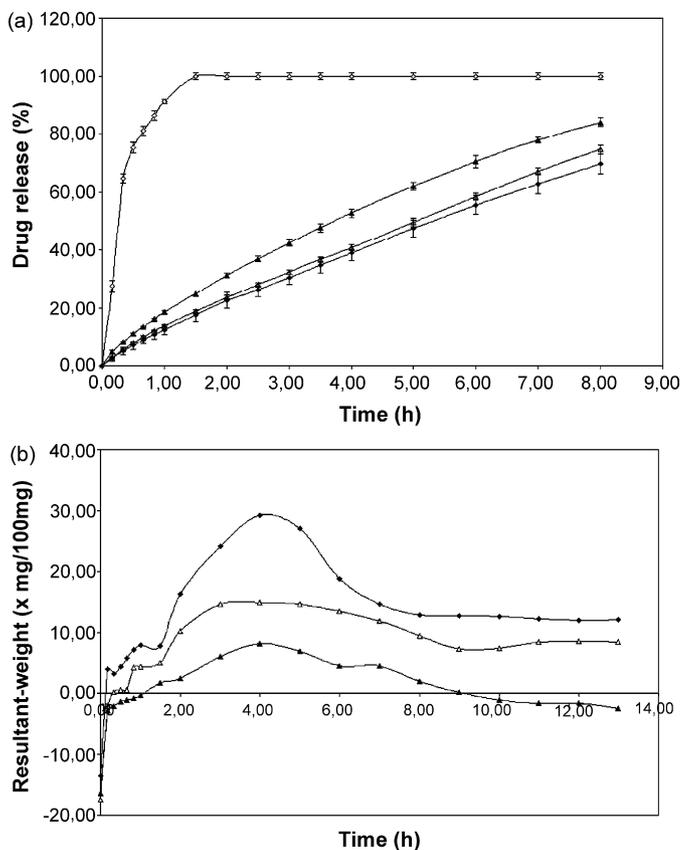


Fig. 1. Influence of the formulation – F1 (●), F2 (○), F3 (△) and F4 (▲) – (a) on levodopa release from the 4 mm FMT at pH 3.0 (apparatus II, 60 rpm) ($n=5$) and (b) on the floating properties of the 4 mm FMT in a 0.1N HCl solution using the RW method ($n=1$).

The amount of carbon dioxide-generating agents was therefore decreased to 12% in F3. Using the new formula, the integrity of the shape was maintained resulting in a sustained release of the drug. The floating lag time increased to 90 min and the maximal RW decreased to 8/100 mg. Moreover, as the FMT sank after 9 h, the total floating duration was only 7.5 h. The dissolution rate of the drug obtained with F3 was faster than that obtained with F1 due to the lower amount of HPMC.

In order to decrease the drug release rate and improve the floating properties, Compritol® 888 was added to F4. This lipidic diluent was able to sustain the release of the drug because of its hydrophobic nature and was able to improve the floating properties because of its relatively low density. This formulation had the same release profile as that obtained with the F1. In comparison with F3, the floating properties were improved. The floating lag time was 20 min and the maximal RW value reached 15 mg/ml. If these results were better than those obtained with F3, they were inferior to those obtained with F1. So, F1 was selected to evaluate the influence of the FMT diameter on the drug release and floating properties.

3.2. Influence of the minitables diameter

A simple, but very effective way to modify the drug release kinetic from MT was to change their diameters. Varying the

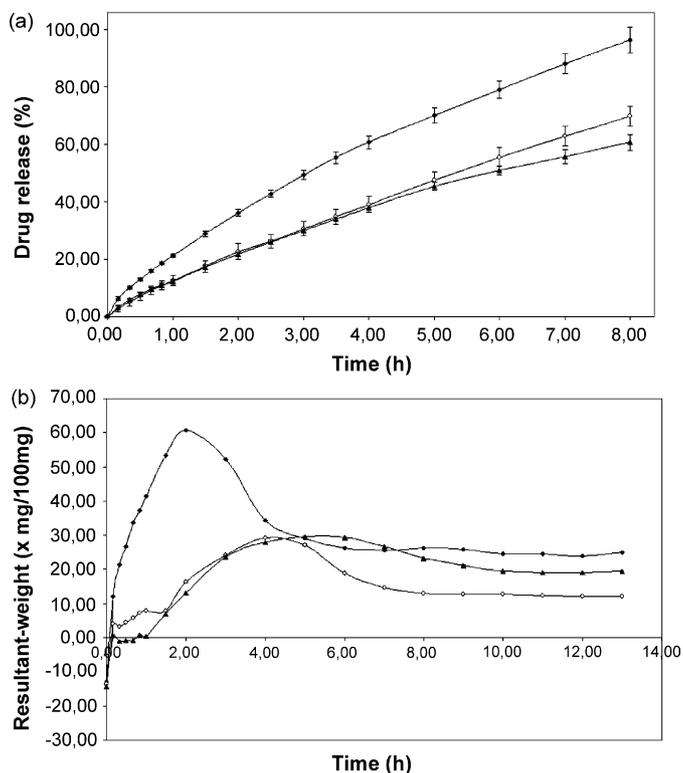


Fig. 2. Influence of the MT diameter – 3 mm (●), 4 mm (○) and 5 mm (▲) – (a) on levodopa release from FMT composed according to F1 at pH 3.0 (apparatus II, 60 rpm) ($n=5$) and (b) on the floating properties of the FMT in a 0.1N HCl solution using the RW method ($n=1$).

radius of the FMT and thus their hardness and weight, strongly affected their floating properties and the resulting drug release. In fact, the release rate of the drug increased proportionally to the decrease in FMT diameter. This can be attributed to the higher relative surface area of the dosage form when the FMT diameter decreased which gave a proportionately greater area of contact between the FMT and the solution.

Dissolution tests, performed at pH 3.0 with FMT according to F1 (60 rpm), have shown relatively faster dissolution profiles for 3 mm FMT in comparison to that obtained from 4 to 5 mm FMT (Fig. 2a). Moreover, even with the 3 mm FMT, the sustained release occurred immediately after immersion, with no burst effect.

The RW measurement showed that the lag time values increased according to the increase in the diameter and were 1, 12 and 45 min for the 3, 4 and 5 mm FMT, respectively (Fig. 2b). This can be explained by the increase in the initial weight that occurred as the diameter increased. The 3 mm FMT showed the highest maximal RW value – about 60/100 mg – and floated for more than 13 h. Thus, the 3 mm FMT were selected to evaluate the influence of the compression force on the drug release and the floating properties.

3.3. Influence of the compression force

The dissolution results (pH 3.0, 60 rpm) of the 3 mm FMT, composed according to F1 and compressed at different compression forces (Table 1), showed that the drug release rate did

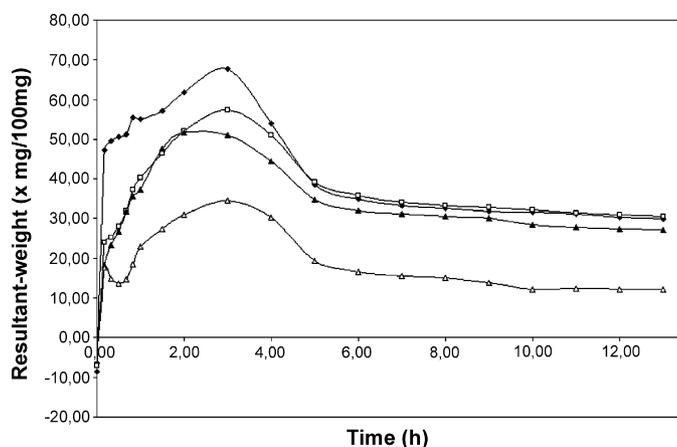


Fig. 3. Floating properties of the 3 mm FMT composed according to F1 and compressed at 50–100 N (●), 100–200 N (□), 200–400 N (▲) and 1000–2000 N (Δ), in a 0.1N HCl solution using the RW method ($n = 1$).

not change as compression forces increased from 50 to 2000 N (data not shown). All dissolution profiles were statistically similar, regardless of compression pressure applied, e.g. the lowest f_2 value was 96.38. Even at the lowest compression force, no burst effect was observed. This was probably due to the high amount of effervescent compounds, which helped to accelerate the hydration of the swelling polymer.

By contrast, the floating properties were influenced by the level of compression force (Fig. 3). Even if all floating lag time values were lower than 10 min (about 1 min), the highest RW value was obtained with the lowest compression force and was 68/100 mg.

Friability evaluation according to the European Pharmacopoeia showed that the loss of weight was lower than 1% whatever the compression force used. As it seemed that low compaction pressures improved floating ability, the robustness of our FMT was tested by using a 50–100 N compression force.

3.4. Sticking evaluation

According to Rouge et al., hydrophilic minimatrices introduced into a capsule exhibit a strong tendency to adhere to one another due to the presence of the gelatin capsule and to the earlier hydration of the minitables (Rouge et al., 1997b). An incomplete dispersion of FMT could involve therapeutic problems due to the possible inter- and intra-subject variation. As the sticking of MT occurs in a random way, it can be evaluated in vitro by analysis of the dissolution profile and more particularly by the increase of the standard deviations. A disintegrating agent – Ac-Di-Sol® – was used to prevent possible adhesion between FMT during the dissolution of the capsule shell.

Gelatin capsules 0 were filled with the FMT, and, the empty space between the FMT within the capsule was filled with the disintegrating agent. The total amount of the protective filler was about 150 mg. FMT filled into capsules without the disintegrating agent were also tested for comparison. Dissolution tests were performed at pH 3.0, 60 rpm.

When FMT were filled into the capsule without the disintegrating agent, the dissolution of levodopa was slightly delayed

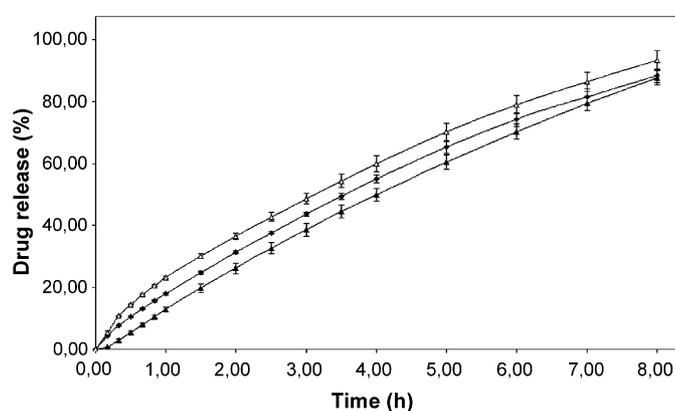


Fig. 4. Dissolution profiles for 3 mm FMT composed according to F1 and filled into a gelatin capsule, with (Δ) or without (▲) a disintegrating agent, or not filled (●) into a capsule (apparatus II, 60 rpm, pH 3.0) ($n = 5$).

by about 10 min (Fig. 4). We observed visually that the gelatin capsule opened within 1–2 min after immersion in the liquid and was completely dissolved after 10 min. FMT were dispersed and floated immediately after the complete dissolution of the capsule shell. In contrast, in the presence of the disintegrating agent, the complete disintegration of the capsule occurred 1–2 min after its opening. In this case, the release of the drug was not delayed but the MT did not float immediately. The standard deviations did not increase in the absence of the protective filler. Moreover, with ($f_2 = 82.6$) or without ($f_2 = 85.5$) disintegrating agent, the dissolution profiles were statistically similar to that obtained with the FMT not filled into a gelatin capsule. Thus, it seems that with the present FMT, the use of a disintegrating agent is not required.

3.5. Effect of pH on drug release

First of all, the solubility of levodopa was evaluated in function of the pH by using the same phosphate buffer as that used for the dissolution tests. It was found that its solubility at 37.0 °C was 760, 400, and 365 $\mu\text{g/ml}$ at pH values of 1.5, 3.0 and 6.5, respectively. This suggested that levodopa was a drug with a pH-dependent solubility. Thus, the dissolution rates of levodopa were tested at 60 rpm in phosphate buffers at pH values of 1.5, 3.0 and 6.5. These pH values were selected to simulate gastric pH in fasted and fed (standard meal) conditions and duodenal pH, respectively.

At each of the three pH values, a sustained release of levodopa occurred immediately after immersion, with no burst effect (Fig. 5). Even though the release of the drug was faster at pH 1.5, all dissolution profiles were statistically similar, e.g. f_2 (pH 1.5–6.5) = 57.2. It seems that the dissolution rate depends more on the prolonged-release ability of Methocel® K15M than on the pH-dependent solubility of the drug. The FMT seem to be able to provide a constant sustained release of levodopa from the stomach to the intestine.

3.6. Agitation rate

Different mass transport processes may occur during drug release from polymer-based matrix systems, including (i) water

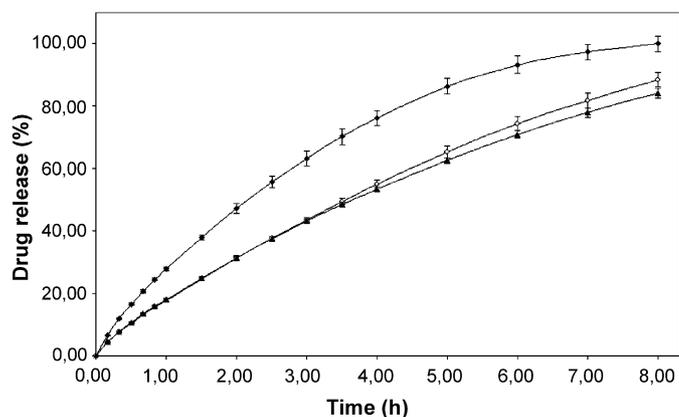


Fig. 5. In vitro dissolution profiles of levodopa from 3 mm FMT composed according to F1 (apparatus II, 60rpm) at pH 1.5 (●), 3.0 (○) and 6.5 (▲) ($n=5$).

imbibition into the system, (ii) polymer swelling, (iii) polymer dissolution and/or erosion, (iv) drug diffusion out of the dosage form and (v) drug dissolution.

In addition to their influence on the release rate of the drug, it was considered that factors affecting swelling and erosion of the polymer could also influence the dissolution of the active substance. Thus, the susceptibility of this type of hydrophilic polymer matrix to change in its sustained-release ability in function of the agitation rate was considered as an indication of the robustness of the delivery system.

The effect of agitation rate on the levodopa dissolution rate was examined at pH 3.0 by using the paddle method. The release rate of the drug increased as the stirring rate increased (Fig. 6) according to the reduction of the thickness of the stagnant layer as described in the Noyes–Whitney equation (Fukunaka et al., 2006). It was also due to a more rapid erosion of matrix tablets at the higher stirring rates that occurred because of the increased rate of detachment of polymer chains away from the matrix surface. This led to a thinner layer of gel forming at the surface of the dosage form at higher agitation rates.

However, even if an influence of the agitation rate on drug release was observed, there was no burst effect and no disintegration of the FMT, regardless of the agitation rate, within the

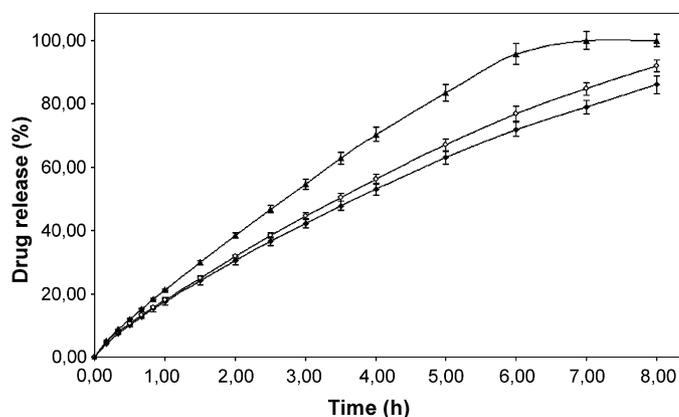


Fig. 6. Influence of the stirring rate – 50 rpm (●), 75 rpm (○), 100 rpm (▲) – on the levodopa release rate from 3 mm FMT composed according to F1 at pH 3.0 using the paddle method ($n=5$).

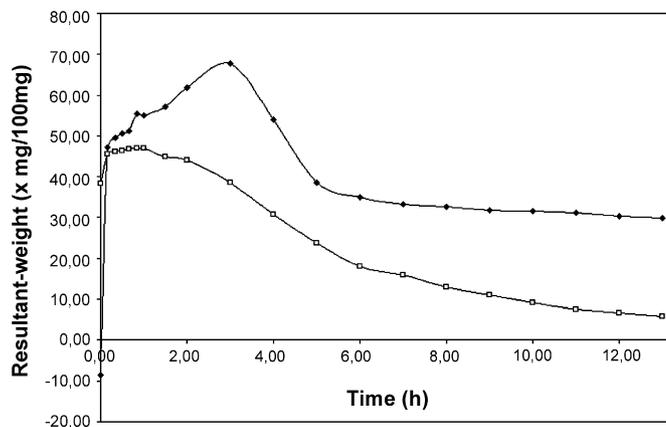


Fig. 7. RW profiles obtained with 3 mm FMT composed according to F1 (●) and HBS dosage form (□) ($n=1$).

experimental period. Moreover, as all dissolution profiles were statistically similar – e.g. f_2 (50–100 rpm) = 62.7 – it can be concluded that our FMT show a good level of robustness.

The results obtained using the basket method were similar than those obtained using the paddle method (date not shown).

3.7. Floating properties obtained with FMT and HBS dosage form

Two different approaches, using either polymer-mediated non-effervescent or effervescent systems, have been proposed in the literature for the development of floating drug delivery systems (Singh and Kim, 2000). The commercial HBS dosage form is a non-effervescent system, while the present FMT is an effervescent one. Their floating properties were compared using the RW apparatus since the GRT of buoyant units depends not only on the initial density but also on the evolution of their density as a function of time.

The HBS capsule system presented no lag time due to its very low initial density. Its maximal RW value (~45/100 mg) was obtained after 10 min and remained constant for about 1 h (Fig. 7). During this time period, the increase in volume was greater than the increase in mass during swelling. However, afterwards, its floating strength decreased as a result of the development of its hydrodynamic equilibrium. The lag time of our FMT was only 1 min. From 10 min to the end of the test, the RW values were higher than those obtained with the commercial HBS dosage form. In fact, the floating capabilities of FMT did not decrease until the end of the test because carbon dioxide was continuously produced and entrapped in the swelling polymer. It seems that the incorporation of gas-generating agents improve the floating properties. Different studies reported in the literature have indicated that pharmaceutical dosage forms exhibiting good in vitro floating behaviour show prolonged gastric residence in vivo (Iannucelli et al., 1998b; Singh and Kim, 2000).

4. Conclusion

In conclusion, a new multiple-unit floating drug delivery system has been developed which is based on the use of a very

simple composition, produced by melt granulation and subsequent compression. The most successful mixture (F1) contained 37.5% of drug, 12.0% of meltable binder, 25.0% of Methocel® K15M and 17.0% of carbon dioxide generating agent. The most suitable diameter of the FMT was 3 mm and their compression force was ranged between 50 and 100 N. These MT floated after only 1 min and remained buoyant more than 13 h. Their ability to sustain drug release over an extended period of time (more than 8 h) has been demonstrated. Their robustness under varying pHs or agitation rates was also demonstrated. They showed no sticking tendency when they were filled into a capsule.

If these results are encouraging, it has to be pointed out that good in vitro floating behaviour alone is not sufficient proof of efficient prolonged gastric retention in vivo. Therefore, to validate the in vitro evaluations, in vivo studies shall be conducted in the near future with these FMT.

References

- Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post-Mortem Material, 1986. 2nd ed., The Pharmaceutical Press, London.
- Fukunaka, T., Yaegashi, Y., Nunoko, T., Ito, R., Golman, B., Shinohara, K., 2006. Dissolution characteristics of cylindrical particles and tablets. *Int. J. Pharm.* 310, 146–153.
- Guidance for Industry, Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations, September 1997. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.
- Hamdani, J., Moës, A.J., Amighi, K., 2002. Development and evaluation of prolonged release pellets obtained by the melt pelletization process. *Int. J. Pharm.* 245, 167–177.
- Hoffman, A., Stepensky, D., Lavy, E., Eyal, S., Klausner, E., Friedman, M., 2004. Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms. *Int. J. Pharm.* 277, 141–153.
- Hwang, S.-J., Park, H., Park, K., 1998. Gastric retentive drug-delivery systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 15, 243–284.
- Iannucelli, V., Coppi, G., Sansone, R., Ferolla, G., 1998a. Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence. Part I. Formulation study. *Int. J. Pharm.* 174, 47–54.
- Iannucelli, V., Coppi, G., Sansone, R., Ferolla, G., 1998b. Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence. Part II. In vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 174, 55–62.
- Kavanah, N., Corrigan, O.I., 2004. Swelling and erosion properties of hydroxypropylmethylcellulose (hypromellose) matrices—influence of agitation rate and dissolution medium composition. *Int. J. Pharm.* 279, 141–152.
- Klausner, E.A., Lavy, E., Friedman, M., Hoffman, A., 2003. Expandable gastroretentive dosage forms. *J. Control. Release* 90, 143–162.
- Moës, A.J., 1993. Gastroretentive dosage forms. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 10, 143–195.
- Rouge, N., Buri, P., Doelker, E., 1996. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. *Int. J. Pharm.* 136, 117–139.
- Rouge, N., Cole, E.T., Doelker, E., Buri, P., 1997a. Screening of potentially floating excipients for minitables. *STP Pharma Sci.* 7, 386–392.
- Rouge, N., Leroux, J.-C., Cole, E.T., Doelker, E., Buri, P., 1997b. Prevention of the sticking tendency of floating minitables filed into hard gelatin capsule. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43, 165–171.
- Sato, Y., Kawashima, Y., Takeuchi, H., Yamaoto, H., 2004. In vitro and in vivo evaluation of riboflavin-containing microballoons for a floating controlled drug delivery system in healthy humans. *Int. J. Pharm.* 275, 97–107.
- Seth, P.R., Tossounian, J.L., 1978. Sustained-release pharmaceutical capsules, US Patent 4,126,672.
- Seth, P.R., Tossounian, J.L., 1984. The hydrodynamically balanced system (HBS™): a novel drug delivery system for oral use. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 10, 313–339.
- Shah, V.P., Tsong, Y., Sathe, P., Liu, J.-P., 1998. In vitro dissolution profile comparison—statistics and analysis of the similarity factor f_2 . *Pharm. Res.* 15, 889–896.
- Singh, B.N., Kim, K.H., 2000. Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention. *J. Control. Release* 63, 235–259.
- Streubel, A., Siepmann, J., Bodmeier, R., 2003. Floating matrix tablets based on low density foam powder: effects of formulation and processing parameters on drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.* 18, 37–45.
- Talwar, N., Sen, H., Staniforth, J.N., 2001. Orally administered controlled drug delivery system providing temporal and spacial control, US Patent 6,261,601.
- Timmermans, J., Moës, A.J., 1990. Measuring the resultant-weight of an immersed test material. I. Validation of an apparatus and a method dedicated to pharmaceutical applications. *Acta Pharm. Technol.* 36, 171–175.
- Wan, L.S.C., Heng, P.W.S., Wong, L.F., 1995. Matrix swelling: a simple model describing extend of swelling of HPMC matrices. *Int. J. Pharm.* 116, 159–168.

ARTICLE

2

Journal of Drug Delivery Science and Technology 16
(2006) 351-356

***In vitro* and *in vivo* evaluation in healthy human volunteers of floating riboflavin minitables**

J. Goole¹, J. Hamdani¹, F. Vanderbist², K. Amighi^{1*}

¹Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Université libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 207, Boulevard du Triomphe, Brussels 1050, Belgium

²Laboratoires SMB SA, Rue de la Pastorale, Brussels 1080, Belgium

*Correspondence: kamighi@ulb.ac.be

This work relates to sustained-release floating minitables which are able to float on the surface of aqueous fluids for an extended period of time. Firstly, granules were prepared by melt granulation and then, compressed into minitables to obtain a multiple-unit system. Formulations were based on the use of a meltable binder, a swellable hydrocolloid and on a mixture of gas-generating agents. In vitro and in vivo evaluations of floating capability were performed. To assess the usefulness of the intragastric buoyancy properties of the floating minitables (FMT), non-floating minitables (NFMT) with in vitro riboflavin (RF) release profiles equivalent to the FMT were prepared. FMT and NFMT were administered orally to nine healthy volunteers. The volunteers were divided into two groups, a fasted group (n = 5) and a fed group (n = 4). The pharmacokinetic parameters were investigated by analysis of riboflavin urinary excretion leading to the observation that the mean amount of riboflavin excreted in the urine seemed to increase when FMT were administered after a meal, but did not increase when NFMT were administered. As riboflavin has a narrow absorption window in the upper part of small intestine, this phenomenon could be attributed to gastric retention of the floating minitables.

Key words: Melt granulation – Floating minitables – Sustained-release – Riboflavin – Urinary excretion – In vivo study.

Among the different ways of drugs administration, the oral route has received the most attention. This is due to the ease of administration that it affords, which provides better patient compliance as compared to other modes of drug intake, and also to its broad flexibility in dosage form design [1].

The development of a sustained-release dosage form capable of staying in the stomach over an extended period of time may be useful for the delivery of many different kinds of drugs, especially for drugs that act locally in the stomach, e.g. misoprostol [2] or stomach-specific antibiotic drug delivery used in the treatment of *Helicobacter pylori* [3, 4], and for drugs characterized by a narrow absorption window (NAW) in the upper part of the gastrointestinal tract [5], e.g. levodopa, pravastatin, allopurinol, ciprofloxacin, furosemide [6].

A new floating multiple-unit system has been developed in our laboratory. Firstly, granules are produced by melt granulation and then compressed into minitables by direct compression. Melt granulation is a solvent-free process, eliminating the drying phase and thus leading to a less consuming process in terms of time and energy. Most of the floating systems reported in literature are single-unit systems, which are generally unreliable and non-reproducible in prolonging gastric residence time (GRT), owing to their unpredictable all-or-nothing emptying process, i.e. a hydrodynamically balanced system (HBS) which presents fragmentation problems during gastric transit, giving rise to high *in vivo* intra- and inter-individual variations [7, 8]. Multiple-unit dosage forms appear to be more suitable for the development of sustained-release dosage forms since they claim to show reduced inter-subject variability in absorption, lower dose-dumping probability, have a more reproducible GRT and show better dispersal throughout the gastrointestinal tract [9]. Two different approaches, using either polymer-mediated non-effervescent (e.g. HBS system) or effervescent systems, have been proposed in the development of floating drug delivery systems [10]. Gas-generating systems continuously produce carbon dioxide, which is trapped in the hydrocolloid. Therefore, in this work, minitables were developed in order to remain buoyant

until their complete erosion and to ensure their floating capabilities do not decrease until the end of drug release. This is not the case for a HBS system as its floating strength decreases after immersion into the fluid as a result of the development of its hydrodynamic equilibrium [10].

The aim of the current investigation is to evaluate the intragastric buoyant properties of floating sustained-release minitables using fasted and fed healthy volunteers. RF was chosen as drug tracer because its absorption occurs mainly in the proximal small intestine and it undergoes very little metabolism (its plasma half-life time is 1 h) [11]. Riboflavin was used in its salt form: sodium riboflavin 5'-phosphate (RF5'PNa) as this derivative is more water-soluble than riboflavin itself but is subject to the same absorption and transport mechanisms. It is excreted in the urine in the form of RF [12]. It has been established by Levy *et al.* [13] that all variations in gastric transit time for a dosage form containing RF affect both the absorption rate and the quantity of drug absorbed. This allows indirect demonstration of an increase in the residence time of the dosage form above the absorption area: any increase of the GRT of the dosage form increases the quantities of RF absorbed and thus eliminated RF [14]. Ingani *et al.* [14] administered floating tablets and Klausner *et al.* [15] administered a new unfolding multilayer system to healthy volunteers under fasted and fed conditions. Using RF as drug tracer, both found that the amounts of riboflavin excreted in the urine increased with a gastroretentive dosage form in comparison with a non-gastroretentive one. Multiple-unit floating systems appear to have the same properties: Sato *et al.* [11, 16] found that the excretion half-time of floating microballoons was prolonged significantly in comparison with non-floating ones by feeding.

The pharmacokinetic parameters can therefore be examined via analysis of urinary excretion of RF following oral administration in humans [11, 14, 16]. To assess floating RF5'PNa minitables' capability to float on the gastric content and its usefulness in achieving an extended gastric transit, these minitables were compared with non-floating RF5'PNa minitables.

I. MATERIALS AND METHODS

1. Materials

Sodium riboflavin-5'-phosphate (Certa, Belgium), was employed as a drug tracer. As RF is a high photolabile compound when it is in aqueous solution [17, 18], all experiments were performed under subdued light or in a dark room to avoid alteration. Glyceryl palmitostearate (Precirol ATO5 = Gelucire 54/02) was supplied by Gattefossé (France) and used as a lipophilic binder. This binder occurs as a fine, white free-flowing powder. Methocel K15M and Methocel E5 (Colorcon, Kent, UK) were used as a gel-forming polymer and a coating agent respectively. Tartaric acid (Federa, Brussels, Belgium), sodium bicarbonate (Merck, Darmstadt, Germany) and calcium carbonate (AlphaPharma, Belgium) were used as gas-generating agents. A small amount of tartaric acid facilitates the generation of carbon dioxide. Sodium bicarbonate quickly generates the carbon dioxide, reducing the lag time of the minitables. Calcium carbonate progressively generates the carbon dioxide, allowing a prolonged floating duration. Lactose 450 mesh (DMV International, The Netherlands) was used as a hydrophilic diluent.

2. Methods

2.1. Preparation of minitables

2.1.1. Manufacture of granules

Granules were made in a vertical small laboratory-scale high-shear mixer, Mi-Pro (Pro-C-epT, Zelzate, Belgium), equipped with a transparent bowl and a heating jacket. The bowl capacity and batch sizes were 1,700 mL and 250 g, respectively. The rotational speeds of the impeller and chopper on the vertically positioned mixing arms can be varied between 0-1,800 and 0-4,000 rpm, respectively. Throughout the granulation process, product temperature (IR temperature probe), torque (N.m.) and rotational speeds were measured and monitored as a function of time. Analysis of the torque and temperature profiles allowed the control of the formation of the granules [19]. Formulations and manufacturing conditions are shown in Table I. All experiments were started at an impeller speed (IS) of 1,800 rpm and a chopper speed (CS) of 130 rpm while the temperature of heating jacket was set at 60°C. When the product temperature reaches sufficiently high values to soften the binder, torque increases sharply due to granulate formation [19]. The granulation step is more difficult to reach when the content of Methocel K15M is above 25% of the total formulation.

Table I - Formulations and manufacturing conditions of floating and non-floating riboflavin minitables.

Formulations (% w/w)		Manufacturing conditions
FMT		
Sodium riboflavin-5'-phosphate	5	<i>Before granulation</i>
Precirol ATO5	12	IS: 1800 rpm
Methocel K15M	25	CS: 130 rpm
CaCO ₃	10	Heating jacket: 60°C
NaHCO ₃	4	<i>After granulation</i>
Tartaric acid	3	IS: 600 rpm
Lactose 450 mesh	41	CS: 2,000 rpm
		Heating jacket: 60°C
		Massing time: 5 min
NFMT		
Sodium riboflavin-5'-phosphate	5	<i>Before granulation</i>
Precirol ATO5	18	IS: 1800 rpm
Methocel K15M	55	CS: 130 rpm
Lactose 450mesh	22	Heating jacket: 60°C
		<i>After granulation</i>
		IS: 600 rpm
		CS: 1,000 rpm
		Heating jacket: 60°C
		Massing time: 5 min

Therefore, for the manufacture of the NFMT, the percentage of the lipidic binder was increased to 18% and CS was set at 1,000 rpm instead of 2,000 rpm. The volume size distribution of granules was measured with a Mastersizer 2000 Laser Diffractometer in dry powder form (Sciocco 2000, Malvern Instrument, Worcestershire, UK) with a suitable standard operating procedure (refractive index 1.52, dispersive air pressure 1 bar, vibration rate 50%, measurement time 30 s). The volume mean diameter, D [4,3], of granulates should be around 150 µm to provide good flow properties.

2.1.2. Minitables preparation

Minitables were prepared by compression. Granules were fed manually into the die of an instrumented single-punch tableting machine (Korch, Berlin, Germany) to produce minitables, using 4-mm concave-faced punches and dies. The weight and the hardness were kept constant and were 40 mg (± SD) and 22 N (± SD), respectively. The friability was about 0.3%. The hardness was measured with a hardness tester (Computest, Kraemer GmbH, EL Elektronik, Darmstadt, Germany).

2.1.3. Coating process

The coating solution was a water dispersion containing 7% (w/w) of Methocel E5 and 0.7% (w/w) of propyleneglycol as a plasticizing agent. The coating of FMT was performed in a fluidized-bed apparatus (Uni-Glatt, Glatt GmbH, Weimar, Germany). The mean coating level of film-coated FMT was 2% (w/w). The inlet and outlet temperatures of the drying air were 50 and 45°C, respectively. The coating solution was pumped at a flow rate of 6 g/min and the pneumatic spraying pressure was 1 bar. When it is not specified, the abbreviation FMT corresponds to the coated floating minitables. The NFMT were not coated.

2.2. Determination of physicochemical properties of FMT and NFMT

2.2.1. In vitro evaluation of floating capabilities

The FMT (n = 3) were placed in 70 mL of HCl 0.1 N solution containing 0.05% (w/v) polysorbate 20 (pH 1.2, 37°C), followed by horizontal shaking at 100 cycles/min for 8 h (GFL 1086, Hilab, Düsseldorf, Germany). The floating lag time (time period between placing minitables in the medium and minitables floating) and floating duration were determined by visual observation.

Although floating forms can be characterized by their bulk density and their floating duration, these parameters do not reflect the magnitude of the floating forces produced by the dosage form. To determine the buoyancy capabilities of the FMT and the sinking characteristics of the NFMT, an apparatus designed for dynamic measurement of the total force acting vertically on an immersed object was used. This is the resultant-weight apparatus proposed by Timmermans [20] for studying floating magnitude evolution as a function of time. By convention, a positive resultant-weight signifies that the object is able to float, whereas a negative resultant-weight means that the object sinks. Minitables were placed in a specifically designed basket sample holder, which was immersed in 1,200 mL of a HCl 0.1 N solution containing 0.05% (w/v) polysorbate 20 (pH 1.2, 37°C). The resultant-weight was measured every minute for 13 h.

2.2.2. Release studies

A Distek 2100C USP 29 dissolution apparatus (Distek Inc., North Brunswick, NJ, USA) Type II (paddle method) was used at a rotational speed of 60 rpm for *in vitro* testing of RF dissolution from minitables. Dissolution was carried out on an equivalent of 20 mg of RF5'PNa. Di-potassium hydrogen phosphate/acetic acid (0.05 M each) buffer solutions containing 0.05% (w/v) polysorbate 20 were used as the dissolution fluid at pH 1.5, 3.0 and 6.5. The volume and temperature of the dissolution medium were 900 mL and 37.0 ± 0.2°C, respectively.

The drug release from minitablets was determined at 445 nm, using an Agilent 8453 UV/Visible Dissolution Testing System (Agilent, Palo Alto, USA). The percentages of tracing agent released were measured at fixed time intervals and the average was calculated (n = 5).

The similarity factor f_2 was used as a measurement for assessing the similarity of FMT and NFMT *in vitro* dissolution profiles [21]. The compared dissolution profiles were obtained under the same test conditions and the dissolution time points for both profiles were the same. As indicated by Shah *et al.* [21], the similarity factor f_2 value has to be higher than 50 to assess the similarity between two dissolution curves.

2.3. In vivo study design

This study involved a double-blind randomized design in nine healthy male volunteers (age range: 22-45 years; weight range: 70-96 kg). The clinical protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Center of Erasme, Brussels, Belgium (Protocol ref. P200/057). The study of the FMT and the comparison with the NFMT were carried out on the same subjects. The volunteers were separated into two groups: a fasted group and a fed group (Table II). The study was conducted by administering to each subject both FMT and NFMT in two separate sessions. There was at least a 6-day washout period between each administration. The FMT and NFMT containing 20 mg of RF5'PNa were delivered in opaque hard gelatin capsules. Each subject took one capsule per session.

After an overnight fast of 12 h, each volunteer emptied his bladder and followed the standard meal protocol described in Table II. Urine was collected at regular time intervals (t = 1, 2, 3, 4, 6, 8, 14 and 23 h) and the amount of RF in the urine was measured.

2.4. Measurement of riboflavin concentration in the urine

After suitable dilution, the level of RF in the urine was measured by a spectrofluorimetric method recommended by Burch *et al.* [22] and adapted by Ingani [14]. Fluorescence intensity was measured using a Perkin Elmer LS50B fluorescence spectrophotometer (Bucks, Germany) (excitation wavelength: 440 nm; emission wavelength: 522 nm). Briefly, 4 mL of urine was introduced into a centrifugation tube with 0.4 mL of pH 3.5 acetic buffer (3.25 M). RF was oxidated by the addition of 1.0 mL of a KMnO_4 solution (4% w/v). After 1 min, the excess of KMnO_4 was reduced by 0.1 mL of a H_2O_2 solution (30%). The extraction was carried out by adding to the solution 4 g ammonium sulfate and 3.0 mL benzyl alcohol saturated with water. The tubes were shaken for 3 min and centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. One millilitre of the supernatant was taken and diluted in 7.0 mL of a solution containing 45% (v/v) ethanol in a solution of acetic acid and sodium acetate at 0.1 N each. The concentration of RF in samples was calculated with calibration curves (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A calibration curve needs to be performed on each day of manipulation because of variations in response of the fluorescence spectrophotometer.

The total amount of RF excreted in the urine and the RF urinary excretion rate can be investigated in order to try to show differences in intragastric buoyant properties between FMT and NFMT.

II. RESULTS AND DISCUSSION

1. In vitro floating properties and release studies

Before the *in vivo* study, the floating capabilities of the FMT and non-floating properties of the NFMT had to be assessed *in vitro*. Firstly, the lag times of the FMT and NFMT were evaluated by the

Table II - Time schedule and feeding regimens used throughout the *in vivo* study.

Timing	Fasted condition (n = 5)	Fed condition (n = 4)	Excretion of urine
7.45 am			Bladder emptying
Breakfast 8.00 am	-	200 mL orange juice 3 slices toast 10 g margarine 20 g jam 50 g light cheese 150 mL tea + 6 g sugar	
8.30 am	Administration of a capsule with 200 mL water	Administration of a capsule with 200 mL water	t_0 (capsule administration)
9.30 am			t_{1h}
10.20 am	200 mL water	85 g fruit pie 150 mL tea ± 6 g sugar	
10.30 am			t_{2h}
11.30 am	200 mL water		t_{3h}
12.30 pm			t_{4h}
Lunch 12.50 pm	200 mL vegetable soup 150 g chicken 50 g tomato sauce 100 g potatoes 175 mL water 150 mL tea + 6 g sugar	200 mL vegetable soup 150 g chicken 50 g tomato sauce 100 g potatoes 175 mL water 150 mL tea + 6 g sugar	
2.30 pm			t_{6h}
Snack 3.15 pm	75 g apple pie 150 mL tea + 6 g sugar	75 g apple pie 150 mL tea + 6 g sugar	
4.30 pm			t_{8h}
Total energy (Kcal)	729	1,634	
Night 10.30 pm	Free	Free	
7.30 am			t_{14h} t_{23h}

horizontal shaking method. The FMT floated after 15 min, swelled and remained buoyant until completely eroded. The NFMT sank from the beginning to the end of the test. No disintegration was observed for both systems. The floating capabilities of the FMT and NFMT were then evaluated using the resultant-weight method (Figure 1). This method showed that the FMT floated after 50 min, which is a higher value than that obtained with the horizontal shaking method, because the resultant-weight method provides no movement for minitables. *In vivo*, the lag time should be nearly the same as that evaluated by horizontal shaking. The FMT kept their floating capabilities for more than 780 min and the maximal resultant-weight value reached 43 ± 3 mg/100 mg. The NFMT showed no floating capabilities, corroborating the results obtained by the horizontal shaking method.

Release burst is higher for the uncoated FMTs than for the NFMTs because of their higher porosity due to carbon dioxide generation. Furthermore, this phenomenon is increased by the high solubility of riboflavin in aqueous solutions: the water solubility of RF5'PNA at pH 3.8 is 43 mg/mL [23]. Therefore, the floating minitables were coated with HPMC in order to reduce the burst effect (Figure 2). As the *in vivo* evaluation of floating capability is based on determining the amount of riboflavin excreted in the urine, the *in vitro* dissolution behavior of the FMT and NFMT needs to be similar. The dissolution rates of the minitables were tested in phosphate buffers at pH values of 1.5, 3 and 6.5 as shown at Figure 3. These pH values were selected to simulate gastric pH in fasted and fed conditions and duodenal pH respectively. At the three pH values, a sustained release of RF5'PNA occurs – after immersion, with no initial burst effect. The similarity factor (f_2) [21] values, which were superior to 50, indicated that the *in vitro* release profiles of RF5'PNA, obtained with both the FMT and NFMT, were similar in term of dissolution rate at pH values 1.5 ($f_2 = 50.63$), 3 ($f_2 = 64.61$) and 6.5 ($f_2 = 66.0$). It was therefore possible to compare *in vivo* the floating and non floating minitables.

2. In vivo study

The aim of the study was to compare *in vivo* floating capabilities of FMT with those of NFMT. As RF is characterized by a NAW at the upper part of gastrointestinal tract, the amount of RF absorbed should be higher after ingestion of dosage forms that have a longer residence time in the stomach, e.g. floating forms. Consequently, the amount of RF excreted in the urine should be higher after administration of FMT than after administration of NFMT, especially after feeding. The cumulative amounts of RF excreted in the urine within 23 h for each volunteer and the mean cumulative RF excretion for each group are shown in Figure 4. When compared to the NFMT, the cumulative urinary excretions tend to be higher after administration of the FMT, whether the ingestion protocol is fasted or fed, with this tendency increasing under the fed condition. A paired t-test applied to the mean cumulative RF excretion for both groups did not show a significant difference between the FMT and NFMT ($p > 0.05$). This result can be explained by the very low number of subjects enlisted in the study and by the wide biological variability of RF, which is a naturally occurring vitamin providing endogenous urinary excretion. The influence of floating abilities on the amount of RF excreted in the urine as function of time is shown on Figure 5. These figures indicate that the urinary excretion of RF in the period under fed and fasted conditions following administration of the FMT was generally higher than following administration of the NFMT. This phenomenon appears to be more pronounced under the fed condition. Moreover, the amount of RF in the urine increases particularly following ingestion of food (the period between 4 and 8 h post-dose). This increase in the amount of RF excreted in the urine after feeding is characteristic of the behavior of a floating form [24-26]. On the other hand, as shown in Figure 6, the maximal urinary excretion rate (UER) value for the FMT was higher than for the NFMT, whether the ingestion protocol was fasted or fed. Furthermore, in both groups, the time needed to reach the maximal

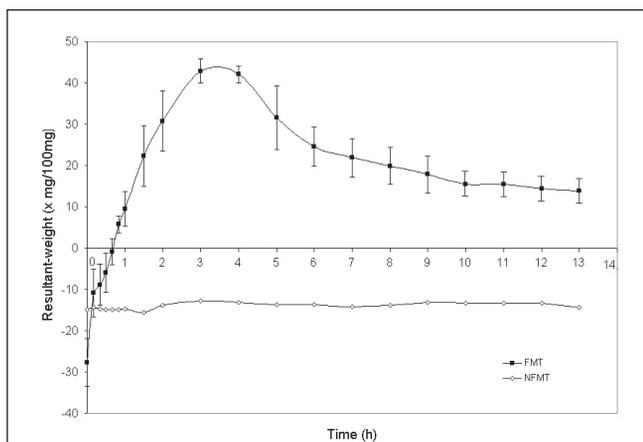


Figure 1 - Resultant-weight (x mg/100 mg) of floating (n = 3) and non-floating minitables (n = 1).

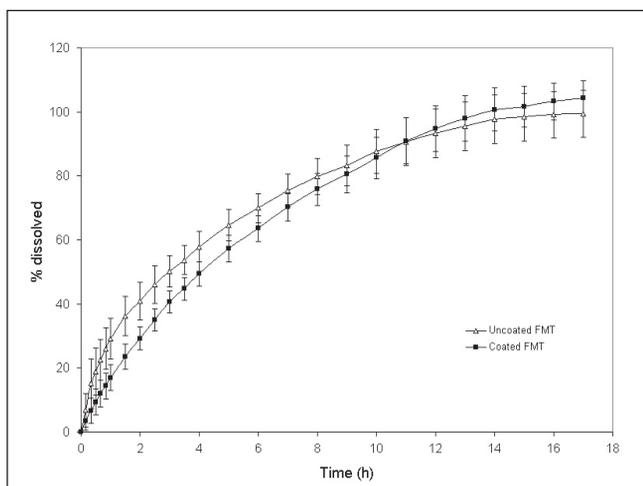


Figure 2 - Effect of a hydrophilic coating on the release burst of FMT at pH 3.0 (n = 5).

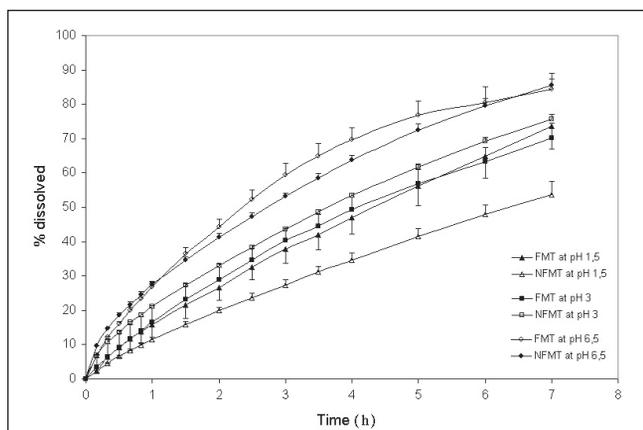


Figure 3 - Mean *in vitro* release \pm SD (%) of RF5'PNA oral dosage forms (n = 5).

UER value (T_{max}) was delayed with the FMT in comparison with that of the NFMT. Indeed, under the fasted condition, T_{max} was delayed for 2 h, while it was delayed for 3 h by feeding. Compared to the curve corresponding to the NFMT, that obtained with the FMT was more evenly distributed, especially in the fed condition. This suggests that the FMT might be able to float on the stomach juice sufficiently in the fed condition to increase the GRT and delay drug arrival at the absorption site. In accordance with literature, gastroretentive dosage forms - e.g. floating minitables - appear to promote RF absorption.

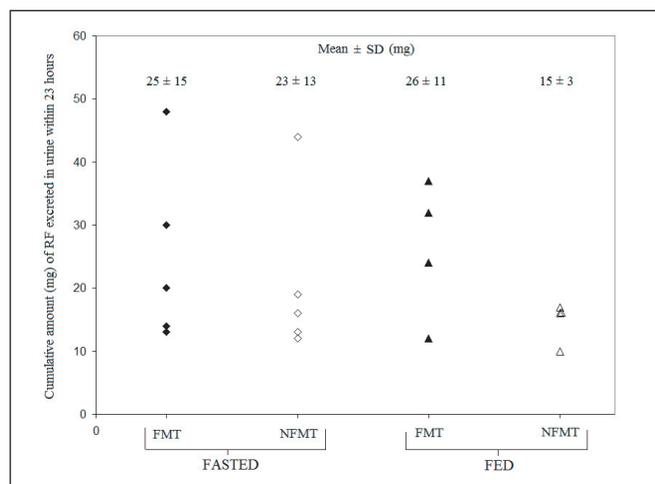


Figure 4 - Cumulative amount (mg) of RF excreted in the urine within 23 h, following administration of FMT and NFMT in fasted and fed conditions.

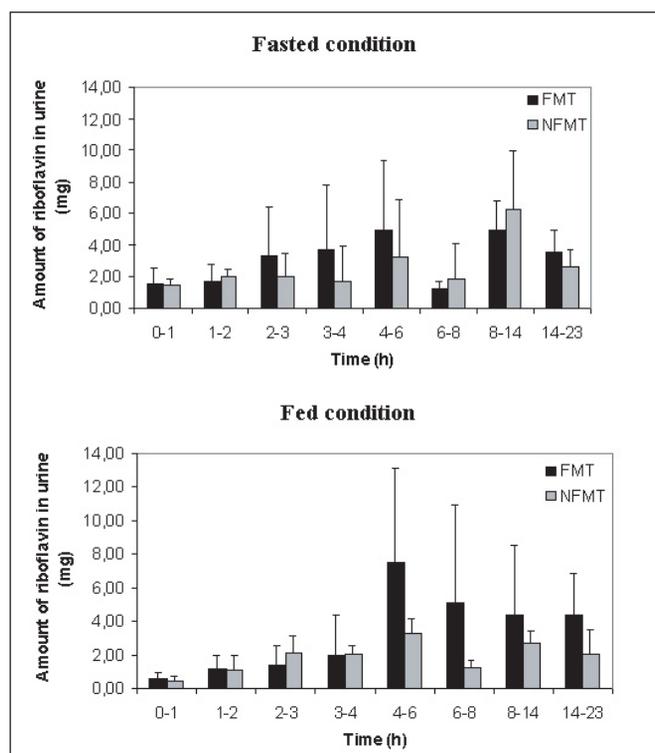


Figure 5 - Mean amount ± SD of RF excreted in the urine (mg), following administration of FMT and NFMT in fasted (n = 5) and fed (n = 4) conditions.

*

Minitablets were developed as a new floating sustained-release multiple-unit system, based on the use of very simple compositions and produced by melt granulation and subsequent compression. Melt granulation is a low cost very short solvent-free process which can be easily scaled up. In comparison with single-unit systems, multiple-unit systems avoid the all-or-nothing emptying process and reduce inter-subject variability because of their more reproducible GRT and better dispersal through the gastrointestinal tract. This study has shown that the mean amount of RF excreted in the urine seemed to increase following administration of the FMT compared to following administration of the NFMT, especially after feeding. This suggests that the FMT are able to float *in vivo*, increasing the gastric residence

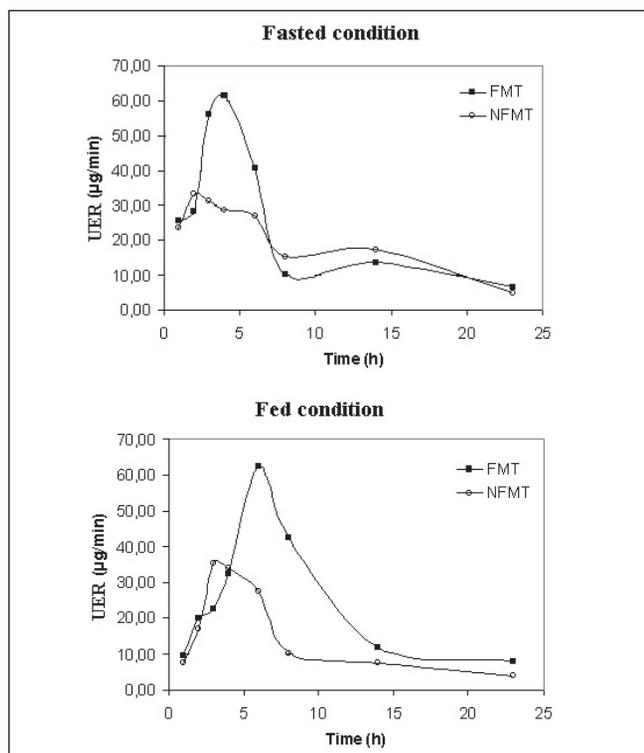


Figure 6 - Mean RF urinary excretion rate (µg/min) following administration of FMT and NFMT in fasted (n = 5) and fed (n = 4) conditions.

time of a determined drug. Although no significant statistical difference has been found on the mean cumulative RF excretion between the FMT and the NFMT, the results are nevertheless encouraging. However, the floating capabilities of the FMT should be corroborated by a pharmacoscintigraphic evaluation and a clinical study on a larger number of subjects including the determination and quantification of a drug possessing a NAW at the upper part of the small intestine such as levodopa or ciprofloxacin in order to reduce the inherent variability due to the small number of subjects and the use of an endogenous substance as model drug.

REFERENCES

- SOPPIMATH K., KULKARNI A.R., RUDZINSKI W.E., AMINABHAVI T.M. - Microspheres as floating drug-delivery systems to increase gastric retention of drugs. - *Drug Metabolism Review*, **33**, 149-160, 2001.
- OTH M., FRANZ M., TIMMERMANS J., MOËS A.J. - The bilayer floating capsule: a stomach-direct drug delivery system for misoprostol. - *Pharm. Res.*, **9**, 298-302, 1992.
- PATEL V.R., AMIJI M.M. - Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethyleneoxide) hydrogels for site specific antibiotic delivery in the stomach. - *Pharm. Res.*, **13**, 588-593, 1996.
- WHITEHEAD L., COLLET J.H., FELL J.T. - Amoxicillin release from a floating dosage form based on alginates. - *Int. J. Pharm.*, **210**, 45-49, 2000.
- HOFFMAN A., STEPENSKY D., LAVY E., EYAL S., KLAUSNER E., FRIEDMAN M. - Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms. - *Int. J. Pharm.*, **277**, 141-153, 2004.
- ROUGE N., BURI P., DOELKER E. - Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. - *Int. J. Pharm.*, **136**, 117-139, 1996.
- SETH P.R., TOSSOUNIAN J. - Sustained release tablet formulations. - *US Patent* 4, 140, 755, 1979.
- SETH P.R., TOSSOUNIAN J. - The hydrodynamically balanced

- system HBSTM: a novel drug delivery system for oral use. - Drug Dev. Ind. Pharm., **10**, 313-339, 1984.
9. MOËS A.J. - Recherche et développement de formes orales à libération prolongée. - J. Pharm. Belg., **44**, 60-70, 1989.
 10. SINGH B., KIM K.H. - Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention. - J. Controlled Release, **63**, 235-259, 2000.
 11. SATO Y., KAWASHIMA Y., TAKEUCHI H., YAMAMOTO H. - *In vitro* and *in vivo* evaluation of riboflavin-containing microballoons for a floating controlled drug delivery system in healthy humans. - Int. J. Pharm., **275**, 97-107, 2004.
 12. JUSKO W.J., LEVY G. - Absorption metabolism and excretion of riboflavin-5'-phosphate in man. - J. Pharm. Sci., **56**, 58-62, 1967.
 13. LEVY G., HEWIT R.R. - Evidence in man for different specialized intestinal transport mechanisms for riboflavin and thiamine. - Am. Clin. Nutr., **24**, 401-404, 1971.
 14. INGANI H.M., TIMMERMANS J., MOËS A.J. - Conception and *in vivo* investigation of peroral sustained release floating dosage forms with enhanced gastrointestinal transit. - Int. J. Pharm., **35**, 157-164, 1987.
 15. KLAUSNER E.A., LAVY E., FRIEDMAN M., HOFFMAN A. - Expandable gastroretentive dosage forms. - J. Controlled Release, **90**, 143-162, 2003.
 16. SATO Y., KAWASHIMA Y., TAKEUCHI H., YAMAMOTO H. - *In vivo* evaluation of riboflavin-containing microballoons for floating controlled drug delivery system in healthy human volunteers. - J. Controlled. Release, **93**, 39-47, 2003.
 17. AHMAD I., FASIHULLAH Q., NOORA., ANSARI I.A., ALI Q.N.M. - Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. - Int. J. Pharm., **280**, 199-208, 2004.
 18. AHMAD I., FASIHULLAH Q., VAID F.H.M. - A study of simultaneous photolysis and photoaddition reactions of riboflavin in aqueous solution. - J. Photochemical and Photobiology B: Biology, **75**, 13-20, 2004.
 19. HAMDANI J., MOËS A.J., AMIGHI K. - Development and evaluation of prolonged release pellets obtained by melt pelletization process. - Int. J. Pharm., **245**, 167-177, 2002.
 20. TIMMERMANS J., MOËS A.J. - Measuring the resultant-weight of an immersed test material: I. Validation of an apparatus and a method dedicated to pharmaceutical applications. - Acta Pharm. Technol., **36**, 171-175, 1990.
 21. SHAH V.P., TSONG Y., SATHE P., LIU J.-P. - *In vitro* dissolution profile comparison - Statistics and analysis of similar factor, f2. - Pharmaceutical Research, **15**, 889-896, 1998.
 22. BURCH H.B., BESSEY O.A., LOWRY O.H. - Fluorimetric measurements of riboflavin and its natural derivatives in small quantities of blood, serums and cells. - J. Biol. Chem., **175**, 457-470, 1948.
 23. Merck Index, Twelfth Edition, Merck & Co., Inc., USA, 1996.
 24. DAVIS S.S., HARDY J.G., TAYLOR M.J., WHALLEZ D.R., WILSON C.C. - The effect of food on the gastrointestinal transit of pellets and an osmotic device (Osmet). - Int. J. Pharm., **21**, 331-340, 1984.
 25. DAVIS S.S., KHOSLA R., WILSON C.G., WASHINGTON N. - Gastrointestinal transit of a controlled-release pellet formulation of tiaprofenic acid and the effect of food. - Int. J. Pharm., **35**, 253-258, 1987.
 26. MOËS A.J. - Gastroretentive dosage forms. - Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems, **10**, 143-195, 1993.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the volunteers who took part in the *in vivo* study and the Laboratory of Pharmaceutical Chemistry of Prof. J. Neve (ULB) for providing the fluorescence spectrophotometer.

MANUSCRIPT

Received 22 February 2006, accepted for publication 13 June 2006.

ARTICLE

3

*European Journal of Pharmaceutics and
Biopharmaceutics 68 (2008) 310-318*

Research paper

New levodopa sustained-release floating minitables coated with insoluble acrylic polymer

J. Goole^a, Ph. Deleuze^a, F. Vanderbist^b, K. Amighi^{a,*}

^a *Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium*

^b *Laboratoires SMB S.A., Brussels, Belgium*

Received 16 May 2007; accepted in revised form 29 June 2007

Available online 6 July 2007

Abstract

The aim of this study was to develop a new coated multiple-unit sustained-release floating system that is able to float over an extended period of time. Levodopa was used as a model drug. The system consisted of a 3 mm drug-containing gas-generating core, prepared by melt granulation and subsequent compression, and coated with a flexible polymeric membrane. Eudragit[®] RL30D and ATEC were used as a film former and a plasticizer, respectively. The coating level was fixed at 20% (w/w). The floating lag time decreased as the proportion of effervescent agents increased. The optimized coated floating minitables could float within 20 min and remained buoyant for more than 13 h. In addition, a sustained release of levodopa for more than 20 h was observed.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Multiple-unit system; Minitables; Floating; Sustained release; Coating; Eudragit[®] RL30D; Levodopa

1. Introduction

Gastric retention has received significant interest in the past few decades as most of the conventional oral delivery systems have shown some limitations connected with gastric emptying time. In fact, variable and too rapid gastrointestinal transit can result in incomplete drug release above the absorption zone. This leads to diminished efficacy of the administered dose, especially for drugs that are absorbed to the greatest extent in the upper part of the small intestine [1].

Because of this, Levodopa (L-dopa) was chosen as a model drug for the development of a floating sustained release (SR) delivery system with prolonged gastric residence time (GRT). Moreover, as L-dopa is characterized by a relatively short elimination plasma half-time

($t_{1/2} = 1$ h) [2], a slow-release formulation could reduce fluctuations in the therapeutic effect and so improve its clinical efficacy [3].

Among the various attempts made to increase the retention of an oral dosage form [1,4–7], it seems that floating systems offer the most effective and rational protection against early and random times of gastric emptying. In comparison to the single-unit systems, which are characterized by an all-or-nothing process, the multiple-unit dosage forms have been shown to reduce inter- and intra-subject variability [8]. Moreover, they have also shown a more reproducible GRT and have offered a better dispersion throughout the gastrointestinal tract, lowering the possibility of mucosal damage [9].

In a previous work [10], floating minitables (FMT) containing gas-generating agents were developed. The generated gas was trapped in a swellable hydrocolloid that was also able to control drug release. However, only 46% (w/w) drug could be incorporated into the minitables due to the high amount of gel-forming polymer required to obtain good floating properties. The same problem was observed with floating pellets developed by Hamdani et al. [11] and

* Corresponding author. Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 207, Boulevard du Triomphe, 1050 Brussels, Belgium. Tel.: +32 2 650 5252; fax: +32 2 650 5269.

E-mail address: kamighi@ulb.ac.be (K. Amighi).

the floating pills developed by Ichikawa et al. [12] in which only 40% (w/w) and 23% (w/w) of active drug could be incorporated, respectively. In order to increase the incorporated amount of the active drug, a coating can be used instead of a gel-forming polymer both to trap the generated carbon dioxide and to sustain the release of the drug.

The present study relates to the development of L-dopa SR granulates prepared by melt granulation and compressed into minitables (MT). These MT, comprising only L-dopa, Precirol® ATO and effervescent compounds, were then coated with a water-insoluble acrylic polymer, Eudragit® RL30D in order to obtain FMT. Both the melt granulation and the fluidized-bed coating processes are very easy, short manufacturing processes that can be easily scaled up. Other coated multiple-unit floating sustained release systems are already described in the literature [12,13]. Both developments are based on pellets coated with double layers: an inner effervescent layer and an outer gas-trapping polymeric membrane. The manufacture of the core seemed to take longer than our granulation and compression processes as the pellets are made by an extrusion-spheronization process that needs at least three steps: a mixing step, an extrusion-spheronization process with addition of water and, thus, a drying step. Moreover, in comparison to the other sophisticated multiple-unit floating systems described before in the literature [1,7,14], our coated FMT (CFMT) are based on a very simple composition, can contain a high amount of active drug and show applicability for industrialization.

The objective of this work was to investigate the effects of manufacturing parameters – such as the core diameter, the core composition and the level and formulation of the coating – on the CFMT floating capability and the L-dopa release rate in order to design the most suitable form for a future in vivo study. The aim was to optimize and select a dosage form that would be able to provide a low floating lag time value, a long floating duration and a constant sustained release of L-dopa.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Levodopa (Newsmart, China) was used as a model drug. Glyceryl palmitostearate (Precirol® ATO 5 = Gelucire® 52/02), supplied by Gattefosse (France), was used as a meltable binder. Tartaric acid (Federa, Belgium), sodium bicarbonate (Merck, Germany) and calcium carbonate (Welfer, Belgium) were employed as carbon dioxide-generating agents. Lactose 450 mesh (DMV Int., Netherlands) was used as hydrophilic diluent.

The insoluble polymer used to make the gas-trapping membrane was Eudragit® RL30D (in the form of an aqueous colloidal dispersion of poly(ethylacrylate-methylmethacrylate-trimethylammoniummethyl-methacrylate chloride), Rhöm Pharma, Darmstadt, Germany). Citroflex 2® (triethyl citrate) and Citroflex A2® (acetyl triethylcitrate),

used as plasticizers, were supplied by Reilly, Belgium. Talc with a mean particle size of approximately 10 µm (Aldrich Chemical Co. Ltd., England) and antifoam emulsion (silicone emulsion, Vel. S.A. Belgium) were used as received.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of the minitables

2.2.1.1. Granulate manufacture. Granulates were made in a small vertical laboratory-scale high-shear mixer, Mi-Pro® (Pro-C-EpT, Belgium), equipped with a transparent bowl and a heating jacket [15]. The granulate compositions are listed in Table 1.

All experiments were started at an impeller speed (IS) of 1800 rpm and a chopper speed (CS) of 130 rpm while the temperature of the heating jacket was set at 60 °C. When the product temperature reached sufficiently high values to soften the binder, the torque increased due to granule formation [10]. The IS was reduced to 600 rpm after the granule formation step in order to avoid any further product temperature increase, while the CS was increased to 1000 rpm to break any possible agglomerates. The massing time was kept constant at 5 min. The length of the whole granulate manufacturing process was around 20 min. At the end of the process, the granules were cooled at ambient temperature.

The volume size distribution of the granulates was measured with a Mastersizer 2000 Laser Diffractometer in dry powder form (Scirocco 2000, Malvern Instrument, UK) with a suitable Standard Operating Procedure (SOP) (refractive index 1.52, dispersive air pressure 1 bar, vibration rate 50%, measurement time 30 s). The mean particle size, represented by the equivalent volume diameter D [4,3], of granulates should be around 150 µm to provide good flow properties.

2.2.1.2. Minitables preparation. MT were prepared by direct compression. Granules were fed manually into the die of an instrumented single-punch tableting machine (Korch, Germany) to produce MT using concave-faced punches and dies. The compression forces, the weight and the

Table 1

Compositions of the investigated granulates (all quantities are given as percentages w/w) and corresponding MT properties

Composition No.	C1	C2	C3	C4	C5
Levodopa	37.5	37.5	37.5	25.0	68.0
Precirol® ATO5	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
CaCO ₃	10.0	5.0	1.7	10.0	10.0
NaHCO ₃	4.0	4.0	1.4	4.0	4.0
Tartaric acid	3.0	3.0	1.0	3.0	3.0
Lactose 450 mesh	33.5	38.5	46.4	46.0	3.0
Diameter (mm)	3			4	
Weight (mg)	20			40	
Compression forces (N)	50–100			2000–3000	
Hardness (N) ($n = 10$)	5 ± 1			22 ± 3	

hardness for each diameter of the MT are summarized in Table 1. The hardness was measured with a hardness tester (Computest, Kreamer GmbH, EL Elektronik, Darmstadt, Germany). The friability of the MT was $0.11 \pm 0.02\%$. This indicated that they were able to withstand the mechanical stress of the subsequent coating process.

2.2.1.3. Preparation of the coating dispersion. The different aqueous dispersions used for the coating of the MT are given in Table 2. Talc was previously dispersed in water in the presence of an antifoam agent and mixed with the water-soluble additive using a T45 Ultra-Turrax® (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Germany). Dispersions containing Eudragit® RL30D require the addition of 20% (w/w) (relative to film former content) of plasticizing agent. The plasticizer was added to the polymer aqueous dispersions under gentle stirring. All the components of the coating dispersion were then mixed under magnetic stirring for at least 1 h before starting the coating process.

2.2.1.4. Preparation of the coated MT. MT were transferred into a fluidized-bed coating apparatus (Uni-Glatt®, Glatt GmbH, Germany) equipped with a bottom-spray coating process in a Würster column and coated with the coating dispersions until the desired film weight was deposited. During the coating operation, the aqueous dispersion was stirred continuously to prevent sedimentation of insoluble particles. The conditions for layering were shown to be as follows: preheating temperature, 40 ± 2 °C; preheating time, 10 min; inlet and outlet temperatures, 40 ± 2 and 35 ± 2 °C, respectively; flow rate, 6 g/min; pneumatic air pressure, 1 bar. After coating, the coated MT were further fluidized for 10 min and subsequently cured at 60 °C for 8 h [16,17].

2.2.2. Determination of the physicochemical properties of FMT

2.2.2.1. In vitro evaluation of floating capabilities. The CFMT ($n = 3$) were placed in 70 ml of 0.1 N HCl solution containing 0.05% (w/v) Polysorbate 20 (pH 1.2, 37 °C), and were then subject to horizontal shaking at 100 cycles/min (GFL 1086, Germany). The floating lag time and floating duration were determined by visual observation.

To determine the buoyancy capabilities of the CFMT, an apparatus designed for dynamic measurement of the

total force acting vertically on an immersed object was also used. This was the resultant-weight (RW) apparatus proposed by Timmermans [18] for studying floating magnitude evolution as a function of time. By convention, a positive RW signifies that the object is able to float, whereas a negative RW means that the object will sink. CFMT were placed in a specially designed basket sample holder that was immersed in 1200 ml of preheated 0.1 N HCl solution containing 0.05% (w/v) Polysorbate 20 (pH 1.2, 37 °C). The RW was measured every minute for 13 h ($n = 1$).

2.2.2.2. Dissolution studies. A Distek 2100C USP 29 dissolution apparatus (Distek Inc., North Brunswick, NJ, USA), Type II (paddle method) was used for the dissolution tests. Dissolution tests were performed in a dark room to avoid possible drug alteration. The rotational speed employed was 50 rpm. Release testing was carried out in 900 ml of phosphate buffer solutions (0.05 M) containing 0.05% (w/v) Polysorbate 20 at pH 3.0. The temperature of the dissolution media was maintained at 37.0 ± 0.2 °C. Dissolutions were carried out on an equivalent of 150 mg of levodopa and the amount of drug released was detected spectrophotometrically at 280 nm (Agilent 8453 UV/visible Dissolution Testing System, Agilent, USA). The percentages of drug release were measured at preselected time intervals and averaged ($n = 5$).

2.2.3. Statistical evaluation

As recommended in the FDA's Guidances for Industry, the similarity factor f_2 was used to determine the similarity of dissolution profiles [19,20]. The compared dissolution profiles were obtained under the same test conditions and their dissolution time points were the same, e.g. for the controlled release products, they were 1, 3, 5 and 8 h. As indicated by Shah et al. [20], the similarity factor f_2 value has to be higher than 50 in order to assess the similarity between two dissolution profiles.

3. Results and discussion

3.1. Design of the coated floating minitables

In order to develop the desired sustained-release CFMT, it was necessary to optimize both the floating properties and the release rate of the drug from the system. In a previous study [10], Methocel® K15M was used both to trap the carbon dioxide generated from the effervescent components and to provide a sustained release of the drug. In the present study, the generated gas was retained by a flexible polymeric membrane that was also able to sustain the release of the drug. An ideal coating material for a floating system should be highly water-permeable in order to initiate rapidly the effervescent reaction and the subsequent floating process [13]. However, the hydrated coating should also, to some extent, be impermeable to the generated carbon dioxide

Table 2
Formulations used for the coating of levodopa CFMT

Formulation	F1	F2
Eudragit® RL30D (g) (dry basis)	200	200
TEC (g)	40	–
A TEC (g)	–	40
Talc (g)	50	50
Antifoam (g)	2	2
Water (g)	842	842
Solid content (% w/w)	25.6	25.6
Coating level (%)	12–15–20	20

so as to promote and maintain floatation [21]. Moreover, the polymer should be sufficiently impermeable to the active drug to obtain a sustained release. Eudragit® RL30D was selected over other polymers – Eudragit® RS30D, NE30D – (data not shown) as the film former polymer in the gas-entrapped flexible polymeric membrane because of its higher water permeability. To trap the generated gas, the hydrated coating must not adhere to the core; therefore, hydroxypropylmethylcellulose was not incorporated in the formulations as a binder (Table 2). To develop the optimized CFMT, several studies had to be conducted in order to identify and establish the formulation variables that provided the desired system properties. The influence of the core composition, the core diameter, the coating level and coating composition on the floating ability of the CFMT and drug release of levodopa was thus evaluated.

3.2. Influence of the core composition on drug release and floating behaviour

The amount of levodopa and lipidic binder was kept constant at 37.5% (w/w) and 12.0% (w/w), respectively (Table 1). Only the level of the effervescent components incorporated into the core was modified to evaluate its influence on the release rate and the floating properties. The influence of the core composition on the dissolution profile was evaluated for the 4 mm CFMT coated with the coating dispersion F1 (Table 2). The coating level was fixed at 12% (w/w). The CFMT in which the core was composed of C1 (Table 1) provided a sustained release of levodopa immediately after immersion (Fig. 1a). It has to be noted that no lag time was observed on the dissolution profile. This was probably due to the large surface area provided by the MT and the high water permeability of the film former polymer Eudragit® RL30D. In the time interval of 9 h, a constant sustained release occurred and only 30% of the incorporated drug was released. After then, the release rate of the drug showed an increase that could be attributed to the presence of small cracks on the surface of the film (bubbles of gas diffusing through the coating were visually observed – data not shown). Indeed, it is thought that the coating level is not high enough to withstand the pressure of the generated carbon dioxide and avoid cracking after a period of 9 h. However, based on the low values of the standard deviations observed throughout the period of the test, it has to be noted that the appearance of the cracks was sufficiently reproducible to provide a bimodal dissolution profile. The level of the effervescent components incorporated into the core was then decreased to 12.0% (w/w) and 4.1% (w/w) in C2 and C3, respectively, in order to reduce the pressure applied on the membrane by the generated carbon dioxide. Even though a sustained release of the active drug occurred immediately after immersion, the decrease of the level of carbon dioxide-generating agents did not eliminate the cracking of the coating that still occurred

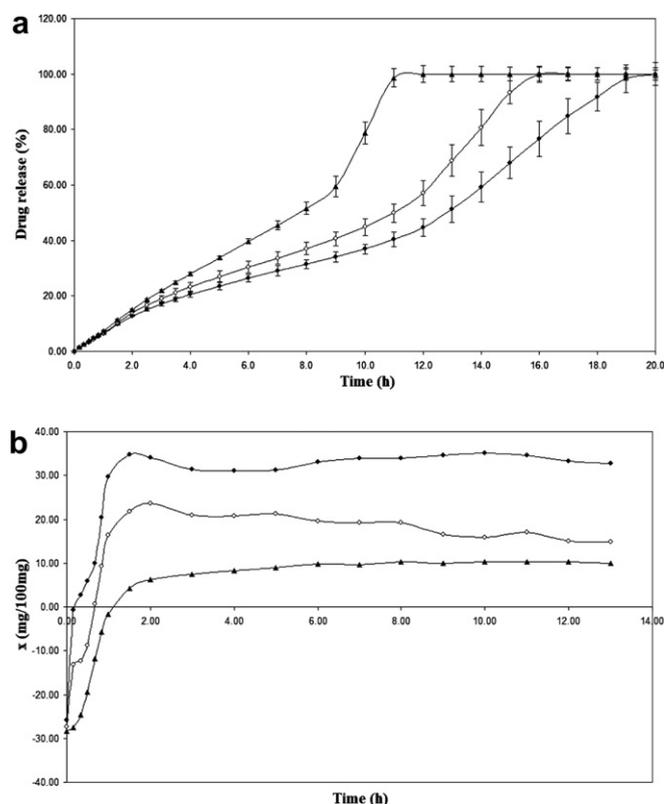


Fig. 1. Influence of the core composition – (●) C1, (○) C2, (▲) C3 – on (a) the drug release at pH 3.0, 50 rpm ($n = 5$) and (b) the floating properties using the RW method ($n = 1$) for 4 mm CFMT coated with F1 (12% w/w).

after a period of 9 h regardless of the composition of the core. However, even if the dissolution profiles remained statistically similar during the first 9 h period (e.g. the lowest f_2 value was 59.0), the drug release tended to be slower with increasing amounts of effervescent agents. A faster and higher carbon dioxide generation caused by the increase of the level of effervescent agents incorporated into the core resulted in a higher distortion of the membrane and subsequent prolongation of the drug release as the distance between the core and the coating was thus increased.

Besides the effect of the level of effervescent agents on drug release, its influence on floating properties was also evaluated using the RW method (Fig. 1b). The lag time values increased as the level of effervescent agents decreased and were 20, 40 and 90 min for C1, C2 and C3, respectively. A higher amount of effervescent agents caused a faster and higher carbon dioxide generation [21]. The maximal RW values also decreased with decreasing levels of gas-generating agents and were about 30, 20 and 10 mg/100 mg for C1, C2 and C3, respectively. However, regardless of the core composition, all the CFMT floated for more than 13 h. The lag time values and the total floating durations were corroborated by the horizontal shaking method, which also showed that the CFMT remained buoyant for 24 h.

As C1 showed the better floating properties in terms of lag time and maximal RW value, it was selected to evaluate the influence of the core diameter on the drug release and floating properties of the CFMT.

3.3. Influence of the core diameter

The 4 mm CFMT provided a very slow release of the active drug. A simple and practicable way to modify the drug release kinetic from solid dosage forms was to change their diameters. In fact, the release rate of the drug increased as the core diameter decreased. Dissolution tests, performed with C1-CFMT (Table 1) coated with F1 (12% w/w) (Table 2), showed a faster dissolution rate for the 3 mm CFMT than for the 4 mm CFMT (Fig. 2a). The 3 mm CFMT showed, during the first 4 h of the test, a constant sustained release, with 27% of the active drug being released versus release of 20% for the 4 mm. This observation can be attributed to the higher relative surface area of

the dosage form when the CFMT diameter decreased, which gave a greater area of contact between the CFMT and the dissolution media. However, as in the case of the 4 mm CFMT after 9 h, the release rate of the drug sharply increased after a period of 4 h, probably due to partial rupturing of the coating. The entire dose of levodopa was released after 11 h. It was noted that, even after the rupturing of the coating, a sustained release could be observed, certainly due to the presence of the lipidic binder and to the granulated form.

The RW measurements showed that the lag time values increased with increased diameter and were 7 and 20 min for the 3 and 4 mm CFMT, respectively (Fig. 2b). After a period of 5 h, the 3 and 4 mm CFMT had the same RW value, which was about 30 mg/100 mg. After that, the RW values of the 3 mm CFMT decreased, while those corresponding to the 4 mm did not. This could be explained by the greater surface area provided by the smaller diameter, which facilitated the dissolution of the membrane.

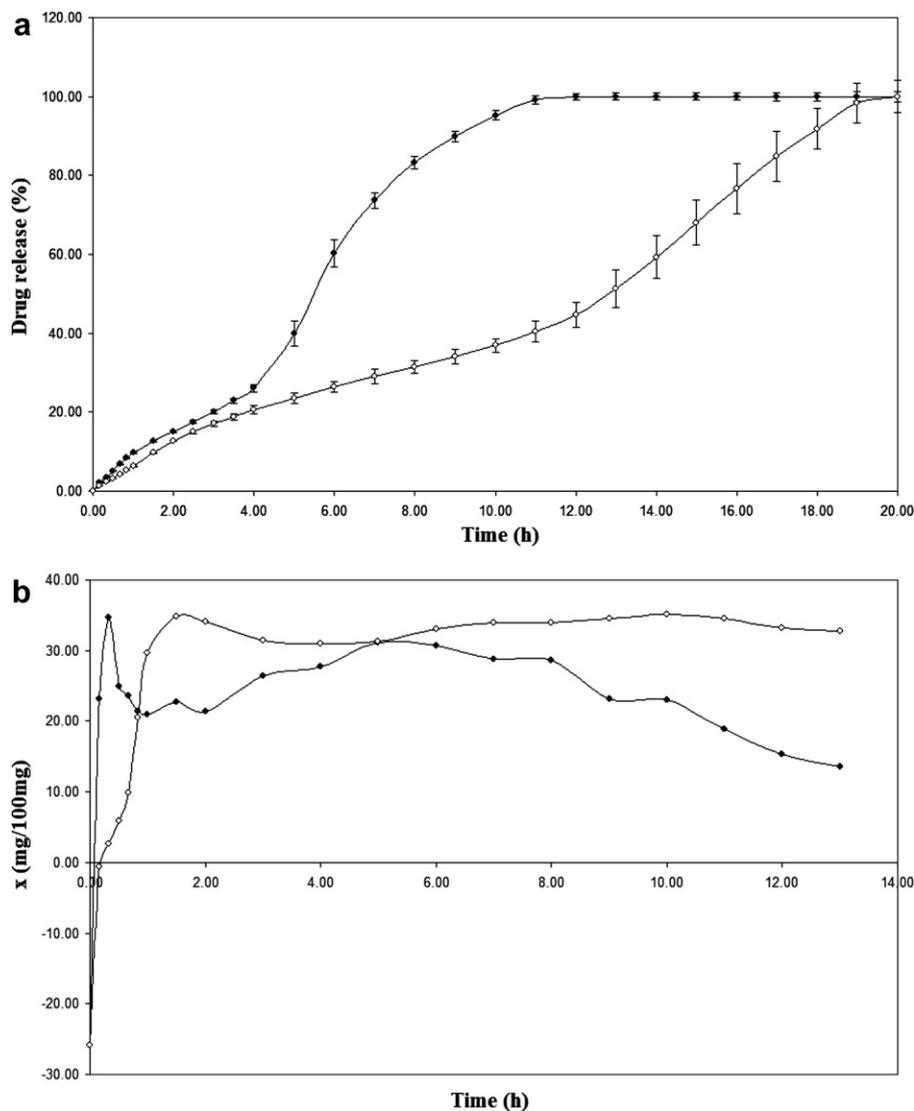


Fig. 2. Influence of the diameter – (●) 3 mm, (○) 4 mm – on (a) the drug release at pH 3.0, 50 rpm ($n = 5$) and (b) the floating properties using the RW method ($n = 1$) for CFMT using C1 coated with F1 (12% w/w).

As the 3 mm CFMT showed the highest RW values in the first hours of the RW test and as they seemed able to provide a faster release of the active drug, this diameter was selected to evaluate the influence of the coating level on the drug release and the floating properties.

3.4. Influence of the coating level

As shown, a coating level of 12% (w/w) was not able to provide a constant sustained release of the drug throughout the whole length of the dissolution tests, regardless of the composition and the diameter of the core. A constant sustained release was sought that would last for a period of time that would be at least similar to the floating duration. The influence of the coating level was evaluated for the 3 mm C1-CFMT (Table 1) coated with F1 (Table 2).

The drug release decreased with increasing coating levels, which ranged from 0% (w/w) to 20% (w/w) (Fig. 3a). A higher membrane thickness slowed water penetration,

resulting in a decrease in drug release [21]. In the absence of a coating, the integrity of the MT was not maintained. The entire dose of levodopa was released after 2 h. The slight sustained-release properties observed for the composition without coating were due to the presence of the lipi-dic binder incorporated into the granules. Even with a coating level of 15% (w/w), the release rate of the drug sharply increased after 4 h, resulting in 100% of drug being dissolved after 11 h. A constant release only occurred during the whole length of the test with a coating level of 20% (w/w). No release lag time was observed and 75% of the entire dose of levodopa was dissolved after 20 h.

An increase in the coating level slightly affected the floating properties of the CFMT (Fig. 3b). Indeed, the lag time values were 5, 7 and 10 min with coating levels of 12% (w/w), 15% (w/w) and 20% (w/w), respectively. Moreover, while the RW values slowly decreased after 5 h with coating levels of 11% (w/w) and 15% (w/w), the RW values corresponding to a coating level of 20% (w/w)

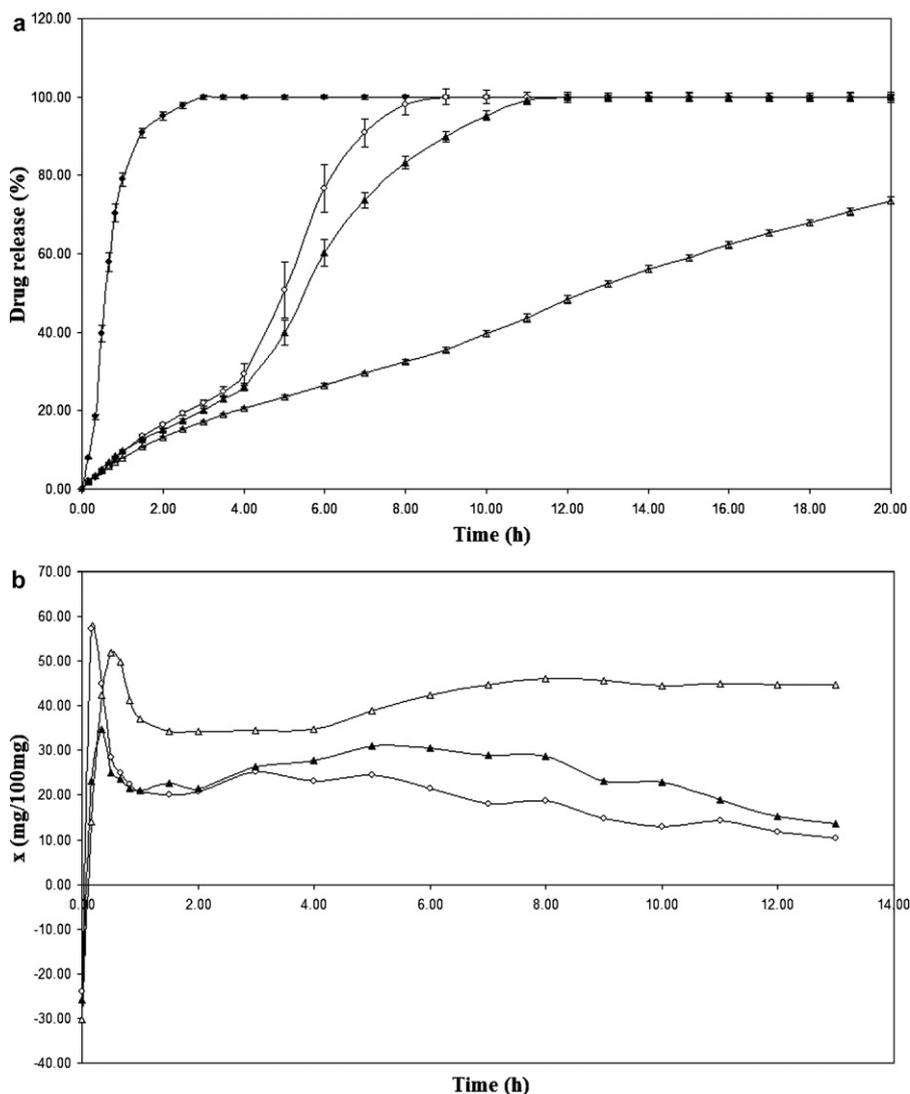


Fig. 3. Influence of the coating level – (●) 0% (w/w), (○) 12% (w/w), (▲) 15% (w/w), (△) 20% (w/w) – on (a) the drug release at pH 3.0, 50 rpm ($n = 5$) and (b) the floating properties using the RW method ($n = 1$) of 3 mm CFMT using C1 coated with F1.

did not (40–50 mg/100 mg). The coating level was high enough to preserve the same floating magnitude for 13 h. The horizontal shaking method showed that the total floating duration was at least 24 h.

The 3 mm C1-CFMT coated with F1 provided a 20-h constant sustained release of levodopa and good floating properties when the coating level reached 20% (w/w). However, it could be useful to accelerate the drug release to dissolve the entire dose of the active drug within the floating duration of the CFMT.

3.5. Influence of the plasticizer

Plasticizers are often added to improve the mechanical properties of the polymeric films, such as the flexibility or distensibility of the polymeric material. The permanence of the plasticizer in the coating under wet conditions depends primarily on its solubility in water and its affinity for the polymer [22]. It has been shown that the higher

proportion of quaternary ammonium groups in Eudragit[®] RL films leads to a fast hydration and leaching of the plasticizer used in the film composition [22]. It could thus be useful to incorporate a less soluble plasticizer than TEC in the CFMT under investigation. ATEC was therefore tested since it presents a water solubility of 0.7 g/100 ml at room temperature compared to TEC, which presents a higher water solubility of 7 g/100 ml [23]. The effect of the plasticizer was evaluated on the 3 mm C1-CFMT (Table 1) coated either with F1 or F2 using a coating level of 20% (w/w) (Table 2). The release rate was increased by incorporating ATEC (Fig. 4a). Indeed, 95% of the entire dose of levodopa was released within 20 h instead of the 75% achieved using TEC. As the less soluble plasticizer remained inside the coating for a longer period of time, the flexibility of the film became greater. The distortion of the membrane thus increased as the generated gas remained inside the dosage form for a longer period of time. This phenomenon seemed to increase the

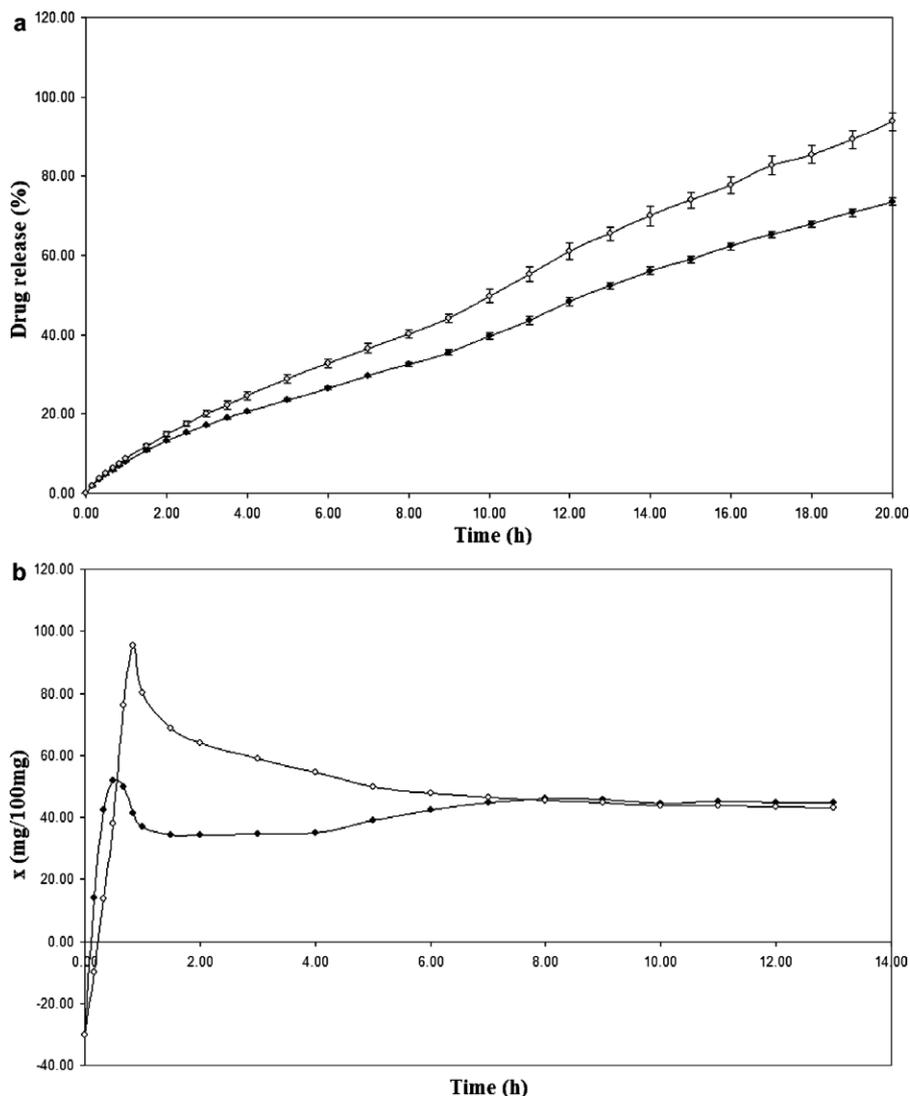


Fig. 4. Influence of the plasticizer – (●) TEC, (○) ATEC – on (a) the drug release at pH 3.0, 50 rpm ($n = 5$) and (b) the floating properties using the RW method ($n = 1$) of 3 mm CFMT using C1 coated with F1 and F2 (20% w/w).

release rate of the drug while the integrity of the dosage form was still preserved. It should be noted that our minitables sustained the release of the active drug for a longer period of time than several other multiple-unit floating dosage forms. Indeed, the floating minitables containing a gel-forming polymer sustained the release of the drug for only 9 h due to the erosion process [10]. Using the same percentage of lipidic binder, floating pellets released the entire dose of the active drug within a period of less than 4 h, probably due to the greater surface area [11]. The bi-layered coated pills sustained the release of the drug for no more than 12 h, probably due to the lower coating level, which was 5% (w/w) instead of 20% (w/w) in this case [13].

The RW measurement showed that the lag time increased from 10 to 20 min when ATEC was used as the plasticizer instead of TEC (Fig. 4b). The polymeric membrane became less water-permeable when ATEC was incorporated, resulting in a higher lag time value due to a delay in the generation of carbon dioxide. However, the RW values increased from 40 min to 7 h when ATEC was incorporated instead of TEC. The higher flexibility of the membrane seemed to improve floating strength. After 30 min, the RW values were never lower than 40 mg/100 mg, which were much higher values than those obtained with floating pellets [11].

3.6. Influence of the amount of the active drug incorporated into the core

As has been explained, a coating step was used both to trap the generated carbon dioxide and to sustain the release of levodopa (replacing the use of a swelling agent) to allow incorporation of more active drug into the dosage form. The amount of lipidic binder and effervescent agents was

kept constant at 12% (w/w) and 17% (w/w), respectively (Table 1). Only the level of levodopa incorporated into the core was modified to evaluate its influence on the release rate and the floating properties: this was 25.0% (w/w), 37.5% (w/w) and 68.0% (w/w) in C1, C4 and C5, respectively. The influence of the amount of levodopa incorporated into the core on the dissolution profile was evaluated for the 3 mm CFMT coated with the coating dispersion F2 (Table 2). The coating level was kept constant at 20% (w/w). Regardless of the amount of levodopa incorporated into the core, a sustained release occurred immediately after immersion without any lag time and the integrity of the coating was preserved, as no change in the release rate was observed during the whole period of the test (Fig. 5). However, the dissolution profile was more sustained when the incorporated amount of levodopa increased from 25.0% (w/w) to 68.0% (w/w). This was probably due to the decrease in the number of minitables immersed in the dissolution baths as a consequence of the increase in the incorporated amount of levodopa. Indeed, by increasing the level of levodopa incorporated into the core, a lower number of CFMT was needed to give 150 mg of drug. A decrease in the number of minitables involved a lower area of contact between the CFMT and the dissolution media, decreasing the release rate of the drug as a consequence.

On the other hand, the floating properties of the CFMT did not change with modification of the level of levodopa (data not shown). The floating lag time and the resultant-weight values remained similar regardless of the amount of the active drug incorporated into the core. As the level of the gas-generating agents and the nature of the film-forming polymer did not change, the carbon dioxide-generation process and the subsequent floating properties did not change either.

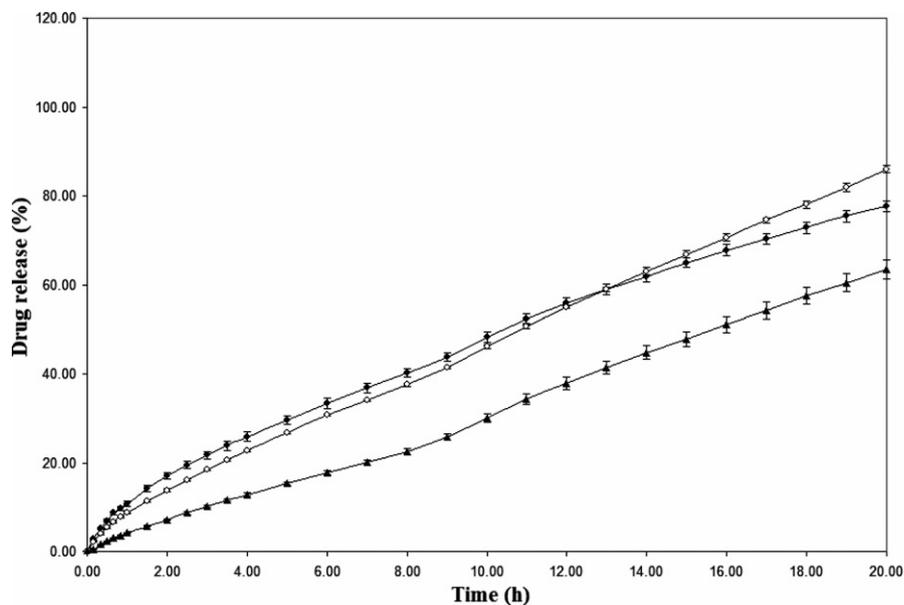


Fig. 5. Influence of the amount of levodopa incorporated into the core – (●) 25.0% (w/w), (○) 37.5% (w/w), (▲) 68.0% (w/w) – on the drug release at pH 3.0, 50 rpm ($n = 5$) of 3 mm CFMT coated with F2 (20% w/w).

4. Conclusion

In conclusion, a new coated multiple-unit floating system based on a very simple composition was developed. The system consisted of an effervescent drug-containing core, made by melt granulation and subsequent compression, coated with a polymeric membrane. The floating ability and the drug release properties of the system were dependent on the composition and the diameter of the core but also on the composition of the coating and the coating level. The most successful formulation was a 3 mm MT that contained variable and rather high percentages of drug, 12% of meltable binder and 17% of carbon dioxide-generating agents and that was coated with a flexible polymeric membrane. Indeed, as modification of the level of levodopa incorporated into the core did not change the floating properties but did change the dissolution profiles, it became possible to modulate the release rate of the active drug. Eudragit® RL30D and ATEC were selected as a film former and a plasticizer, respectively. The coating level was fixed at 20% (w/w). These CFMT floated after 20 min and remained buoyant for more than 13 h. In addition to their very simple composition and manufacturing process, their ability to sustain the drug release for more than 20 h and their high resultant-weight values have shown the potential novelty of these new coated floating minitables.

In the near future, the influence of some of the dissolution parameters on the dissolution profile of levodopa from these CFMT will be examined in order to evaluate their robustness. Moreover, in vivo pharmacoscintigraphic studies on human volunteers will be conducted to validate the experimental results obtained in vitro.

References

- [1] V. Iannucci, G. Coppi, M.T. Bernabei, R. Cameroni, Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence. Part I. Formulation study, *Int. J. Pharm.* 174 (1998) 47–54.
- [2] Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceutics, Body Fluids, and Post-Mortem Material, second ed., The Pharmaceutical Press, London, 1986.
- [3] F. Stocchi, N.P. Quinn, L. Barbato, P.N. Patsalos, M.T. O'Connell, S. Ruggieri, C.D. Mardsen, Comparison between a fast and a slow release preparation of levodopa and combination of the two: a clinical and pharmacokinetic study, *Clin. Neuropharmacol.* 17 (1994) 38–44.
- [4] A.J. Moës, Gastroretentive dosage forms, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 10 (1993) 143–195.
- [5] N. Talwar, H. Sen, J.N. Staniforth, Orally administered controlled drug delivery system providing temporal and special control, US patent 6,261,601 (2001).
- [6] E.A. Klausner, E. Lavy, M. Friedman, A. Hoffman, Expandable gastroretentive dosage forms, *J. Control. Release* 90 (2003) 143–162.
- [7] Y. Sato, Y. Kawashima, H. Takeuchi, H. Yamamoto, In vitro and in vivo evaluation of riboflavin-containing microballoons for a floating controlled drug delivery system in healthy humans, *Int. J. Pharm.* 275 (2004) 97–107.
- [8] S.-J. Hwang, H. Park, K. Park, Gastric retentive drug-delivery systems, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 15 (1998) 243–284.
- [9] B.N. Singh, K.H. Kim, Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention, *J. Control. Release* 63 (2000) 235–259.
- [10] J. Goole, F. Vanderbist, K. Amighi, Development and evaluation of new multiple-unit levodopa sustained-release floating dosage forms, *Int. J. Pharm.* 334 (2007) 35–41.
- [11] J. Hamdani, A.J. Moës, K. Amighi, Development and in vitro evaluation of a novel floating multiple unit dosage form obtained by melt pelletization, *Int. J. Pharm.* 322 (2006) 96–103.
- [12] M. Ichikawa, S. Watanabe, Y. Miyake, A new multiple-unit oral floating dosage system. I. Preparation and in vitro evaluation of floating and sustained-release characteristics, *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 1062–1066.
- [13] S. Sungthongjeen, O. Paeratakul, S. Limmatvapirat, S. Puttipipatkachorn, Preparation and in vitro evaluation of a multiple-unit floating drug delivery system based on gas formation technique, *Int. J. Pharm.* 324 (2006) 136–143.
- [14] A. Streubel, J. Siepmann, R. Bodmeier, Floating matrix tablets based on low density foam powder: effects of formulation and processing parameters on drug release, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18 (2003) 37–45.
- [15] J. Hamdani, A.J. Moës, K. Amighi, Development and evaluation of prolonged release pellets obtained by the melt pelletization process, *Int. J. Pharm.* 245 (2002) 167–177.
- [16] K. Amighi, A.J. Moës, Evaluation of thermal and film forming properties of acrylic aqueous polymer dispersion blends: application to the formulation of sustained-release film coated theophylline pellets, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21 (1995) 2355–2369.
- [17] K. Amighi, A.J. Moës, Influence of curing conditions on the drug release rate from Eudragit NE30D film coated sustained-release theophylline pellets, *S.T.P. Pharma Sci.* 7 (1997) 141–147.
- [18] J. Timmermans, A.J. Moës, Measuring the resultant-weight of an immersed test material. I. Validation of an apparatus and a method dedicated to pharmaceutical applications, *Acta Pharm. Technol.* 36 (1990) 171–175.
- [19] Guidance for Industry, Extended Release Oral Dosage Form: Development Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo correlations, September 1997, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.
- [20] V.P. Shah, Y. Tsong, P. Sathe, J-P Liu, In vitro dissolution profile comparison-statistics and analysis of the similarity factor f_2 , *Pharm. Res.* 15 (1998) 889–896.
- [21] I. Krögel, R. Bodmeier, Floating or pulsatile drug delivery systems based on coated effervescent cores, *Int. J. Pharm.* 187 (1999) 175–184.
- [22] R. Bodmeier, O. Paeratakul, Leaching of water-soluble plasticizers from polymeric films prepared from aqueous colloidal polymer dispersions, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18 (1992) 1865–1882.
- [23] J.C. Gutiérrez-Rocca, J.W. McGinity, Influence of water soluble and insoluble plasticizers on the physical and mechanical properties of acrylic resin copolymers, *Int. J. Pharm.* 103 (1994) 293–301.

ARTICLE

4

Drug Development and Industrial Pharmacy

(sous presse)

Evaluation and Floating Enhancement of Levodopa Sustained Release Floating Minitablets Coated with Insoluble Acrylic Polymer

J. Goole and K. Amighi

5 Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, Brussels, Belgium

F. Vanderbist

Laboratoires SMB S.A., Rue de la Pastorale, Brussels, Belgium

10 This article describes the *in vitro* evaluation and the enhancement of the floating properties of coated sustained release (SR) minitab-
15 lets (MTs). The evaluated system consisted of a 3-mm drug-containing gas-generating core prepared by melt granulation and subsequent compression, which was then coated with a flexible polymeric membrane. Eudragit® RL30D and acetyl triethylcitrate
20 were used as a film former and a plasticizer, respectively. The coating level was fixed at 20% (wt/wt). The optimally coated floating MTs floated within 10 min and remained buoyant for more than 13 h, regardless of the pH of the test medium. By evaluating the dissolution profiles of levodopa at different pH, it was found that the release of levodopa was sustained for more than 12 h
25 regardless of the pH, even if the coating did not cancel the effect of the pH-dependent solubility of the active drug. Finally, the robustness of the coated floating MTs was assessed by testing the drug release variability in function of the stirring conditions during dissolution tests.

Keywords multiple-unit system; minitablets; floating; sustained release; coating; Eudragit®; RL30D; levodopa

INTRODUCTION

30 Oral administration is recognized to be the predominant route for drug delivery. More than 50% of drug delivery systems (DDSs) available in the market are oral DDSs (Deshplande, Rhodes, Shah, & Malick, 1996). These dosage forms (DFs) are
1 easy to administer and increase patient compliance. However, the development process of such systems is precluded by several
35 physiological difficulties. In fact, orally administrated DFs are exposed to a wide range of highly variable conditions during their transit throughout the gastrointestinal (GI) tract. Food

ingestion and the type of meal—caloric content, volume, viscosity, physical state—influence the gastric physiology and thus the dissolution of the active drug from the DFs. The gastric pH fluctuates around pH 1–3 in the fasted state and within a range of pH 3–7 in fed condition, whereas intestinal pH ranges between 6 and 8 (Dressman, Amidon, Reppas, & Shah, 1998; Russel et al., 1993). Motility patterns and the pyloric valve diameter are different in digestive or interdigestive conditions, affecting the gastric emptying rate of ingested DDSs (Deshplande et al., 1996). Kamba et al. have shown that the human stomach potentially imparts a mechanical destructive force of 1.50 and 1.89 N in fasted and fed conditions, respectively (Kamba, Seta, Kusai, Ikeda, & Nishimura, 2000). These potential crushing forces are due to pressure from the gastric wall and the friction between the surface of the DFs and the gastric wall or gastric contents (Katori, Aoyagi, & Terao, 1995). This proves that the intensity of gastric agitation also depends on whether the subject's condition is fasted or fed. The influences of these parameters on the dissolution behavior of an incorporated drug as well as knowledge of its chemical properties have to be well understood to design an oral DF.

60 Sustained release (SR) DFs capable of having a prolonged retention time in the stomach to extend the duration of drug delivery have received much attention in the past two decades, especially for drugs that have a narrow absorption window (NAW) in the upper part of the GI tract (Hoffman et al., 2004). In fact, variable and/or too rapid GI transit can result in incomplete drug release from the DFs above the absorption zone, leading to a decrease in the efficacy of the administered dose (Iannuccelli, Coppi, Bernabei, & Cameroni, 1998a). Moreover, progressive and complete dissolution of the active drug in the stomach may avoid possible dose-dumping due to pH variability between the gastric and the intestinal juices.

Address correspondence to K. Amighi, Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 207, Boulevard du Triomphe, 1050 Brussels, Belgium. E-mail: kamighi@ulb.ac.be

In a previous study (Goole, Deleuze, Vanderbist, & Amighi, 2007a), SR-coated minitablets (MTs) that floated within 20 min and remained buoyant for more than 13 h were developed. The core was based on the compression of granulates prepared by melt granulation. Granulates were based on a very simple composition comprising levodopa (L-dopa) as a model drug, Precirol[®] ATO as a meltable binder, and carbon dioxide-generating agents. These MTs were coated with Eudragit[®] RL30D, an insoluble but readily permeable polymethacrylate polymer (Amighi & Moës, 1995), to produce coated floating minitablets (CFMTs). This polymer provided a flexible membrane that was able to retain the generated gas inside the DF and to sustain the release of the active drug for more than 12 h. Acetyl triethylcitrate (ATEC), which is slightly soluble in water (Gutiérrez-Rocca & McGinity, 1994), was used as a plasticizer to improve the mechanical properties and the resistance of the polymeric film for a prolonged period of time. Lactose was also added to increase the drug diffusion through the coating film. A coating level of 20% (wt/wt) was found appropriate to maintain DF shape integrity for at least 20 h. Other coated multiple-unit floating SR systems are already described in the literature (Ichikawa, Watanabe, & Miyake, 1991; Sungthongjeen, Paeratakul, Limmatvapirat, & Puttipatkhachorn, 2006). Both developments are based on pellets coated with double layers: an inner effervescent layer and an outer gas-entrapping polymeric membrane. The manufacture of the core seemed to take longer than our granulation, and compression processes as the pellets are made by an extrusion-spheronization process that needs at least three steps: a mixing step, an extrusion-spheronization process with addition of water, and thus a drying step. Moreover, in comparison with the other sophisticated multiple-unit floating systems described before in the literature (Iannuccelli et al., 1998a; Sato, Kawashima, Takeuchi, & Yamamoto, 2004; Streubel, Siepmann, & Bodmeier, 2003), our CFMTs are based on a very simple composition, can contain a high amount of active drug, and show applicability for industrialization.

This article aims to evaluate the influence of several dissolution test conditions on the *in vitro* release profiles of levodopa to assess the robustness of the CFMTs. The influence of pH on the floating properties of the CFMTs was also evaluated to obtain the same floating capabilities regardless of the pH.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Levodopa (Newsmart, China), (–)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl) propanoic acid, was used as a model drug. Glycerol palmitostearate (Precirol[®] ATO 5 = Gelucire[®] 52/02), supplied by Gattefosse (France), was used as a meltable binder. Tartaric acid (Federa, Belgium), sodium bicarbonate (Merck, Germany), and calcium carbonate (Welphar, Belgium) were

used as carbon dioxide-generating agents. Lactose 450 mesh (DMV Int., Netherlands) was used as a hydrophilic diluent.

The insoluble polymer used to manufacture the gas-trapping membrane was Eudragit[®] RL30D, in the form of an aqueous colloidal dispersion of poly(ethylacrylate-methylmethacrylate-trimethylammonium-methacrylate chloride) (Rhöm Pharma, Darmstadt, Germany). Citroflox A2[®] (ATEC), used as plasticizer, was supplied by Reilly (Belgium). Talc, with a mean particle size of approximately 10 μm (Aldrich chemical Co Ltd., England), and an antifoam emulsion (silicone emulsion, Vel. S.A., Belgium) were used as received. Sodium croscarmellose (Ac-Di-Sol[®], FMC, Philadelphia, PA, USA) was used as a disintegrating agent into hard gelatin capsules to facilitate the dispersion of the CFMTs in the dissolution medium.

Granulate Manufacture

Granulates were made in a small, vertical, laboratory-scale, high-shear mixer, Mi-Pro[®] (Pro-C-EpT, Belgium), equipped with a transparent bowl and a heating jacket (Hamdani, Moës, & Amighi, 2002). The compositions of granulates are listed in Table 1.

All experiments were started at an impeller speed (IS) of 1,800 rpm and a chopper speed (CS) of 130 rpm while the temperature of the heating jacket was set at 60°C. When the product temperature reached sufficiently high values to soften the binder, the torque increased because of granule formation (Goole, Vanderbist, & Amighi, 2007b). The IS was reduced to 600 rpm after the granule formation step to avoid any further product temperature increase, whereas the CS was increased to 1,000 rpm to break possible agglomerates. The massing time was kept constant at 5 min. The length of the whole granulate manufacturing process was around 30 min. At the end of the process, the granules were cooled at ambient temperature.

The volume size distribution of the granulates was measured with Mastersizer 2000 Laser Diffractometer in dry

TABLE 1
Compositions of the Investigated Granulates (All Quantities are Given as Percentages wt/wt) and Corresponding minitabulet (MT) Properties

Composition No.	C1	C2	C3	C4
Levodopa	37.5	37.5	37.5	37.5
Precirol [®] ATO5	12.0	12.0	12.0	12.0
CaCO ₃	10.0	10.0	10.0	10.0
NaHCO ₃	4.0	4.0	4.0	4.0
Tartaric acid	3.0	7.0	10.0	15.0
Lactose 450 mesh	33.5	29.5	26.5	21.5
Diameter (mm)	3			
Weight (mg)	20			
Compression force (N)	50–100			
Hardness (N) (<i>n</i> = 10)	6 ± 1			

8 powder form (Scirocco 2000; Malvern Instrument, UK) with a suitable standard operating procedure (SOP) (refractive index 1.52, dispersive air pressure 1 bar, vibration rate 50%, and measurement time 30 s). The mean particle size, represented by the equivalent volume diameter $D[4,3]$, of granules should be around 150 μm to provide good flow properties.

Minitablet Preparation

9 MTs were prepared by direct compression. Granules were fed manually into the die of an instrumented single-punch tableting machine (Korch, Germany) to produce MTs using concave-faced punches and dies. The die, composed of eight holes, each 3 mm in diameter, was specially designed for our laboratory. The compression forces, the weight, and the hardness are summarized in Table 1. The hardness was measured with a hardness tester (Computest; Kreamer GmbH, El Ektronik, Darmstadt, Germany). The friability of the MT was $0.15 \pm 0.03\%$. This indicated that they were able to withstand the mechanical stress of the subsequent coating process.

Preparation of the Coating Dispersion

180 The aqueous dispersion used for the coating of the MT is given in Table 2. Talc was previously dispersed in water in the presence of an antifoam agent and mixed with the water-soluble additive using a T45 Ultra-Turrax[®] (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Germany). A dispersion containing Eudragit[®] RL30D required the addition of 20% wt/wt (relative to the polymer content in the film) of plasticizing agent. The plasticizer was added to the polymer aqueous dispersion under gentle stirring. All the components of the coating dispersion were then mixed under magnetic stirring for at least 1 h before starting the coating process.

TABLE 2
Formulation Used for the Coating of Levodopa CFMTs

Formulation	F1
Eudragit [®] RL30D (g) (dry basis)	200
ATEC (g)	40
Talc (g)	50
Lactose (g)	20
Antifoam (g)	2
Water (g)	842
Solid content (% wt/wt)	25.6
Coating level (%)	20

ATEC, acetyl triethylcitrate; CFMTs, coated floating minitables.

Preparation of CFMTs

MTs were transferred into a fluidized bed-coating apparatus (Uni-Glatt[®], Glatt GmbH, Germany) equipped with a bottom-spray coating process in a Würster column and coated with the coating dispersion until the desired film weight was deposited. During the coating operation, the aqueous dispersion was stirred continuously to prevent sedimentation of insoluble particles. The conditions for layering were shown to be as follows: preheating temperature, $40 \pm 2^\circ\text{C}$; preheating time, 10 min; inlet and outlet temperatures, $40 \pm 2^\circ\text{C}$ and $35 \pm 2^\circ\text{C}$, respectively; flow rate, 6 g/min; and pneumatic air pressure, 1 bar. After coating, the CFMTs were further fluidized for 10 min and subsequently cured at 60°C for 8 h (Amighi & Moës, 1995, 1997).

In Vitro Evaluation of Floating Capabilities

To determine the buoyancy capabilities of the CFMTs, an apparatus designed for dynamic measurement of the total force acting vertically on an immersed object was also used. This was the resultant weight (RW) apparatus proposed by J. Timmermans for studying floating magnitude evolution as a function of time (Timmermans & Moës, 1990). By convention, a positive RW signifies that the object is able to float, whereas a negative RW means that the object will sink. CFMTs were placed in a specially designed basket sample holder that was immersed in 1,200 mL of preheated 0.1 N HCl solution containing 0.05% (wt/vol) Polysorbate 20 (pH 1.2, 37°C). The RW was measured every minute for 13 h ($n = 1$).

Dissolution Studies

A Distek 2100C USP 29 dissolution apparatus (Distek Inc., North Brunswick, NJ, USA) Type II (paddle method) was used for the dissolution tests. The rotational speeds used were 50, 75, and 100 rpm. Release testing was carried out in 900 mL of phosphate buffer solutions (0.05 M) containing 0.05% (wt/vol) Polysorbate 20 at pH 1.5, 3.0, and 6.5. The temperature of the dissolution media was maintained at $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Dissolutions were carried out on an equivalent of 150 mg of levodopa and the amount of drug released was detected spectrophotometrically at 280 nm (Agilent 8453 UV-vis Dissolution Testing System; Agilent, Santa Clara, CA, USA). The percentages of drug released were measured at preselected time intervals and averaged ($n = 5$).

Statistical Evaluation

As recommended in the FDA's Guidance for Industry, the similarity factor f_2 was used to determine the similarity of dissolution profiles (FDA, 1997; Shah, Tsong, Sathe, & Liu, 1998). The compared dissolution profiles were obtained under the same test conditions and their dissolution time points were the same, for example, for the controlled release products, they were 1, 3, 5, and 8 h. As indicated by Shah et al. (1998), the

similarity factor f_2 value has to be higher than 50 to assess the similarity between two dissolution profiles.

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of Capsule

245 Tensile strengths, resulting from the carbon dioxide generation upon contact with the dissolution medium, may appear between the CFMTs filled into the hard gelatin capsules. Indeed, the distortion of the membrane due to gas generation could weaken the coating, resulting in higher variability and a
250 decrease in the efficiency to sustain the drug release (Goole et al., 2007a). As this phenomenon occurs in a random way, it can be evaluated in vitro by the analysis of the dissolution profile and more particularly by any increase of standard deviations. Moreover, it has been shown in a previous study (Goole
255 et al., 2007a) that the presence of small cracks on the surface of the film (bubbles of gas diffusing through the membrane were observed visually) provided a bimodal dissolution profile. A disintegrating agent—Ac-Di-Sol®—was used to accelerate the dispersion of the CFMTs in the dissolution medium and,
260 consequently, to prevent possible weakening of the coating before the complete dissolution of the capsule shell.

Dissolution tests were performed at pH 3.0, 50 rpm on CFMTs in which the core was composed according to C1 (Table 1) and coated with F1 (Table 2). Size 0 gelatin capsules were filled with the CFMTs, and the empty space between the CFMTs within the capsule was filled with the disintegrating agent. Its total amount was about 120 mg. The CFMTs, filled into capsules without the disintegrating agent, were also tested for comparison.

270 No delay in the dissolution of levodopa was observed at the beginning of the test when CFMTs were filled into capsule, even when the disintegrating agent was not used (Figure 1). It was observed visually that the gelatin capsule opened within 1–2 min after immersion in the liquid and was completely dissolved in the following 10 min. CFMTs were dispersed and floated within 20 min as already observed in a previous study (Goole et al., 2007a). Standard deviations did not increase and no bimodal dissolution profiles appeared when CFMTs were filled in the capsule, both with and without the disintegrating agent. Moreover, after 8 h, with ($f_2 = 70.7$) or without ($f_2 = 83.3$) the disintegrating agent, the dissolution profiles were statistically similar to that obtained with the CFMTs not filled into a gelatine capsule and remained statistically similar after 20 h. However, the filling into capsule modified the dissolution rate of levodopa as the entire dosage of levodopa was released in 14 h when CFMTs were filled into capsule instead of over more than 20 h when CFMTs were not filled into capsule.

Effect of pH on Drug Release

290 Levodopa is a drug with a pH-dependent solubility that is characterized by four dissociation constants— $pK_a = 2.3, 8.7,$

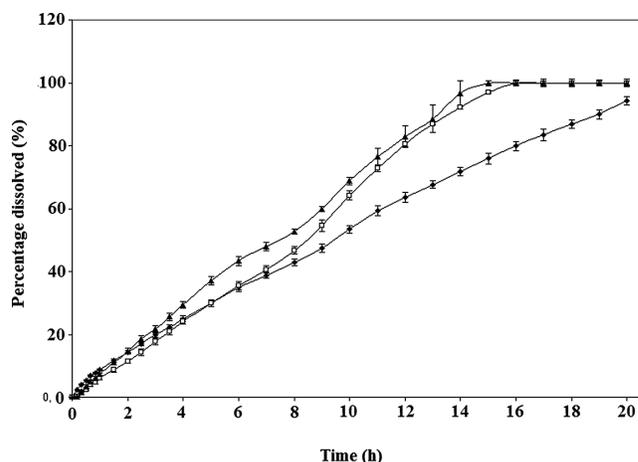


FIGURE 1. Dissolution profiles for 3-mm coated floating minitables (CFMTs) composed according to C1-F1 and filled into a gelatin capsule, (▲) with or (□) without a disintegrating agent, or (●) not filled into a capsule (apparatus II, 60 rpm, pH 3.0) ($n = 5$).

15

9.7, and 13.4 (Clarke, 1986). First of all, the solubility of levodopa was evaluated in function of the pH by using the same phosphate buffer as that used for the dissolution tests. It was found that its solubility at 37.0°C was 760, 400, and 365 $\mu\text{g/mL}$ at pH values of 1.5, 3.0, and 6.5, respectively (Goole
295 et al., 2007b). Then, the dissolution rates of levodopa from 3-mm CFMTs, in which the core was composed according to C1 and coated with F1, were evaluated at 50 rpm in phosphate buffers at pH values of 1.5, 3.0, and 6.5. These pH values were selected to simulate gastric pH in fasted and fed (standard
300 meal) conditions and duodenal pH, respectively (Russel et al., 1993).

At each of the three pH values, a SR of levodopa occurred immediately after immersion (Figure 2). Because of its

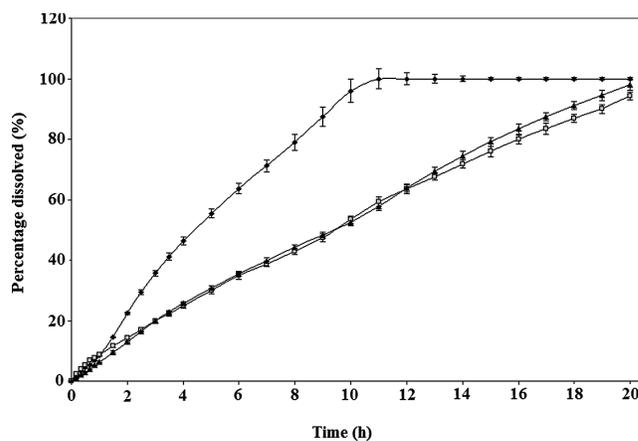


FIGURE 2. In vitro dissolution profiles of levodopa from 3-mm coated floating minitables (CFMTs) composed according to C1-F1 at pH (●) 1.5, (□) 3.0, and (▲) 6.5 (apparatus II, 60 rpm, pH 3.0) ($n = 5$).

305 pH-dependent solubility, the release of the drug was faster at
 pH 1.5 than at pH 3.0 and 6.5. Indeed, after 8 h, the dissolution
 profiles were already not statistically similar, for example,
 $f_{2(\text{pH } 1.5-6.5)} = 43.1$. On the contrary, the dissolution profiles
 remained statistically similar at pH 3.0 and 6.5 even after 20 h
 310 with a f_2 of 89.1. Based on these results, it would seem that the
 coating was not able to cancel out the pH-dependent solubility
 of levodopa. However, as a floating form has to be adminis-
 tered in fed condition to improve its floating capabilities
 (Moës, 1993), the CFMTs seem to be able to provide a
 315 constant SR of levodopa from the stomach in fed condition to
 the intestine.

Stirring Rate

According to the Noyes–Whitney equation, the dissolution rate
 of an active drug from a solid DF could be influenced by
 320 the agitation rate (Fukunaka et al., 2006). Thus, the susceptibil-
 ity of a prolonged release DF to change in its SR ability in
 function of the stirring rate was considered as an indication of
 the robustness of the DF.

The effect of the stirring rate on the dissolution rate of
 325 levodopa from 3-mm CFMTs in which the core is composed
 according to C1 and coated with F1 was examined at pH 3.0.
 The release rate of the drug increased as the stirring rate
 increased (Figure 3) in accordance with the decrease in the
 thickness of the stagnant layer as described in the Noyes–Whitney
 330 equation. Even if an influence of the stirring rate on drug
 release was observed, a SR still occurred immediately after
 immersion and there was no early disintegration of the CFMTs
 (visually observed), regardless of the agitation rate, within the
 experimental period. Aside from this, no bimodal dissolution
 335 profile was observed. All dissolution profiles were statistically
 similar after 8 h—for example, $f_{2(50-100 \text{ rpm})} = 85.5$ —and
 remained similar even after 20 h. These results showed that

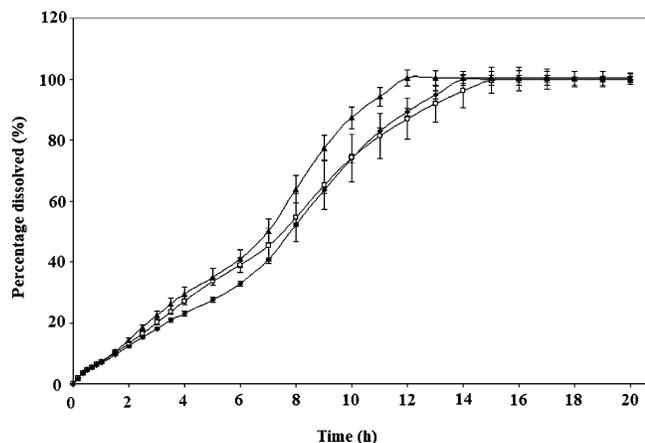


FIGURE 3. Influence of the stirring rate—(●) 50 rpm, (□) 75 rpm, (▲) 100 rpm—on the levodopa release rate from 3-mm coated floating minitables (CFMTs) composed according to C1–F1 at pH 3.0 ($n = 5$).

the dissolution rate depended more on the SR ability of the
 coating than on the stirring rate. Thus, it can be concluded
 that our CFMTs show a good robustness versus stirring rate
 340 modification.

Influence of pH on Floating Properties

As the influence of several dissolution parameters on the
 dissolution profile of levodopa was under investigation, the
 influence of pH on the floating lag time of the CFMTs was
 345 then investigated. The composition of the coating was kept
 constant and was F1 (Table 2). A pH value of 1.2 was obtained
 using HCl 0.1 N, whereas a pH value of 3.0 was obtained using
 a 0.05 M phosphate buffer. Both solutions contained 0.05%
 (wt/vol) Polysorbate 20.
 350

The floating lag time of CFMTs in which the core was
 composed according to C1 was higher at pH 3.0 than at pH 1.2
 and was 80 min, versus 10 min at the lowest pH value
 (Table 3) At pH 3.0, the amount of tartaric acid incorporated
 into the core was not high enough to quickly generate a suffi-
 355 cient amount of carbon dioxide to permit a fast floatation of
 the system.

The percentage of tartaric acid was then increased to 7 and
 10% (wt/wt) in C2 and C3, respectively. The CFMTs floated
 after 60 and 40 min at pH 3.0 when the core contained 7
 360 and 10% (wt/wt) of tartaric acid, respectively. At pH 1.2, the
 CFMTs floated within 10 min, regardless of the amount of tar-
 taric acid incorporated into the core. Although the floating lag
 time decreased at pH 3.0 in both cases, they were still much
 higher than at pH 1.2.
 365

The lowest floating lag time value obtained at pH 3.0 was
 achieved by incorporating 15% (wt/wt) of tartaric acid into the
 core and was similar to the floating lag time obtained at pH 1.2.
 Indeed, the CFMTs floated within 10 min and remained buoyant
 for more than 13 h, regardless of the pH value (Figure 4).
 370 Although the RW values were lower at pH 3.0 than at pH 1.2,

TABLE 3
 Influence of pH on the Floating Lag Time of the Coated
 Floating Minitables (CFMTs) in Function of the Amount
 of Tartaric Acid Incorporated into the Core ($n = 6$)

Composition No.	Amount of Tartaric Acid (%)	pH	Floating Lag Time (min)
C1	3	1.2	10 ± 2
		3.0	80 ± 15
C2	7	1.2	10 ± 2
		3.0	60 ± 13
C3	10	1.2	10 ± 1
		3.0	40 ± 8
C4	15	1.2	7 ± 1
		3.0	8 ± 2

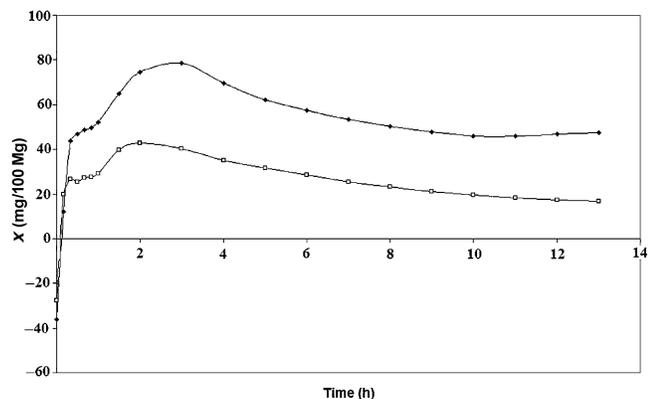


FIGURE 4. Resultant weight profiles obtained from coated floating minitables (CFMTs) at pH (●) 1.2, and (□) 3.0 ($n = 1$).

the RW profile obtained at pH 3.0 was nevertheless encouraging. Indeed, after 30 min, the RW values were never lower than 20/100 mg regardless of the pH, which were much higher values than those obtained with floating pellets (Hamdani, Moës, & Amighi, 2006). Moreover, the floating lag time of our CFMTs was lower than 10 min, and the CFMTs remained buoyant for more than 13 h as several other floating systems described in the literature and for which the good floating properties obtained in vitro were assessed in vivo (Baumgartner, Kristl, Vrečer, Vodopivec, & Zorko, 2000; Iannuccelli, Coppi, Bernabei, & Cameroni, 1998b; Whitehead, Fell, Collett, Sharma, & Smith, 1998; Xiaoqiang, Minjie, Feng, & Yiqiao, 2006). These floating systems have shown a prolonged gastric residence time and plasmatic concentration profiles corresponding to a SR ability of the administered DF. In this way, the present CFMTs will be selected to be evaluated in vivo to assess the results obtained in vitro.

Influence of the Amount of Tartaric Acid Incorporated Into the Core on Dissolution Profile

As it has been demonstrated, levodopa is characterized by a pH-dependent solubility. In that regard, the amount of tartaric acid incorporated into the core would influence its release rate. Dissolution tests were performed on 3-mm CFMTs coated with F1 at pH 3.0, 50 rpm.

The release rate of the drug increased with an increase of the amount of tartaric acid incorporated into the core (Figure 5). Indeed, by incorporating 15% (wt/wt) of tartaric acid, the entire dose of levodopa was released after 18 h versus 70% within more than 20 h when the percentage of tartaric acid reached 3% (wt/wt). In our case, an increase of the release rate is useful. Indeed, as levodopa is characterized by a NAW in the upper part of the small intestine (Rouge, Buri, & Doelker, 1996), the amount of active drug unreleased above the absorption zone is not absorbed, diminishing the efficacy of the administered dose.

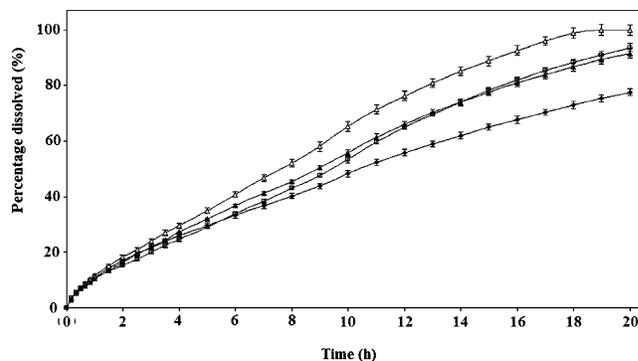


FIGURE 5. Influence of the amount of tartaric acid—(●) 3.0%, (□) 7.0%, (▲) 10.0%, (△) 15.0% (wt/wt)—incorporated into the core on the release rate of levodopa from 3-mm coated floating minitables (CFMTs) (apparatus II, 50 rpm, pH 3.0) ($n = 5$).

CONCLUSION

In a previous study (Goole et al., 2007a), a new coated multiple-unit floating system was developed. In this study, the most successful formulation was evaluated and its floating capabilities were improved. The CFMTs floated within 10 min and remained buoyant for more than 13 h, regardless of the pH (1.2 or 3.0). The floating properties were not influenced by the pH. The release rate of levodopa increased when the CFMTs were filled into a capsule. However, the coating did not show any sign of cracking as the dissolution profiles remained unimodal during the whole period of the test. The coating was not able to cancel out the pH-dependent solubility of levodopa. However, as the dissolution profiles of levodopa were statistically similar at pH 3.0 and 6.5, it seems that in vivo, the CFMTs would be able to provide a constant release of the active drug from the stomach in fed condition to the intestine. Their robustness under varying stirring rates was also demonstrated. In addition to their very simple composition and manufacturing process, their ability to sustain the drug release for more the 12 h and their high RW values have shown the potential novelty of these new CFMTs. In the near future, pharmacoscintigraphic studies will be conducted on these CFMTs to complete the results obtained in vitro.

REFERENCES

- Amighi, K., & Moës, A. J. (1995). Evaluation of thermal and film forming properties of acrylic aqueous polymer dispersion blends: Application to the formulation of sustained-release film coated theophylline pellets. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 21, 2355–2369.
- Amighi, K., & Moës, A. J. (1997). Influence of curing conditions on the drug release rate from eudragit NE30D film coated sustained-release theophylline pellets. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 7, 141–147.
- Baumgartner, S., Kristl, J., Vrečer, F., Vodopivec, P., & Zorko, B. (2000). Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time. *Int. J. Pharm.*, 195, 125–135.

- 13 Clarke, E. G. C. (1986) *Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals Body Fluids and Post-Mortem Material* (2nd ed.). London: The Pharmaceutical Press.
- 445 Deshpande, A. A., Rhodes, C. T., Shah, N. H., & Malick, A. W. (1996). Controlled-release drug delivery systems for prolonged gastric residence: An overview. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 22(6), 531–539.
- Dressman, J. B., Amidon, G. L., Reppas, C., & Shah, V. P. (1998). Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. *Pharm. Res.*, 15, 11–22.
- 450 Fukunaka, T., Yaegashi, Y., Nunoko, T., Ito, R., Golman, B., & Shinohara, K. (2006). Dissolution characteristics of cylindrical particles and tablets. *Int. J. Pharm.*, 310, 146–153.
- 455 Goole, J., Deleuze Ph., Vanderbist F., & Amighi, K. (2007a). New levodopa sustained-release floating minitables coated with insoluble acrylic polymer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, In press.
- Goole, J., Vanderbist, F., & Amighi, K. (2007b). Development and evaluation of new multiple-unit levodopa sustained-release floating dosage forms. *Int. J. Pharm.*, 334, 35–41.
- 14
- 460 Guidance for Industry. (September 1997). *Extended Release Oral Dosage Form: Development Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations*. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.
- 465 Gutiérrez-Rocca, J. C., & McGinity, J. W. (1994). Influence of water soluble and insoluble plasticizers on the physical and mechanical properties of acrylic resin copolymers. *Int. J. Pharm.*, 103, 293–301.
- Hamdani, J., Moës, A. J., & Amighi, K. (2002). Development and evaluation of prolonged release pellets obtained by the melt pelletization process. *Int. J. Pharm.*, 245, 167–177.
- 470 Hamdani, J., Moës, A. J., & Amighi, K. (2006). Development and in vitro evaluation of a novel floating multiple unit dosage form obtained by melt pelletization. *Int. J. Pharm.*, 322, 96–103.
- Hoffman, A., Stepensky, D., Lavy, E., Eyal, S., Klausner, E., & Friedman, M. (2004). Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms. *Int. J. Pharm.*, 277, 141–153.
- 475 Iannuccelli, V., Coppi, G., Bernabei, M. T., & Cameroni, R. (1998a). Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence. Part I. Formulation study. *Int. J. Pharm.*, 174, 47–54.
- Iannuccelli, V., Coppi, G., Bernabei, M. T., & Cameroni R (1998b). Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence. Part II. In vivo evaluation. *Int. J. Pharm.*, 174, 55–62.
- Ichikawa, M., Watanabe, S., & Miyake, Y. (1991). A new multiple-unit oral floating dosage system. I. Preparation and in vitro evaluation of floating and sustained-release characteristics. *J. Pharm. Sci.*, 80, 1062–1066.
- 485 Kamba, M., Seta, Y. S., Kusai, A., Ikeda, M., & Nishimura, K. (2000). A unique dosage form to evaluate the mechanical destructive force in the gastrointestinal tract. *Int. J. Pharm.*, 208, 61–70.
- Katori, N., Aoyagi, N., & Terao, T. (1995). Estimation of agitation intensity in the GI tract in humans and dogs based on in vitro/in vivo correlation. *Pharm. Res.*, 12, 237–243.
- 490 Moës, A. J. (1993). Gastroretentive dosage forms. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 10, 143–195.
- Rouge, N., Buri, P., & Doelker, E. (1996). Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. *Int. J. Pharm.*, 136, 386–339.
- 495 Russel, T. L., Berardi, R. R., Barnett, J. L., Dermentzoglou, L. C., Jarvenpaa, K. M., Schmaltz, S. P., & Dressman, J. B. (1993). Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, north American men and women. *Pharm. Res.*, 10, 187–196.
- 500 Sato, Y., Kawashima, Y., Takeuchi, H., & Yamamoto, H. (2004). In vitro and in vivo evaluation of riboflavin-containing microballoons for a floating controlled drug delivery system in healthy humans. *Int. J. Pharm.*, 275, 97–107.
- Shah, V. P., Tsong, Y., Sathe, P., & Liu, J.-P. (1998). In vitro dissolution profile comparison-statistics and analysis of the similarity factor f_2 . *Pharm. Res.*, 15, 889–896.
- 505 Streubel, A., Siepmann, J., & Bodmeier, R. (2003). Floating matrix tablets based on low density foam powder: Effects of formulation and processing parameters on drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 18, 37–45.
- Sunghongjeen, S., Paeratakul, O., Limmatvapirat, S., & Puttipipatkachorn, S. (2006). Preparation and in vitro evaluation of a multiple-unit floating drug delivery system based on gas formation technique. *Int. J. Pharm.*, 324, 136–143.
- 510 Timmermans, J., & Moës, A. J. (1990). Measuring the resultant-weight of an immersed test material. I. Validation of an apparatus and a method dedicated to pharmaceutical applications. *Acta Pharm. Technol.*, 36, 171–175.
- 515 Whitehead, L., Fell, J. T., Collett, J. H., Sharma, H. L., & Smith, A. M. (1998). Floating dosage forms: An in vivo study demonstrating prolonged gastric retention. *J. Control. Release*, 55, 3–12.
- Xiaoqiang, X., Minjie, S., Feng, Z., & Yiqiao, H. (2006). Floating matrix dosage form for phenoprolamine hydrochloride based on gas forming agent: In vitro and in vivo evaluation in healthy volunteers. *Int. J. Pharm.*, 310, 139–145.

ARTICLE

5

Journal of Drug Delivery Science and Technology

18 (2008) 133-138

***In vitro* evaluation of two concepts of sustained release floating minitables according to the model drug used**

J. Goole¹, F. Vanderbist², K. Amighi^{1*}

¹Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Université libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 207, Boulevard du Triomphe, 1050 Brussels, Belgium

²Laboratoires SMB, Rue de la Pastorale 26, 1080 Brussels, Belgium

*Correspondence: kamighi@ulb.ac.be

This work aims to evaluate the influence of an incorporated drug – e.g. levodopa and ciprofloxacin – on the dissolution and floating properties of two formulation concepts of sustained release floating minitables – e.g. coated and uncoated. Both floating systems contained one active drug, a meltable binder and gas-generating agents. The dissolution profiles and the floating behavior of uncoated floating minitables, in which the generated gas is trapped by a swellable polymer, were compared to coated floating minitables, in which a polymeric membrane can control both the release of the drug and the retention of the generated carbon dioxide. It was shown that the release of a drug that is characterized by a relatively large molecular size could be delayed from coated floating minitables due to a slower permeation rate through the membrane. In contrast, the dissolution profile of an active drug incorporated into uncoated floating minitables did not depend on its molecular size. The release of a drug characterized by a pH-dependant solubility depended more on the pH than the sustained release capabilities of the dosage form, regardless of the formulation concept used. When the amount of uncoated floating minitables filled into a capsule was too high, sticking was an important variable in the release profile of the drug. Finally, the floating properties of the uncoated and coated floating minitables were also found to depend on which active drug was incorporated.

Keywords: Multiple-unit system – Minitables – Floating – Sustained release – Ciprofloxacin – Levodopa.

In previous studies, two formulation concepts of sustained-release floating minitables were developed and evaluated *in vitro* [1,2]. These minitables were composed of granulates made by melt granulation and containing at least one active drug, a meltable lipidic binder and gas-generating agents. The model drug used was levodopa due to its narrow absorption window at the upper part of the gastro-intestinal tract [3] and its short elimination plasma half-life [4], which make this drug an attractive candidate for a gastrically retentive dosage form. The lipidic binder, Precirol ATO 5, was softened at a relatively low temperature and it then acted like a liquid binder. The effervescent compounds were used in order to generate carbon dioxide upon contact with aqueous fluids. The generation of gas and its following entrapment gave a dosage form with a density lower than 1 g/mL, which was the main condition for making the minitables able to float. The first floating system developed contained Methocel K15M as a swellable polymer both to trap the generated carbon dioxide and to sustain the release of the active drug [1]. For the second floating system developed, Methocel K15M was completely replaced by the active drug and a coating step was introduced in the manufacturing process in order to provide a coating capable of maintaining the generated carbon dioxide inside the dosage form for a prolonged period of time. The film former was an insoluble but permeable acrylic polymer, Eudragit RL 30D, which was also able to sustain the release of the drug [2]. The floating lag time of the floating minitables was lower than 10 min and the total floating duration was more than 13 hours, regardless of the formulation concept used to trap the generated carbon dioxide. Moreover, the release of the drug was sustained immediately after immersion and was prolonged for more than 8 hours. However, the floating and dissolution properties were not similar between the systems. Indeed, the underlying mechanisms of drug (or gas) release from water-swellable matrix systems are mainly diffusion and erosion [5], whereas only diffusion is the most important mechanism characterizing the release of a drug (or gas) from coated systems [6]. Thus, it seems important to compare the influence of both the gel-forming

polymer and the coating on both the floating properties of the floating minitables and the dissolution profiles of a determined drug.

In this work, levodopa and ciprofloxacin hydrochloride were used as model drugs in order to evaluate the influence of the physico-chemical properties of the active drug on the dissolution and floating properties of the two formulation concepts of floating minitables. Ciprofloxacin is characterized by a higher molecular weight and a larger molecular size than levodopa [7]. Both molecules are characterized by a pH-dependent solubility [1, 8]. Ciprofloxacin is an orally active synthetic third generation fluoroquinolone antibiotic with a broad spectrum of activity against a variety of gram positive and gram negative bacteria [9, 10]. Bacterial infections represent one of the major sources of morbidity and mortality for patients throughout the world [11]. Fluoroquinolone agents, especially ciprofloxacin, are a treatment of choice for major clinical infections [12], such as *Staphylococcus aureus* or *Enterobacteriaceae*, which require prolonged antibiotic therapy [13]. A gastroretentive dosage form that is able to sustain the release of ciprofloxacin for a prolonged period of time seems to be the most successful strategy for improving drug efficacy because of its narrow absorption window in the upper part of the gastro-intestinal tract [14].

The aim of this study was to demonstrate that, in addition to the technological development of the sustained-release floating minitables, the physicochemical properties of the incorporated drug influence both the dissolution and the floating properties of the dosage form. As a consequence, *in vitro* properties have to be evaluated for each dosage form developed, even if the manufacturing parameters can be kept similar regardless of the incorporated drug.

I. MATERIALS AND METHODS

1. Materials

Levodopa (Newsmart, China) and ciprofloxacin hydrochloride (Siris, India) were used as model drugs. Dissolution tests were performed in a dark room to avoid possible drug alteration. Glyceryl

palmitostearate (Precirol ATO 5 = Gelucire 52/02), supplied by Gattefossé (France), was used as a meltable binder. Tartaric acid (Federa, Belgium), sodium bicarbonate (Merck, Germany) and calcium carbonate (Welphar, Belgium) were employed as carbon dioxide-generating agents. Lactose 450 mesh (DMV Int., The Netherlands) was used as hydrophilic diluent. High viscosity grade HPMC (Methocel K15M, Colorcon, UK) was used as a gel-forming polymer. The insoluble polymer used to make the gas-trapping membrane was Eudragit RL30D (Rhöm Pharma, Darmstadt, Germany). Citroflex A2 (ATEC), used as plasticizer, was supplied by Reilly, Belgium. Talc with a mean particle size of approximately 10 µm (Aldrich chemical Co Ltd, UK) and antifoam emulsion (silicone emulsion, Vel. S.A., Belgium) were used as received. The disintegrant used as protective filler against uncoated FMT sticking and filled into capsules in some dissolution tests was sodium croscarmellose (Ac-Di-Sol, FMC, Philadelphia, USA).

2. Methods

2.1. Preparation of minitables

2.1.1. Granulate manufacture

Granulates were made in a small vertical laboratory-scale high-shear mixer, Mi-Pro (Pro-C-EpT, Belgium), equipped with a transparent bowl and a heating jacket [15]. The granulate compositions are listed in Table I.

All experiments were started at an impeller speed (IS) of 1,800 rpm and a chopper speed (CS) of 130 rpm, while the temperature of the heating jacket was set at 60°C. When the product temperature reached sufficiently high values to soften the binder, the torque increased due to granule formation [1]. The IS was reduced to 600 rpm after the granule formation step in order to avoid any further product temperature increase, while the CS was increased to 1,000 rpm to break the possible agglomerates. The massing time was kept constant at 5 min. The length of the whole granulate manufacturing process was around 30 min. At the end of the process, the granules were cooled at ambient temperature.

After sieving, the volume size distribution of the granulates was measured with Mastersizer 2000 Laser Diffractometer in dry powder form (Scirocco 2000, Malvern Instrument, UK) with a suitable Standard Operating Procedure (SOP) (refractive index 1.52, dispersive air pressure 1 bar, vibration rate 50%, measurement time 30 s). The mean particle size, represented by the equivalent volume diameter D[4,3], of granules should be around 150-300 µm to provide good flow properties.

2.1.2. Minitables preparation

The minitables were prepared by direct compression of the granules. Granules were fed manually into the die of an instrumented single-punch tableting machine (Korch, Germany) to produce minitables using concaved-faced multiple (eight) punches and dies, each 3 mm in diameter. The compression forces, and the weight and the hardness of the minitables are summarized in Table I. The hardness

was measured with a hardness tester (Computest, Kreamer GmbH, El Elektronik, Darmstadt, Germany). The friability of the minitables was 0.12 ± 0.05%. This indicated that they were able to withstand the mechanical stress of the subsequent coating process.

2.1.3. Preparation of the coating dispersion

The aqueous dispersions used for the coating of the minitables are given in Table II. Talc was previously dispersed in water in the presence of an antifoam agent and mixed with the water-soluble additive using a T45 Ultra-Turrax (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Germany). The coating dispersion containing Eudragit RL30D required the addition of 20% w/w (relative film content) of plasticizing agent. The plasticizer was added to the polymer aqueous dispersion under gentle stirring. All the components of the coating dispersion were then mixed under magnetic stirring for at least one hour before starting the coating process.

2.1.4. Preparation of the coated FMT

The minitables were transferred into a fluidized bed coating apparatus (Uni-Glatt, Glatt GmbH, Germany) equipped with a bottom-spray coating process in a Würster column and coated with the coating dispersion until the desired film weight was deposited. During the coating operation, the aqueous dispersion was stirred continuously to prevent sedimentation of insoluble particles. The conditions for layering were shown to be as follows: preheating temperature, 40 ± 2°C; preheating time, 10 min; inlet and outlet temperatures, 40 ± 2°C and 35 ± 2°C, respectively; flow rate, 6 g/min; pneumatic air pressure, 1 bar. After coating, the coated floating minitables were further fluidized for 10 min and subsequently cured at 60°C for 8 h [16, 17].

2.2. Determination of physicochemical properties of FMT

2.2.1. In vitro evaluation of floating capabilities

To determine the buoyancy capabilities of the floating minitables, an apparatus designed for dynamic measurement of the total force acting vertically on an immersed object was also used. This was the resultant-weight apparatus proposed by Timmermans and Moës for

Table II - Formulations used for the coating of levodopa coated floating minitables.

Formulation	F1	F2	F3
Eudragit RL 30D (g) (dry basis)	200	200	200
Ciprofloxacin (g)	-	10	20
Lactose (g)	20	-	-
ATEC (g)	40	40	40
Talc (g)	50	50	50
Antifoam (g)	2	2	2
Water (g)	888	898	888
Solid content (% w/w)	26	25	26
Coating level (%)	20	20	20

Table I - Compositions of the investigated granulates (all quantities are given as percentages w/w) and corresponding minitables properties.

Composition No.	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Levodopa	37.5	37.5	-	-	-	-
Ciprofloxacin	-	-	31.25	49.0	54.0	53.0
Precirol ATO 5	12.0	12.0	18.0	18.0	18.0	18.0
Methocel K15M	25.0	-	25.0	20.0	15.0	-
CaCO ₃	10.0	10.0	10.0	5.0	5.0	10.0
NaHCO ₃	4.0	4.0	4.0	5.0	5.0	4.0
Tartaric acid	3.0	15.0	3.0	3.0	3.0	15.0
Latose 450 mesh	8.5	21.5	8.75	-	-	-
Diameter (mm)	3					
Weight (mg)	20					
Compression force (N)	50-100					
Hardness (N) (n = 10)	5 ± 1					

studying floating magnitude evolution as a function of time [18]. By convention, a positive resultant-weight signifies that the object is able to float, whereas a negative resultant-weight means that the object sinks. Floating minitables were placed in a specially designed basket sample holder, which was immersed in 1,200 mL of preheated 0.1 N HCl solution containing 0.05% (w/v) Polysorbate 20 (pH 1.2, 37°C). The resultant-weight was measured every minute for 13 h.

2.2.2. Dissolution studies

A Distek 2100C USP 29 dissolution apparatus (Distek Inc., North Brunswick, NJ, USA) Type II (paddle method) was used for the dissolution tests. The rotational speed employed was 50 rpm. Release testing was carried out in 900 mL of phosphate buffer solutions (0.05 M) containing 0.05% (w/v) Polysorbate 20 at pH 1.5, 3.0 and 6.5. The temperature of the dissolution media was maintained at $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Dissolutions were carried out on an equivalent of 150 mg of levodopa or 250 mg of ciprofloxacin. The amount of drug released was detected spectrophotometrically at 280 nm and 317 nm for levodopa and ciprofloxacin, respectively (Agilent 8453 UV-vis Dissolution Testing System, Agilent, USA). The percentages of drug released were measured at preselected time intervals and averaged ($n = 5$).

2.3. Statistical evaluation

As recommended in the FDA's Guidance for Industry, the similarity factor f_2 was used to determine the similarity of dissolution profiles [19, 20]. The compared dissolution profiles were obtained under the same test conditions and their dissolution time points were the same, e.g. for the controlled release products, they were 1, 3, 5 and 8 h. As indicated by Shah *et al.*, the similarity factor f_2 value has to be higher than 50 in order to assess the similarity between two dissolution profiles [20].

II. RESULTS AND DISCUSSION

1. Release lag time

The dissolution profiles of levodopa and ciprofloxacin obtained from coated floating minitables were first evaluated and compared at pH 3.0. The release of levodopa from coated floating minitables with a core composed of C2 (Table I) and coated with the coating dispersion F1 (Table II) was sustained immediately after immersion and no release lag time was observed (Figure 1). On the contrary, the release of ciprofloxacin from coated floating minitables with a core composed of C6 (Table I) and coated with F1, only occurred 1 hour after immersion of the floating minitables. Indeed, only 1% (w/w) of the incorporated drug was released within the first hour of the test. After that, the release rate of ciprofloxacin increased and a sustained release of the drug occurred. As the composition of the coating and the diameter of the floating minitables containing ciprofloxacin are similar to those used for coated floating minitables containing levodopa, it seemed that the release lag time observed with ciprofloxacin was due to the molecular structure of this active drug. Indeed, Ansari *et al.* have shown that the permeation rate of drugs through membranes depends on the size and the molecular weight of the studied drugs [21]. The permeation rate of a drug decreases when its size and its molecular weight increase. In this case, levodopa could diffuse through the coating immediately after immersion, whereas the release of ciprofloxacin was delayed due to its larger molecular size and its higher molecular weight. After the release lag time observed with floating minitables containing ciprofloxacin, the dissolution rate was higher than that obtained with floating minitables containing levodopa. To reach the desired amount of ciprofloxacin, the number of floating minitables was higher than the number of floating minitables containing levodopa. Thus, the contact area between the floating minitables and the dissolution medium was also higher, increasing the dissolution rate of the drug.

A release lag time could involve problems in the therapy, delaying

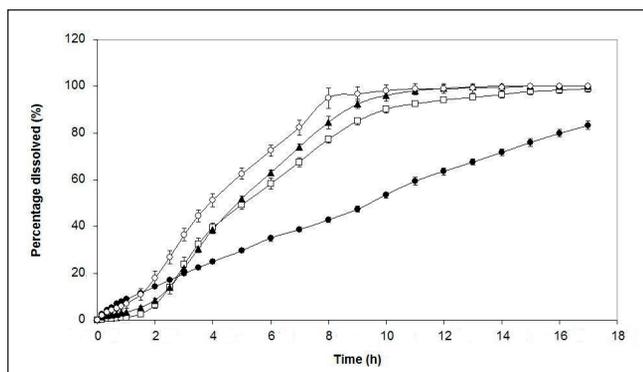


Figure 1 - Drug release profiles from coated floating minitables containing levodopa C1-F1 (●) and ciprofloxacin C6-F1 (□), and influence of the incorporation of ciprofloxacin in the coating on the lag time in the drug release C6-F2 (▲), C6-F3 (○) (pH 3.0, 50 rpm, $n = 5$)

the therapeutic response of the active drug within the first period following ingestion of the dosage form. Moreover, for drugs having a narrow absorption window at the upper part of the small intestine, a delay in the release associated with a possible early gastric emptying process can result in an incomplete drug release from the device above the absorption zone. Therefore, ciprofloxacin was introduced in the composition of the coating (Table II) in order to avoid a lag time in its release. The incorporation of 5% (w/w) (related to the film former) of ciprofloxacin in F2 did not reduce the release lag time. The percentage of ciprofloxacin dissolved was only 3% (w/w) after 1 h. The percentage of ciprofloxacin incorporated into the coating was then increased to 10% (w/w) (related to the film former) in F3. The release lag time was eliminated and 7% (w/w) of the active drug was released within the first hour of the test. Moreover, the incorporation of 10% (w/w) of ciprofloxacin into the coating did not disturb the sustained release of the drug that occurred from the beginning to the end of the test. The dissolution profiles remained statistically similar regardless of the percentage of ciprofloxacin incorporated into the coating ($f_{2(0.5\%)} = 71$; $f_{2(0.10\%)} = 52$).

The dissolution profiles of the incorporated drugs obtained from uncoated floating minitables, containing Methocel K15M as a gas-trapping and sustained release agent, did not show a release lag time regardless of the size of the incorporated drug (data not shown). Both compositions, C1 and C3 (Table I), contained the same percentage of Methocel K15 M and the same percentage of gas-generating agents. In both cases, a sustained release occurred immediately after immersion and the release of the drugs was prolonged for more than 8 h. The dissolution rate of an incorporated drug from the uncoated floating minitables depended more on the sustained release ability of Methocel K15M and on the physicochemical properties (e.g. pKa) of the active drug than the molecular size and/or the molecular weight.

2. Effect of pH on drug release

Levodopa and ciprofloxacin are characterized by four – pKa = 2.3, 8.7, 9.7, 13.4 [4] – and two – pKa = 6.01, 8.73 [22] – dissociation constants, respectively. They thus present pH-dependent solubility profiles. The dissolution rates of levodopa and ciprofloxacin from uncoated and coated floating minitables were evaluated in phosphate buffers at pH values of 1.5, 3.0 and 6.5 (Figure 2). These pH values were selected to simulate gastric pH in fasted and fed (standard meal) conditions and duodenal pH, respectively. The uncoated floating minitables containing levodopa were composed of C1, whereas those containing ciprofloxacin were composed of C3 (Table I). The core of the coated floating minitables containing levodopa was composed of C2 (Table I) and was coated with F1 (Table II), whereas the core containing ciprofloxacin was composed of C6 (Table I) and was coated with F1 (Table II). The dissolution rate depended on the pH-dependent

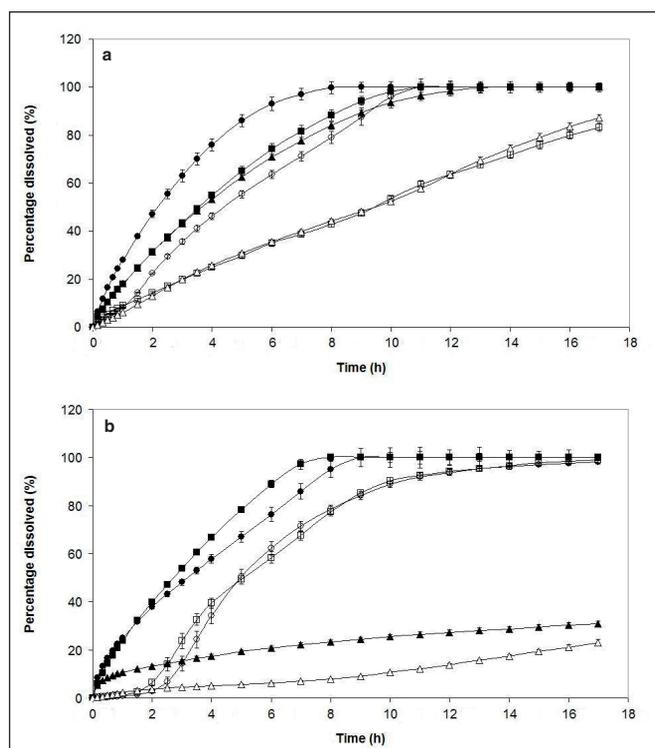


Figure 2 - Dissolution profiles of levodopa (a) and ciprofloxacin (b) from uncoated floating minitables at pH 1.5 (●), 3.0 (■), 6.5 (▲) and coated floating minitables at pH 1.5 (○), 3.0 (□) and 6.5 (△) (n = 5).

solubility properties of the incorporated drug, regardless of the tested floating minitables. Indeed, neither the uncoated floating minitables ($f_{2(1.5-6.5)} = 45$ for levodopa [Figure 2a] and 15 for ciprofloxacin [Figure 2b]) nor the coated floating minitables ($f_{2(1.5-6.5)} = 32$ for levodopa [Figure 2a] and 14 for ciprofloxacin [Figure 2b]) avoided the pH-dependent solubility of these active drugs within a test period of 20 h. According to the release mechanisms of a matrix and a coated dosage form, for the same fixed pH, the release of the drugs from the uncoated floating minitables was faster than from the coated floating minitables, regardless of the active drug tested.

The pH did not avoid the release lag time of ciprofloxacin from the coated floating minitables. Thus, the release of ciprofloxacin from coated floating minitables depended more on its molecular size and its molecular weight than on its pH-depend solubility properties. Indeed, no release lag time was observed from coated floating minitables containing levodopa, even at the pH at which its solubility was the lowest.

3. Influence of the incorporated amount of active drug on the dissolution profiles

In theory, the higher the therapeutic dose, the greater the quantity of minitables filled into the capsule required to reach this dose. According to Rouge *et al.*, hydrophilic minimatrices introduced into a capsule exhibit a strong tendency to adhere to one another due to the presence of the gelatin capsule and to the earlier hydration of the minitables [23]. In the future, an incomplete dispersion of floating minitables could involve therapeutic problems due to possible inter- and intra-subject variations. On the other hand, tensile strengths, resulting from carbon dioxide generation upon contact with the dissolution medium, could appear between the coated floating minitables within the capsule. The distortion of the membrane due to the gas generation could weaken the coating, resulting in a decrease and a non-reproducible efficiency of the sustained-release due to the appearance of small cracks on the surface of the coating [24]. As the sticking of the uncoated floating minitables and the appearance of cracking on the coating of the coated

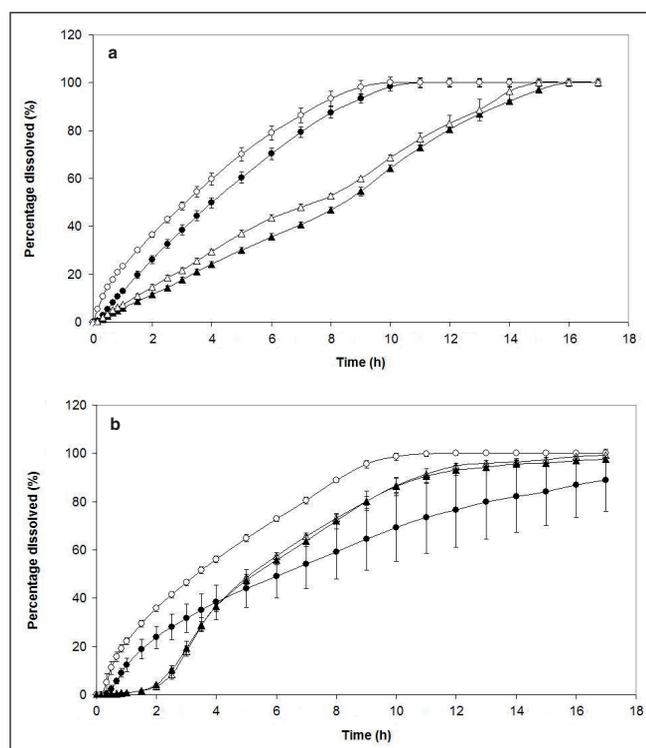


Figure 3 - Dissolution profiles of levodopa (a) and ciprofloxacin (b) from uncoated floating minitables filled into capsules with (●) or without (○) disintegrating agent and coated floating minitables filled into capsules with (▲) or without (△) disintegrating agent (n = 5).

floating minitables occur randomly, it can be evaluated *in vitro* by the analysis of the dissolution profiles and, more particularly, by the increase in the standard deviation. In order to evaluate the influence of the quantity of floating minitables filled into a capsule on any possible tendency to sticking or cracking, a disintegrant - Ac-Di-Sol - was used to accelerate the dispersion of the floating minitables in the dissolution medium, which could prevent possible adhesion between the uncoated floating minitables or could avoid the creation of tensile strength between the coated floating minitables during the dissolution of the capsule shell.

Dissolution tests were performed at pH 3.0 on uncoated floating minitables composed of C1 and C3 (Table I) and on coated floating minitables in which the core was composed of C2 and C6 (Table I), both cores being coated with F1 (Table II). Twenty floating minitables containing levodopa and forty floating minitables containing ciprofloxacin were filled separately into size 0 gelatin capsules, regardless of the formulation concept (coated or uncoated floating minitables) and evaluated. The empty space between the floating minitables within the capsule was filled with the disintegrating agent. Uncoated and coated floating minitables filled into the capsules without the disintegrating agent were also tested for comparison.

The dissolution profiles obtained from coated floating minitables remained statistically similar within 20 h regardless of the quantity of floating minitables filled into the capsule - ($f_{2(\text{levodopa})} = 70$ [Figure 3a]; $f_{2(\text{ciprofloxacin})} = 91$ [Figure 3b]). The use of the disintegrating agent did not seem to be required for coated floating minitables as, when Ac-Di-Sol was not filled into the capsule, the release of levodopa was not delayed and the release lag time of ciprofloxacin was not prolonged. Moreover, the standard deviations did not increase in the absence of Ac-Di-Sol, regardless of the drug incorporated. There was no appearance of cracking on the coating (visually observed), regardless of the quantity of floating minitables filled into the capsule and of the incorporation of the disintegrative agent.

The dissolution profiles of levodopa obtained from uncoated

floating minitables remained statistically similar within 20 h ($f_2 = 57$), regardless of whether the disintegrant was incorporated or not (Figure 3a). On the other hand, the increase in the standard deviations showed that the uncoated floating minitables containing ciprofloxacin adhered to one another when Ac-Di-Sol was not filled into the capsule (Figure 3b). Indeed, the dissolution profile of ciprofloxacin obtained in the presence of the disintegrant was not statistically similar to the dissolution profile obtained without its incorporation in the capsule ($f_2 = 37$). When Ac-Di-Sol was not incorporated in the capsule, sticking of the uncoated floating minitables occurred, prolonging the release of ciprofloxacin due to a decrease in the surface of contact between the floating minitables and the dissolution medium.

Consequently, it seems that the appearance of cracks on the surface of the coating did not depend on the quantity of floating minitables filled into the capsule, thus making the incorporation of a disintegrant unnecessary. On the contrary, the sticking tendency of floating minitables containing a swellable agent seemed to increase as the quantity of floating minitables filled into the capsule increased.

4. Evaluation of the floating properties

4.1. Uncoated FMT

The influence of the incorporated drug on the floating lag time and the resultant-weight profile of the uncoated floating minitables containing levodopa was first compared to those of the uncoated floating minitables containing ciprofloxacin. The uncoated floating minitables were composed of C1 and C3, respectively (Table I).

The uncoated floating minitables floated within 10 min and remained buoyant for more than 13 h regardless of the drug incorporated (Figure 4a). However, the maximal resultant-weight value was reached faster and was higher when the uncoated floating minitables contained ciprofloxacin (87 mg/100 mg within 1 h) than when they contained levodopa (68 mg/100 mg within 3 h). Moreover, the resultant-weight values obtained from the uncoated floating minitables containing ciprofloxacin were higher than those obtained from the uncoated floating minitables containing levodopa during the whole period of the test. Therefore, it seems that the incorporated drug influenced the floating properties of the uncoated floating minitables.

The resultant-weight values obtained from the uncoated floating minitables containing ciprofloxacin were sufficiently high to allow a reduction in the incorporated amount of gas-generating agents in order to increase the amount of the incorporated drug (Figure 4a). The amount of the gas generating agents was therefore decreased to 13% (w/w) in C4 (Table I). The floating lag time still remained lower than 10 min. The decrease in the amount of carbon-dioxide generating agents did not influence the total floating duration, which was still higher than 13 h, whereas the maximal resultant-weight value decreased from 87 to 59 mg/100 mg. Moreover, the decrease in the effervescent compounds from 27 to 13% (w/w) did not influence the dissolution rate as the dissolution profiles remained statistically similar ($f_2 = 69$) (data not shown).

The amount of Methocel K15M was then decreased to 15% (w/w) in C5 (Table I). The uncoated floating minitables floated within 10 min and remained buoyant for more than 13 h. Moreover, the resultant-weight values did not decrease significantly. However, the dissolution rate increased (data not shown) and the dissolution profiles obtained from C3 and C5 were not statistically similar ($f_2 = 43$).

4.2. Coated FMT

The resultant-weight profile of coated floating minitables composed of C2 (Table I) and coated with F1 (Table II) was first compared to the resultant-weight profile obtained from coated floating minitables composed of C6 (Table I) and coated with F1 (Table II). As observed with the uncoated floating minitables, the choice of incorporated drug influenced the floating properties of the coated floating minitables (data not shown). Indeed, the coated floating minitables floated wi-

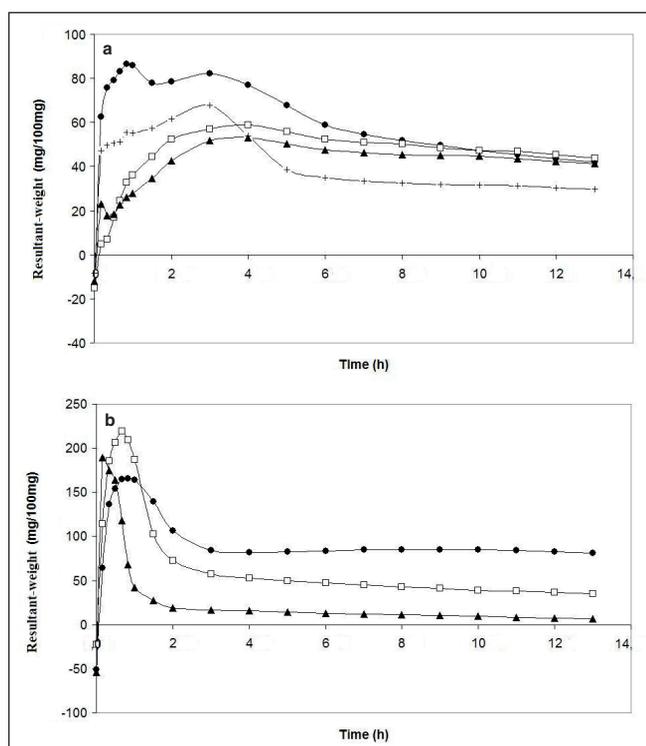


Figure 4 - Floating properties of uncoated floating minitables (a) containing levodopa (+) and increasing amounts of ciprofloxacin - C3 (●), C4 (□), C5 (▲) - and of coated floating minitables (b) containing ciprofloxacin and coated with F1 (●), F2 (□) and F3 (▲) (n = 1).

thin 10 min regardless of the drug incorporated but, as observed with uncoated floating minitables, the maximal resultant-weight value obtained from the coated floating minitables containing ciprofloxacin was higher (165 mg/100 mg) than the maximal resultant-weight value obtained from the coated floating minitables containing levodopa (95 mg/100 mg).

The influence of the incorporation of ciprofloxacin into the coating (Table II) on the floating properties of coated floating minitables, in which the core was composed of C6, was then evaluated (Figure 4b). The coated floating minitables floated within 10 min regardless of the amount of ciprofloxacin incorporated into the coating. When 0, 5 and 10% (w/w) of ciprofloxacin were incorporated into the coating, the resultant-weight values were about 85, 40 and 10 mg/100 mg from 2 h after immersion to the end of the test, respectively. Moreover, the resultant-weight values obtained using the coating formulations F2 and F3 were lower than those obtained with F1 from 1 h after immersion to the end of the test. The incorporation of ciprofloxacin, which is characterized by a relatively large molecular size, seemed to facilitate the diffusion of the generated gas through the coating, decreasing the floating strength 1 h after immersion. Thus, even if there was no influence on the floating lag time value, the incorporation of ciprofloxacin in the coating strongly influenced the maximal resultant-weight value.

*

This study showed that a release lag time could occur in the dissolution profile from coated floating minitables when the incorporated drug was characterized by a relatively large molecular size. On the other hand, the release profile obtained from uncoated floating minitables did not depend on the molecular size of the incorporated drug. Neither the swellable polymer nor the coating eliminated the influence of the pH-dependant solubility on the dissolution profile of the incorporated drugs. Sticking of uncoated floating minitables was observed when

a large amount of floating minitablets was filled into a capsule. The floating properties of uncoated and coated floating minitablets were found to depend on the choice of active drug incorporated into the system.

We have demonstrated that the physicochemical properties of an incorporated drug can influence the dissolution and the floating properties of our uncoated and coated floating minitablets. Thus, it is very important to evaluate the *in vitro* properties of the floating minitablets for each incorporated drug in order to optimize the development of the sustained-release floating multiple-unit systems.

REFERENCES

- Goole J., Vanderbist F., Amighi K. - Development and evaluation of new multiple-unit levodopa sustained-release floating dosage forms. - *Int. J. Pharm.*, **334**, 35-41, 2007.
- Goole J., Deleuze Ph., Vanderbist F., Amighi K. - New levodopa sustained-release floating minitablets coated with insoluble acrylic polymer. - In press, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*
- Hoffman A., Stepensky D., Lavy E., Eyal S., Klausner E., Friedman M. - Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms. - *Int. J. Pharm.*, **277**, 167-177, 2004.
- Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post-Mortem Material. - 2nd ed., The Pharmaceutical Press, London, 1986.
- Kiil S., Dam-Johansen K. - Controlled drug delivery from swellable hydroxypropylmethylcellulose matrices: model-based analysis of observed radial front movements. - *J. Control. Release*, **90**, 1-21, 2003.
- Siepmann J., Lecomte F., Bodmeier R. - Diffusion-controlled drug delivery systems: calculation of the required composition to achieve desired release profiles. - *J. Control. Release*, **60**, 379-389, 1999.
- United State Pharmacopoeia XXV, National Formulary XX, 425-426, 2002.
- Ross D.L., Riley C.M. - Aqueous solubilities of some variously substituted quinolone antimicrobials. - *Int. J. Pharm.*, **63**, 237-250, 1990.
- Novakovic J., Nesmerak K., Nova H., Filka K. - An HPTLC method for the determination and the purity control of ciprofloxacin HCl in coated tablets. - *J. Pharm. Bio. Anal.*, **25**, 957-964, 2001.
- Nagaralli B.S., Seetharamappa J., Melwanki M.B. - Sensitive spectrophotometric methods for the determination of amoxicillin, ciprofloxacin and piroxicam in pure and pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Bio. Anal.*, **29**, 859-864, 2002.
- Lboutounne H., Chaulet J.F., Ploton C., Falson F., Pirot F. - Sustained *ex vivo* skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. - *J. Control Release*, **82**, 319-334, 2002.
- Wise R. - Future management of serious infections with quinolones. - *Clin. Drug. Invest.*, **15**, 39-46, 1998.
- Mader J.T., Landon G.C., Calhoun J. - Antimicrobial treatment of osteomyelitis. - *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **295**, 87-95, 1993.
- Rouge N., Buri P., Doelker E. - Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. - *Int. J. Pharm.*, **136**, 117-139, 1996.
- Hamdani J., Moës A.J., Amighi K. - Development and evaluation of prolonged release pellets obtained by the melt pelletization process. - *Int. J. Pharm.*, **245**, 167-177, 2002.
- Amighi K., Moës A.J. - Influence of plasticizer concentration and storage conditions on the drug release rate from Eudragit RS30D film-coated sustained-release theophylline pellets. - *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **42**, 29-35, 1996.
- Amighi K., Moës A.J. - Influence of curing conditions on the drug release rate from Eudragit NE30D film coated sustained-release theophylline pellets. - *STP Pharma Sci.*, **7**, 141-147, 1997.
- Timmermans J., Moës A.J. - Measuring the resultant-weight of an immersed test material. I. Validation of an apparatus and a method dedicated to pharmaceutical applications. - *Acta Pharm. Technol.*, **36**, 171-175, 1990.
- Guidance for Industry, Extended Release Oral Dosage Form: Development Evaluation, and Application of *In Vitro/In Vivo* correlations. - US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, September 1997.
- Shah V.P., Tsong Y., Sathe P., Liu J.-P. - *In vitro* dissolution profile comparison-statistics and analysis of the similarity factor f_2 . - *Pharm. Res.*, **15**, 889-896, 1998.
- Ansari M., Kazemipour M., Aklamli M. - The study of drug permeation through natural membranes. - *Int. J. Pharm.*, **327**, 6-11, 2006.
- Vilches A.P., Jimenez-Kairuz A., Alovero F., Olivera M.E., D.A. Allemandi, Manzo R.H. - Release kinetics and up-take studies of model fluoroquinolones from carbomer hydrogels. - *Int. J. Pharm.*, **246**, 17-24, 2002.
- Rouge N., Leroux J.-C., Cole E.T., Doelker E., Buri P. - Prevention of the sticking tendency of floating minitablets filled into hard gelatin capsule. - *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **43**, 165-171, 1997.
- Goole J., Vanderbist F., Amighi K. - Evaluation and floating enhancement of levodopa sustained-release floating minitablets coated with insoluble acrylic polymer. - In press, *Drug Dev. Ind. Pharm.*

MANUSCRIPT

Received 12 November 2007, accepted for publication 25 January 2008.

ARTICLE

6

International Journal of Pharmaceutics
(*soumis*)

Pharmacoscintigraphic and pharmacokinetic evaluation on healthy human volunteers of sustained-release floating minitablets containing levodopa and carbidopa

J. Goole^a, B. Van Gansbeke^{b,c}, G. Pilcer^a, Ph. Deleuze^a, D. Blocklet^c, S. Goldman^c, M. Pandolfo^d, F. Vanderbist^e, K. Amighi^{a*}

^a Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

^b Department of Pharmacy, Erasme Hospital, Brussels, Belgium

^c Department of Nuclear Medicine, Erasme Hospital, Brussels, Belgium

^d Department of Neurology, Erasme Hospital, Brussels, Belgium

^e SMB S.A., Brussels, Belgium

Correspondence: Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie,
Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP 207,
Boulevard du Triomphe, 1050 Brussels, Belgium
Phone: + 32 –2 –650 5252
Fax: + 32 –2 –650 5269
E-mail: kamighi@ulb.ac.be

Keywords: Clinical study; Gamma scintigraphy; Pharmacokinetics; Minitablets; Floating; Sustained-release; Levodopa; Carbidopa

Abstract

In this study, scintigraphic and pharmacokinetic studies were conducted on ten healthy, fed volunteers. Two concepts of sustained-release floating minitablets – Levo-Form 1 (matrix) and 2 (coated) - were evaluated and compared to the marketed product Prolopa[®] HBS 125. All the floating forms were radiolabelled with ¹¹¹In in order to evaluate their gastric residence time using γ -scintigraphy. It was shown that the three formulations offered almost the same mean gastric residence time, which was about 240 min. Prolopa[®] HBS 125 and Levo-Form 2 presented intragastric disintegration, which can lead to a more pronounced “peak & valley” effect on the plasma concentration-time profile of levodopa. In contrast, the plasma concentration-time profile of levodopa following the administration of Levo-Form 1 was more evenly distributed. Moreover, Levo-Form 1 provided the lowest variations between men and women in terms of AUC and C_{max} values. Finally, when the same amount of inhibitors of extracerebral dopa decarboxylase - carbidopa and benserazide - had been administrated, the mean AUC, C_{max} and T_{max} values obtained for benserazide were lower than those obtained for carbidopa.

Acknowledgements

The authors are grateful to S.M.B., Brussels, Belgium and they especially wish to thank Mrs. Renilde Sibenaler and Mr. Fabrice Van Kerkhoven for their valuable assistance in performing the pharmacokinetic analysis.

1. Introduction

Parkinson's disease is a common progressive neurological disorder caused by the degeneration of dopaminergic neurones within the *substantia nigra* (Monville et al., 2005). The loss of nigral dopamine neurons, combined with the decline of striatal dopamine activity in the nerve cells, causes a loss of control with both physical and mental dysfunctions (Forte et al., 2005). Trials with oral dopamine have always failed because dopamine cannot cross the blood-brain barrier (Kordower et al., 1999). This discovery led to the use of levodopa in order to enhance synaptic dopamine transmission (Monville et al., 2005). The amino-acid, levodopa, is a precursor of the neurotransmitter dopamine, which easily enters the central nervous system, where it is converted into dopamine by an aromatic amino acid decarboxylase (Zhang et al., 2001). A conventional oral dopa medication controls the evolution of Parkinson's disease adequately for about 5 years (Marsden et al., 1977). Unfortunately, this therapy, when conducted over a longer period of time leads, in 70 percent of treated patients, to the development of adverse fluctuations in motor response, called dyskinesia (Duvoisin, 1974). The neural mechanisms underlying these symptoms have notably been associated with pulsatile stimulation of dopamine receptors (Bezard et al., 2001). Indeed, due to the relatively short elimination plasma half-life time of levodopa ($t_{1/2} = 1\text{h}$) (Clarke, 1986), its plasma concentrations rapidly rise and fall after drug intake leading to an oscillating clinical response (Stocchi et al., 1994). Co-administration of levodopa with inhibitors of extracerebral dopa decarboxylase (IEDD) – such as carbidopa and benserazide – allows a marked reduction in levodopa dosage without compromising the therapeutic effect. Indeed, the IEDD diminish the optimum dose of levodopa by about 70 to 80%, decreasing the oscillating extent of its plasma concentrations. This kind of combination also reduces the time to onset of the therapeutic benefit due to an increase in the bioavailability of levodopa and to a decrease of the incidence and the severity of the side-effects (Pinder et al., 1976). However,

with awareness of a possible relationship between plasma concentrations, clinical effects of levodopa and development of fluctuations in the therapeutic effect, improvement of clinical efficacy may be achieved by the development of slow-release formulations. These preparations are characterized by a more sustained pharmacokinetic profile of the drug than those obtained with immediate-release dosage forms, making them more suitable for stabilizing the plasma levels of levodopa (Crevoisier et al., 1987; Grahnén et al., 1992). Moreover, as levodopa is characterized by a narrow absorption window in the upper part of the gastrointestinal tract, the development of a sustained-release dosage form with prolonged gastric residence time (GRT) would be the optimal delivery system for this kind of drug (Rouge et al., 1996). After oral administration, a gastroretentive dosage form would be retained in the stomach and would release the drug in a controlled and extended manner. This mode of administration would thus provide a continuous supply of the drug to its absorption site, yielding sustained and prolonged levodopa input to the systemic blood circulation (Hoffman et al., 1999).

In previous works, two concepts of sustained-release floating minitablets (FMT) were developed and evaluated *in vitro* (Goole et al., 2007, 2008a). These minitablets were composed of granulates made by melt granulation (Hamdani et al., 2002) and containing at least one active drug, a meltable lipidic binder and gas-generating agents. The first floating system developed contained Methocel[®] K15M as a swellable polymer both to trap the generated carbon dioxide and to sustain the release of the active drug (Goole et al., 2007). For the second floating system developed, Methocel[®] K15M was completely removed and a coating step was introduced in the manufacturing process in order to provide a coating layer capable of maintaining the generated carbon dioxide inside the dosage form for a prolonged period of time (Goole et al., 2008a).

The new floating minitablets, containing a combination of levodopa and carbidopa,

were investigated for research purposes in order to evaluate their potential for improving the performances of classical marketed product used in the treatment of Parkinson's disease.

The aim of the present investigation was to assess the pharmacokinetic profiles of levodopa and the associated IEDD after the administration of the commercial Hydrodynamically Balanced System (HBSTM) Prolopa[®] HBS 125, and to compare them with those following the administration of the new sustained-release FMT. Moreover, a pharmacoscintigraphic study was performed to evaluate the GRT of the sustained-release FMT and of the marketed Prolopa[®] HBS 125 floating capsule in fed condition. The use of non invasive technology such as γ -scintigraphy allows the investigation of gastric emptying. This external imaging procedure requires the formulations to be radiolabelled with gamma-emitting radioisotope (Kedzierewicz et al., 1999). Indium-111, a radioisotope with a relatively long half-life, was selected to visualize the floating forms in the stomach for a prolonged period of time.

2. Materials and methods

2.1. Minitablet formulations

Levodopa (Newsmart, Nantong, China) and carbidopa (Teva, Petah Tiqva, Israel) were used in the evaluated uncoated (Levo-Form 1) and coated (Levo-Form 2) FMT as the model drug and the IEDD, respectively. Glyceryl palmitostearate (Precirol[®] ATO 5 = Gelucire[®] 52/02) was used as a melttable binder (Gattefosse, Saint-Priest, France). Tartaric acid (Federa, Brussels, Belgium), sodium bicarbonate (Merck, Darmstadt, Germany) and calcium carbonate (Welphar, Brussels, Belgium) were employed as carbon dioxide-generating agents. Lactose 450 mesh (DMV Int., Veghel, The Netherlands) was used as an hydrophilic diluent. The uncoated FMT (Levo-Form 1) contained high viscosity grade HPMC - Methocel[®] K15M, used as a gel-forming polymer (Colorcon, Kent, England). The insoluble polymer used to make the gas-trapping membrane of the coated FMT (Levo-Form 2) was Eudragit[®] RL 30D (Rhöm Pharma, Darmstadt, Germany). Citroflex A2[®] (Acetyl triethylcitrate - ATEC), used as a plasticizer, was supplied by Reilly (Hautrage, Belgium). Talc with a mean particle size of approximately 10 µm (Aldrich chemical Co Ltd, Gillingham, England) and antifoam emulsion (silicone emulsion, Vel. S.A., Seneffe, Belgium) were used as received. The commercialized floating capsule Prolopa[®] HBS 125 (Roche, Brussels, Belgium), containing 100 mg of levodopa and 25 mg of benserazide, was used as a comparator.

Radioactive indium oxinate (¹¹¹In) solution (1 mCi/ml, i.e. 37 MBq/ml at the calibration date), obtained from Mallinckrodt (Petten, The Netherlands), was used for radiolabelling the floating forms. The elution of technetium-99m (^{99m}Tc) as sodium pertechnetate was obtained from a ⁹⁹Mo-^{99m}Tc generator for imaging the stomach. Amberlite[®] IR-120, a cation-exchange insoluble resin, was used as ¹¹¹In-binding carrier excipient (Sigma-Aldrich[®] Chemic GmbH, Munich, Germany).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of minitablets

2.2.1.1. Granulate manufacture

Granulates were made in a small vertical laboratory-scale high-shear mixer, Mi-Pro[®] (Pro-C-EpT, Zelzate, Belgium), equipped with a transparent bowl and a heating jacket (Hamdani et al., 2002). The granulate compositions are listed in Table 1.

All experiments were started at an impeller speed (IS) of 1800 rpm and a chopper speed (CS) of 130 rpm, while the temperature of the heating jacket was set at 60°C. In order to avoid any further product temperature increase, the IS was reduced to 600 rpm after the granule formation step, while the CS was increased to 1000 rpm to break any possible agglomerates. The massing time was kept constant at 5 min. The length of the whole granulate manufacturing process was around 20 min. At the end of the process, the granules were cooled at ambient temperature.

The mean particle size of granulates, represented by the equivalent volume diameter $D[4,3]$, should be around 150 μm to provide good flow properties (Scirocco 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

2.2.1.2. Minitablet preparation

Minitablets (MT) were prepared by direct compression. Granulates were fed manually into the die of an instrumented single-punch tableting machine (Korch, Germany) to produce MT using concave-faced multiple - (eight) - punches and dies, 3 mm in diameter each. The compression force, the weight and the hardness of the MT are summarized in Table 1. The hardness was measured with a hardness tester (Computest, Kreamer Gmbh, EL Elektronik, Darmstadt, Germany). The friability of the MT was $0.13 \pm 0.03\%$. This indicated that they were able to withstand the mechanical stress of the subsequent coating process.

2.2.1.3. Preparation of the coating dispersion

The aqueous dispersion used for the coating of the MT is given in Table 2. Talc was previously dispersed in water in the presence of an antifoam agent and mixed with the possible water-soluble additive using a T45 Ultra-Turrax[®] (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Germany). The dispersion containing Eudragit[®] RL30D requires the addition of 20% w/w (relative to film former content) of plasticizing agent. The plasticizer was added to the polymer aqueous dispersion under gentle stirring. All the components of the coating dispersion were then mixed under magnetic stirring for at least one hour before starting the coating process.

2.2.1.4. Preparation of coated MT

Minitablets were transferred into a fluidized bed coating apparatus Uni-Glatt[®] (Glatt GmbH, Binzen, Germany) equipped with a bottom-spray coating process in a Würster column and coated with the coating dispersions until the desired film weight was deposited. During the coating operation, the aqueous dispersion was stirred continuously to prevent sedimentation of insoluble particles. The conditions for layering were shown to be as follows: preheating temperature, $40 \pm 2^\circ\text{C}$; preheating time, 10 min; inlet and outlet temperatures, $40 \pm 2^\circ\text{C}$ and $35 \pm 2^\circ\text{C}$, respectively; flow rate, 6 g/min; pneumatic air pressure, 1 bar. After coating, the coated MT were further fluidized for 10 min and subsequently cured at 60°C for 8 h.

2.2.2. Study design

The study design was an open single-dose, three-treatment, three-period cross-over study with wash-out of at least 6 days between the three phases of the study. An equal number of subjects were randomly assigned to each of the three possible dosing sequences. All volunteers received the drug treatment as one capsule filled with 20 minitables containing

100 mg of levodopa and 25 mg of carbidopa (Levo-Form 1 and 2) or one Prolopa[®] HBS 125 floating capsule containing 100 mg of levodopa and 25 mg of benserazide, in fed condition (Table 3). Following administration, the volunteers were instructed to sit or remain standing for the duration of the study to avoid the possibility of posture affecting the gastric emptying of the floating forms (Stops et al., 2006). The three products were radiolabelled with up to 18.5 MBq of ¹¹¹In. Ten minutes before the first scintigraphic acquisition, the volunteers also received 111 MBq of ^{99m}Tc intravenously for gastric imaging. No pharmacological impact or side effect was observed for these radionuclides.

2.2.3. Volunteers

Ten healthy volunteers (four men and six women, 25 ± 5 years, Body Mass Index between 19 and 30 kg/m²) were included in the study on the basis of inclusion and exclusion criteria and medical examination. The volunteers were non-smokers and were free from clinically significant disorders. They also refrained from alcohol during the 3 weeks of the study, and from drugs having a systemic effect for at least 3 days before the study. Before starting the study, the nature of the clinical trial was explained and written consent was obtained from all volunteers. The study was conducted at the Erasme Hospital (Brussels, Belgium), in accordance with the principles stated in the Declaration of Helsinki, and approval was obtained from the Ethics Committee of Erasme Hospital (Ref.: P2007/086) and the Belgian Minister of Social Affairs and Public Health (Ref.: EudraCT No. 2007-000708-33).

2.2.4. Safety assessment

Each subject underwent a physical examination, routine clinical chemistry, haematology and urinalysis at the beginning and at the end of the study. No adverse events were noted for any dosage form in any subject.

2.2.5. The radiolabelling method

The radioactive ^{111}In solution, containing the required activity, was exactly calibrated using a radioisotope calibrator (Capintec, NJ, USA). A fixed amount (5% w/w relative to the granule content) of ion-binding carrier excipient was added to the radiopharmaceutical solution. The volume (3 ml) of the resultant suspension was adjusted to 2 ml by evaporation. The suspension was stirred for 5 min at 30 rpm and then allowed to stand until complete sedimentation (Labinco B.V., Breda, The Netherlands). The supernatant was thoroughly withdrawn to remove free radiolabel. The carrier excipient was then transferred to a watch-glass and desiccated to dryness in a stove (80°C, 10 min). The final activity dose of the radiolabelled carrier was determined by means of a probe counter (Ortec[®], AC Joure, The Netherlands) comparatively to an equivalent dose of known activity of the same radionuclide in solution (Timmermans et al., 1989). The distance between the probe and the sample was adjusted prior to measurement for optimal counting efficiency. The dosage forms to be labelled were extemporaneously prepared one by one as follows. The required exact weight amount of the radiolabelled carrier excipient, obtained according to the described technique, was added as a dry residue to the total amount of formulation powder for the three dosage forms. The granules and the radiolabelled resin were then mixed together in a rotational stirring apparatus (Labinco B.V., Breda, The Netherlands) for 5 min at 30 rpm before the compression step. The minitablets were filled into white-coloured hard HPMC capsules 0 (Quali-V[®], Qualicaps Europe, Madrid, Spain) to reach 100 mg and 25 mg of levodopa and carbidopa in each, respectively. The blend corresponding to the HBS formulation was refilled into its initial capsule. For each period, the dosage forms were prepared the day before the study.

2.2.6. Assessment of radiolabelled dosage forms

Before initiation of the clinical phase study, *in vitro* validation experiments were conducted to demonstrate that alteration of the dissolution and floating properties of the evaluated dosage forms did not occur during the labelling process, and that the floating forms were also able to sustain the release of the radioactivity. For each dosage form, the dissolution profiles of the drugs and the floating properties of the dosage forms were determined and compared against those obtained from the dosage forms containing the radiolabelled resin.

The dissolution studies were performed on a Distek 2100C USP 29 dissolution apparatus (Distek Inc., North Brunswick, NJ, USA), Type II (paddle method). The rotational speed employed was 50 rpm. Release testing was carried out in 900 ml of phosphate buffer solutions (0.05 M) containing 0.05% (w/v) Polysorbate 20 at pH 3.0 to simulate gastric pH in fed condition. The temperature of the dissolution media was maintained at $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Dissolutions were carried out on an equivalent of 100 mg of levodopa and 25 mg of IEDD. The percentages of drug release were measured by the validated HPLC method described below at preselected time intervals and averaged ($n=5$). The HPLC system consisted of a High Performance Liquid Chromatography system (HP 1090 series II, Agilent Technologies, Brussels, Belgium), equipped with a binary pump, an autosampler, and a diode-array detector (DAD) set at 282, 280 and 220 nm for levodopa, carbidopa and benserazide, respectively. The separation system was a 150 x 4.6 mm (5 μm particle size) reversed-phase C18 column Luna[®] (Phenomenex, CA, USA). Samples of 20 μl volume were injected. The mobile phase was composed of a KH_2PO_4 solution (0.035 M) adjusted to pH 2.0 with H_3PO_4 and 100% acetonitril HPLC grade in a ratio of 98:2 (v/v), respectively. The solutions were mixed and passed through a 0.2 μm filter in order to be degassed prior to use. The flow rate was 0.8 ml/min. The analyses were performed at 30°C . The percentages of radioactivity released were

determined by gamma counting using a Cobra auto gamma counter 5003 (Packard bioscience, Minnesota, USA).

To determine the buoyancy capabilities of the FMT and Prolopa[®] HBS 125, a resultant-weight apparatus designed for dynamic measurement of the total force acting vertically on an immersed object was also used (Timmermans et al., 1990). By convention, a positive RW signifies that the object is able to float, whereas a negative RW means that the object sinks. The floating forms were placed in a specially designed basket sample holder, which was immersed in 1200 ml of preheated 0.1 N HCl solution containing 0.05% (w/v) Polysorbate 20 (pH 1.2, 37°C). The RW was measured every minute for 13 hours.

2.2.7. Gamma scintigraphy analysis

In vivo evaluation of the gastric retention of the evaluated floating dosage forms was achieved by γ -scintigraphic imaging (Griffiths et al., 1966). ¹¹¹In was used as a pure γ -emitter for indirect radiolabelling of the oral dosage forms. The γ -ray of ¹¹¹In had sufficient energy (171 and 245 keV) to penetrate body tissues, and when it reached the γ -camera detector, it was absorbed and converted into light photons, thus allowing γ -camera imaging (Timmermans et al., 1989). The half-life of ¹¹¹In is 67.4 hours, which is long enough for handling and imaging a gastro-retentive sustained-release oral dosage form. Moreover, due to the intra-venous injection and despite its short half-life (6 h) (Wilding et al., 2001), the supply of ^{99m}Tc was sufficiently sustained to visualise the gastric wall during the whole period of the study.

The γ -camera used to make scintigraphic acquisitions was a DHD double headed camera (Sopha Medical, CT, USA) that was fitted with a 40 cm parallel hole collimator designed to detect both nuclides (¹¹¹In and ^{99m}Tc) simultaneously. The acquisition time was fixed at 120 seconds. The camera was connected to an image computer processing system

(Sopha Medical S2000, CT, USA) for data acquisition and analysis, image treatment and representation. The region of interest was drawn around the stomach and a background count was recorded for each camera head to avoid a wrong visualisation of the dosage forms. Moreover, radiation from ingested isotopes is scattered or absorbed by intervening tissues and bone before reaching the γ -camera, causing the radiation registered to be attenuated (Tothill et al., 1978). Therefore, both anterior and posterior images were taken at each time interval as a decrease of the radiation from the stomach could indicate the gastric emptying of the floating form. However, as the entire radioactivity was located in a small area of the upper part of the stomach, the saturation of the radioactive count made a quantitative analysis impossible.

2.2.8. Pharmacokinetic analysis

Venous blood samples (7 ml) were collected at pre-dose and at 30 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 and 12 h post-dose (Table 3) in order to quantify plasma levels of levodopa, carbidopa and benserazide. After centrifugation (3000 rpm, 10 min, 4°C), the plasma samples were decanted and divided into two approximately equal portions of not less than 2 ml per tube (aliquot) and rapidly stored at -80°C, in upright position. Each aliquot tube contained 0.1 ml of metabisulfite solution as anti-oxidant.

The extraction of levodopa, carbidopa and benserazide was performed by passing the plasma samples through an anionic exchange cartridge SPE HAX (Biotage, Uppsala, Sweden) placed in a Gilson XL4 system (Gilson, Middeltown, USA). The cartridge was first conditioned with 1 ml of methanol and 1ml of diammonium hydrogenophosphate buffer (20 mM, pH 10), respectively. Then, 400 μ l of sample (205 μ l of plasma + 5 μ l solution of hydrazine 20% w/w + 21 μ l of internal standard + 168 μ l of diammonium hydrogenophosphate buffer 20 mM, pH 10) were loaded, washed with 0.8 ml and then eluted with 0.8 ml of formic acid 3% (v/v). 50 μ l of ascorbic acid 2.0% (w/v) was finally added to

the eluted solution. An aliquot was injected into the validated LC/MS/MS method described below (Belveal et al., 2007).

An HPLC system (HP 1100 series, Agilent Technologies, CA, USA), coupled to an API365 quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canada), was used to measure levodopa, carbidopa and benserazide in plasma samples. The separation system was a 150 x 2 mm Polar-RP Synergi column (Phenomenex, CA, USA). The mobile phase was composed of methanol and a 0.2% formic acid solution in a ratio of 20:80, respectively. The flow rate was 150 μ l/min. The analyses were performed at 30°C. Samples of 50 μ l were injected. The desolvation temperature was kept at 400°C. The limit of quantification of the method was 10 ng/ml and 2 ng/ml for levodopa and each IEDD, respectively.

The calculation of pharmacokinetic parameters was as follows.

Maximal plasma concentration (C_{\max}) and time to maximal plasma concentration (T_{\max}) were taken directly from the plasma concentration-time profile. The area under curve (AUC) was calculated by the trapezoidal rule from measured data points from the time of administration until the time of the last quantifiable concentration.

2.2.9. Statistical evaluation

As recommended in the FDA's Guidances for Industry, the similarity factor f_2 was used as a determination for assessing the similarity of dissolution profiles (FDA, 1997; Shah et al., 1998). The compared dissolution profiles were obtained under the same test conditions and their dissolution time points were the same, e.g. for controlled release products, they were 1, 3, 5 and 8 hours. As indicated by Shah et al. 1998, the similarity factor f_2 value has to be higher than 50 in order to assess the similarity between two dissolution profiles.

The repeated-measures ANOVA test was used to compare the pharmacokinetic data obtained with the three formulations. The Student's test was used to compare the gastric retention time of the tested products. For all tests, the significance level was set at $p = 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Assessment of labelled dosage forms

The sustained-release floating dosage forms were labelled with a γ -emitting radionuclide (^{111}In) by the incorporation of 5% (w/w) of labelled ion-exchange resin. First of all, it was demonstrated that the presence of resin did not alter the sustained-release and floating properties of the floating forms and that the release of levodopa - the only drug incorporated in the three evaluated dosage forms - was correlated with the release of the radiolabel.

A sustained release of levodopa and of the IEDD occurred immediately after immersion with no burst effect, regardless of the floating form tested (data not shown). The entire dose of levodopa and carbidopa were released after 12 and 24 hours from Levo-Form 1 and Levo-Form 2, respectively. Levodopa and carbidopa being characterized by a similar solubility in an acidic media (Pinder et al., 1976), the dissolution profiles obtained from Levo-Form 1 ($f_2=87$) and Levo-Form 2 ($f_2=64$) remained statistically similar until the complete release of these drugs. In contrast, benserazide was released faster than levodopa from Prolopa[®] HBS 125 (entire dose released after 12h vs. 24h). Indeed, after 12 and 24 hours, the dissolution profiles of benserazide and levodopa were not statistically similar ($f_2=46$). The standard deviations noticed with Prolopa[®] HBS 125 increased, both for levodopa and benserazide, after 5 hours due to the fragmentation of the jelly mass.

The incorporation of the ion-exchange resin in the formulations did not alter the dissolution profiles of the drugs (Table 4), regardless of the floating dosage form evaluated. The sustained-release properties were preserved and the drugs were released within the same periods of time as those obtained when the floating forms were free of resin. Moreover, the floating properties of the FMT and Prolopa[®] HBS 125 were also preserved (Fig. 1). Levo-Form 1 and Levo-Form 2 floated within 10 min and remained buoyant for more than 13

hours, regardless of whether resin was incorporated. As observed for formulations without resin, the HBS capsule presented no floating lag time, but its floating strength decreased after 1 hour as a result of the development of its hydrodynamic equilibrium (Goole et al., 2007). Regardless of whether resin was incorporated, the maximal resultant-weight values remained similar and were about 80, 75 and 45 mg/100mg for the Levo-Form 1, Levo-Form 2 and Prolopa[®] HBS 125, respectively.

The dissolution profile of levodopa and the release profile of the radioactivity were then compared for each formulation (Fig. 2). The dissolution properties were not similar from one floating dosage form to another. Indeed, the underlying mechanisms of drug (or radioactivity) release from water-swallowable matrix systems are mainly diffusion and erosion (Kiil and Dam-Johansen, 2003), whereas diffusion is the only important mechanism characterizing the release of a drug from coated systems (Siepmann et al., 1999). As ¹¹¹In is exchanged with protons at the surface of the ion-exchange resin, the release of the radioactivity was not similar for the three formulations. The radioactivity was mainly released after erosion of the matrix from Levo-Form 1 and Prolopa[®] HBS 125, according to the corresponding area of contact, which depends on the shape of the dosage form. From Levo-Form 2, the radioactivity was released after the diffusion of the aqueous media inside the dosage form. However, the dissolution profile of levodopa remained statistically similar to the release profile of the radioactivity for at least 8 hours. Indeed, the similarity factors obtained with Levo-Form 1, Levo-Form 2 and Prolopa[®] HBS 125 were 57, 73 and 59 respectively. So, the radioactivity remained within the device long enough for the position of the floating forms *in vivo* to be observed.

3.2. *In vivo* study

The combination of scintigraphy with pharmacokinetic studies has now become an important means of providing information about the GRT of floating dosage forms and subsequent drug absorption (Wilding et al., 2001). The GRT was evaluated as the time of the image preceding the first image that showed clear evidence of the total gastric emptying of the pharmaceutical dosage form (Moës, 1993). As a radiolabelled resin was incorporated inside the floating forms, it was possible to follow their movement in the stomach using a gamma camera. Ten volunteers took part to the present study and the results obtained in all subjects showed almost the same trend for the movement of the radiolabelled FMT - Levo-Form 1 and Levo-Form 2 - in the stomach. The movement of Prolopa[®] HBS 125 in the stomach appeared to be specific. Typical acquisitions obtained from volunteers 1, after administration of one capsule containing Levo-Form 1, are shown in Fig. 3.

At $t=0$ min, immediately after ingestion, the capsule containing the FMT was located on the surface of the gastric fluid. At that time, as all the minitablets were confined in the capsule, the radioactivity could be visualised as a single hotspot (Fig. 3a). At $t=30$ min, the capsule opened and the FMT began to be dispersed at the bottom of the stomach (Fig. 3b). At $t=60$ min, the FMT were localized at the upper part of the stomach (Fig. 3c). The strength of the floating force was sufficient for the FMT to move upwards through the ingested meal to its surface, rather than be pushed down by the weight of food. Moreover, the floating lag time of the FMT did not increase with the presence of food. Indeed, as observed *in vitro*, the FMT floated within less than 30 min after dispersion (Goole and al., 2007, 2008b). At $t=150$ min, two distinct hotspots could be visualized. One group of FMT began to sink to the gastric *antrum*, while the main mass still remained buoyant at the upper part of the stomach (Fig. 3d). At $t= 210$ min, the FMT can be seen to start emptying into the small intestine, since a hotspot

could be visualized out of the region of interest (Fig. 3e). All the FMT were emptied from the stomach after 300 min (Fig. 3f).

When Levo-Form 2 was administrated, a dispersion of the radioactivity was sometimes visualized throughout the stomach at different acquisition times (Fig. 4a). When cracks appear on the surface of the film, the integrity of the coating is not maintained and the core of the minitablets is thus dispersed. This phenomenon was already observed *in vitro* (Goole et al., 2008a).

As observed *in vitro*, the Prolopa[®] HBS 125 presented no floating lag time due to its very low density (Goole et al, 2007). It floated on the surface of the gastric fluid immediately after ingestion. A small hotspot of radioactivity, similar to that observed in Fig. 3a, could be visualized. However, at the acquisition time preceding the gastric emptying, the size of the hotspot increased, probably due to fragmentation of the jelly mass. A pharmacoscintigraphic study conducted by Seth and Tossounian on a HBS system containing Chlordiazepoxide has already shown an intra-gastric disintegration of the jelly mass 4 hours following the ingestion of the dosage form (Seth and Tossounian, 1984).

Table 5 presents complete data on the three dosage forms, showing the GRT of the formulations, as well as the mean AUC, C_{max} and T_{max} of levodopa, carbidopa and benserazide.

The three formulations offered almost the same mean GRT, which was 228 ± 121 min, 294 ± 121 min and 261 ± 93 min for Prolopa[®] HBS 125, Levo-Form 1 and Levo-Form 2, respectively. The GRT observed for Prolopa[®] HBS 125 in this study corroborates the scintigraphic results described in the literature (Seth and Tossounian, 1984). It can be noticed that men seem to present a lower GRT of the floating forms than women. This is a general observation, already described in the literature for every oral dosage forms (Moës, 1993). The T_{max} of levodopa, carbidopa and benserazide were also similar from one system to another,

regardless of gender. The mean T_{max} value of levodopa obtained after administration of the three floating forms was higher than the one obtained after a single administration of a conventional slow-release formulation, regardless of the incorporated amount of levodopa (Cedarbaum et al., 1989; Gasser et al., 1998). Due to the high variability and to the similarity of the GRT values, no statistical correlation could be done between the GRT of the dosage forms and the T_{max} of the drugs.

Figure 5a shows the mean plasma levels of levodopa, the only drug incorporated in the three dosage forms, obtained from Prolopa[®] HBS 125, Levo-Form 1 and Levo-Form 2 as a function of time. There was no rapid initial absorption phase and, instead, a gradual build up in the absorption profile occurred. Unfortunately, due to the large inter-subject variability and the small number of subjects, the AUC, C_{max} or T_{max} values obtained for levodopa did not show a significant difference between the three evaluated floating forms ($p > 0.05$). However, the plasma concentration-time profile obtained for Prolopa[®] HBS 125 and Levo-Form 2 were quite similar. In both cases, the plasma level of levodopa sharply increased after 3 hours to reach a mean C_{max} value of 459 and 394 ng/ml after 5 hours for Prolopa[®] HBS 125 and Levo-Form 2, respectively. This phenomenon could be explained by the intra-gastric disintegration of the dosage forms observed by scintigraphy. The small agglomerates, created after disintegration, offered a higher surface of contact between the solid form and the gastric fluid, increasing the dissolution rate of the drug and its subsequent absorption. In comparison, the mean C_{max} value following single administration of an immediate-release formulation containing 100 mg levodopa to 10 volunteers reached 750 ng/ml in 2 hours (Pinder et al., 1976). Moreover, Prolopa[®] HBS 125 and Levo-Form 2 presented a similar mean AUC that was 1252 and 1117 ng.h/ml, respectively. In contrast, the plasma concentration-time profile of levodopa following the administration of Levo-Form 1 was more evenly distributed than those obtained following the administration of Prolopa[®] HBS 125 and Levo-Form 2,

decreasing the possibility of pulsatile stimulation of dopamine receptors. The mean AUC and the mean C_{max} values decreased compared to those observed for Prolopa[®] HBS 125 and Levo-Form 2 and were 884 ng.h/ml and 246 ng/ml, respectively. As no disintegration occurred with Levo-Form 1, the release rate did not increase. If the complete release of levodopa did not occur before the FMT had passed the absorption window, the dose available for absorption could be reduced, decreasing the bioavailability of the drug (C_{max} and AUC). So, in the future, it could be useful to decrease the amount of swelling agent in order to accelerate the release of levodopa or to increase the level of gas-generating agents in order to improve the floating strength which could increase the GRT of the FMT. One or more minitablets providing an immediate release of levodopa could be also associated to the sustained-release FMT in the same capsule in order to increase the plasma levels of levodopa as fast as possible after ingestion.

Even if Levo-Form 1 offered the lowest mean AUC value for levodopa, this floating form provided the lowest variations between men and women in term of AUC (Fig. 6a, 6b) and C_{max} values for both levodopa and carbidopa (Table 5). The absence of disintegration observed with Levo-Form 1 showed a stronger resistance to the more important contractile activity of the stomach observed in men than in women (Kamba et al., 2000). This allows a lower variability in the drug release and in its subsequent absorption between men and women. As Parkinson's disease affects both men and women without significant difference (Sharstry, 2001), a gastroretentive sustained-release dosage form, capable of providing a similar plasma concentration-time profile in both genders, could result in a more reproducible therapeutic effect. Additionally, Levo-Form 1 presented the lowest total inter-subject variability for AUC and C_{max} for levodopa and carbidopa.

The same amount of IEDD having been administrated (25 mg), the mean AUC, C_{max} and T_{max} values obtained for benserazide (Prolopa[®] HBS 125) were lower than those obtained

for carbidopa (Levo-Form 1 and 2) (Fig. 5b). For instance, the AUC of benserazide was more than 2 times lower than that obtained with carbidopa, for both Levo-Form 1 and Levo-Form 2 (Table 5). An incomplete absorption occurred with benserazide due to rapid oxidation to quinine-like molecules at the pH of intestinal fluid (Pinder et al., 1976). Moreover, the AUC value of benserazide seems to be very dependant on gender as it reached 55 ng.h/ml for women and fell down to 6 ng.h/ml for men (Fig. 6b). So, carbidopa seems to be the most effective IEDD for the treatment of Parkinson's disease in association with levodopa. However, this study did not allow the evaluation of the therapeutic efficacy obtained with a combination of levodopa and carbidopa rather than with a combination of levodopa and benserazide.

4. Conclusion

In conclusion, this study has shown that the new sustained-release FMT were able to float on the surface of gastric fluid for more than 4 hours. They also provided a sustained pharmacokinetic profile of levodopa and carbidopa. The coated FMT (Levo-Form 2) provided values of levodopa for AUC and C_{max} that were almost similar to those of Prolopa[®] HBS 125, but benserazide offered a lower bioavailability, which seems to be very dependent on gender, than carbidopa. Even if the lowest AUC value of levodopa was obtained following the ingestion of the uncoated FMT (Levo-Form 1), this floating form did not show intragastric disintegration and, so, offered the lowest variability. Levo-Form 1 also presented the most evenly distribution of the plasma level values of levodopa, decreasing a possible pulsatile stimulation of dopamine receptors. Despite these encouraging results, no significant statistical difference has been found in the GRT, AUC, C_{max} and T_{max} values obtained from the FMT and Prolopa[®] HBS 125. In the near future, in order to increase the AUC value of levodopa obtained after the ingestion of Levo-From 1, it could be useful to decrease the amount of

swelling agent for accelerating the release of levodopa or to increase the level of gas-generating agents in order to improve the floating capabilities which could increase the GRT of the FMT. An association of sustained-release and immediate-release formulation could be also investigate. Moreover, other pharmacokinetic studies should be conducted on a larger number of subjects.

Figure legends

Fig. 1. Resultant-weight profiles obtained from Levo-Form 1 (○) without and (●) with resin; Levo-Form 2 (□) without and (■) with resin; Prolopa[®] HBS 125 (Δ) without and (▲) with resin (n=3).

Fig. 2. Dissolution profiles of levodopa obtained from (○) Levo-Form 1, (□) Levo-Form 2, (Δ) Prolopa[®] HBS 125, and the ¹¹¹In release profiles obtained from (●) Levo-Form 1, (■) Levo-Form 2, (▲) Prolopa[®] HBS 125 (n=5).

Fig. 3. Typical scintigraphic images obtained from volunteers 1 after administration of one capsule containing Levo-Form 1 showing the behaviour of the floating minitablets in fed stomach. Panels A to F demonstrate the radiolabelled Levo-Form 1 after oral administration and at 30, 60, 150, 210 and 300 min, respectively.

Fig. 4. Scintigraphic images, obtained from volunteers 3, showing the dispersion of the radioactivity throughout the stomach after administration of (a) Levo-Form 2 (t = 180 min) and (b) Prolopa[®] HBS 125 (t = 210 min).

Fig. 5. Mean plasma levels of (a) levodopa following administration of (●) Prolopa[®] HBS 125, (□) Levo-Form 1 and (▲) Levo-Form 2 and (b) IEDD - (●) benserazide, (□) carbidopa Levo-Form 1 and (▲) carbidopa Levo-Form 2 (n=10).

Fig. 6. Comparative mean AUC of (a) levodopa and (b) IEDD form Prolopa[®] HBS 125, Levo-Form 1 and Levo-Form 2.

Figures

Figure 1:

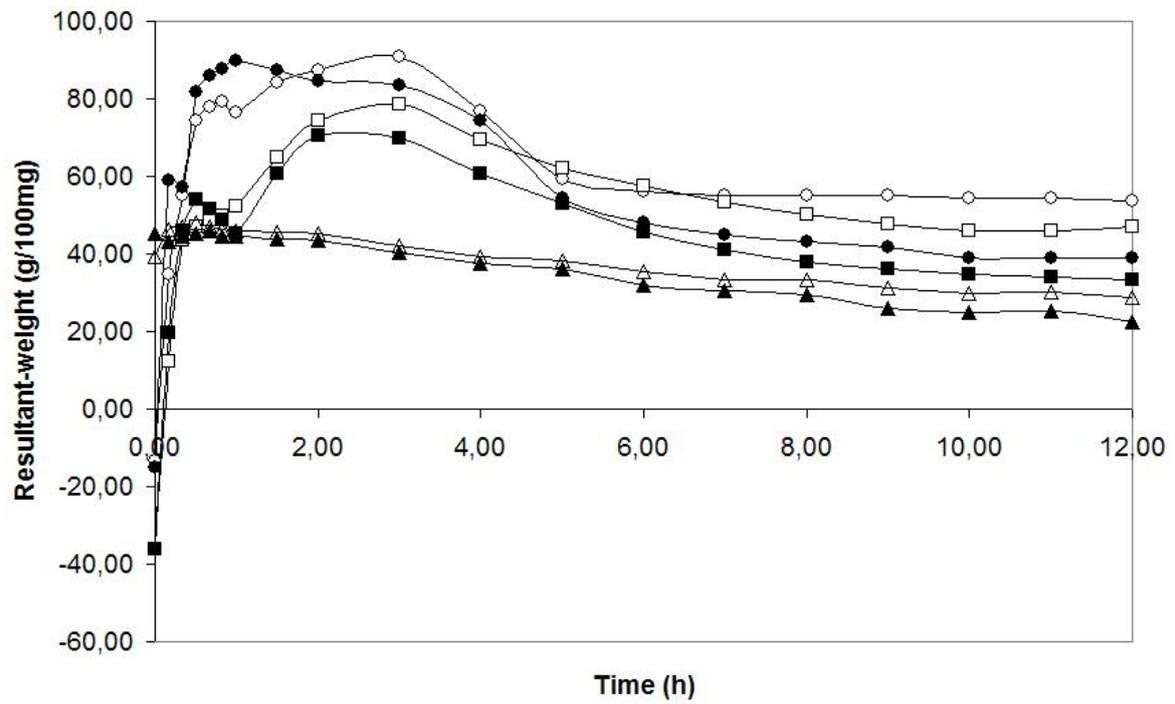


Figure 2:

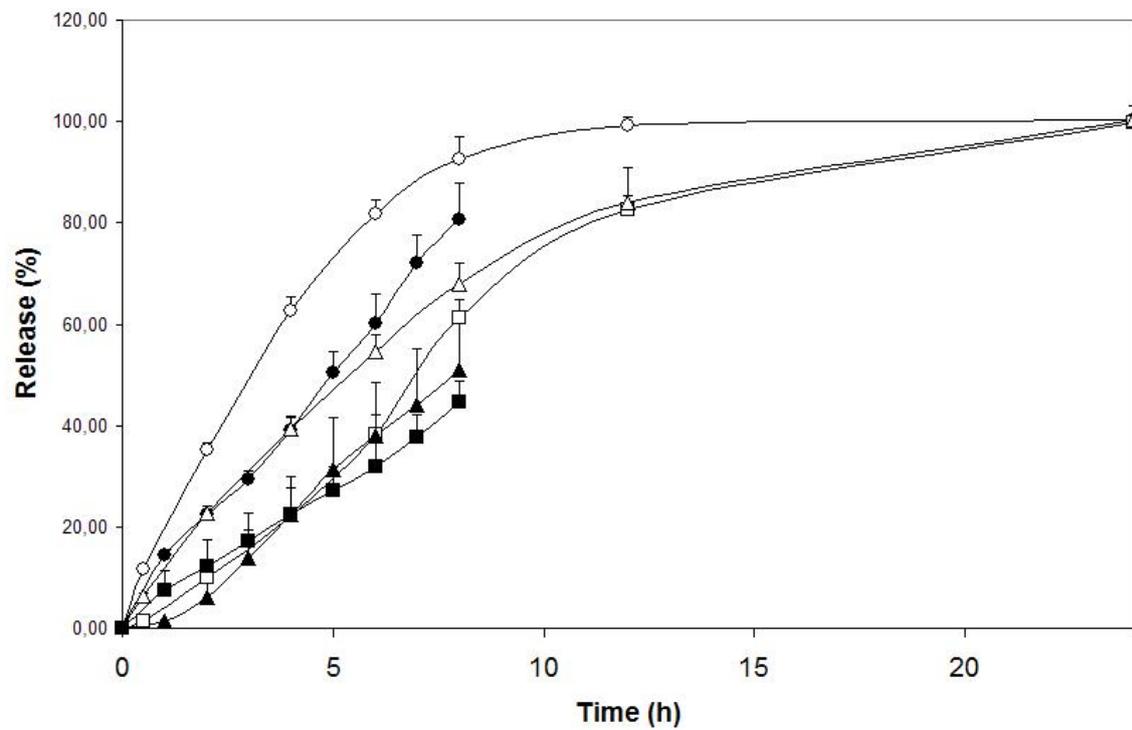


Figure 3:

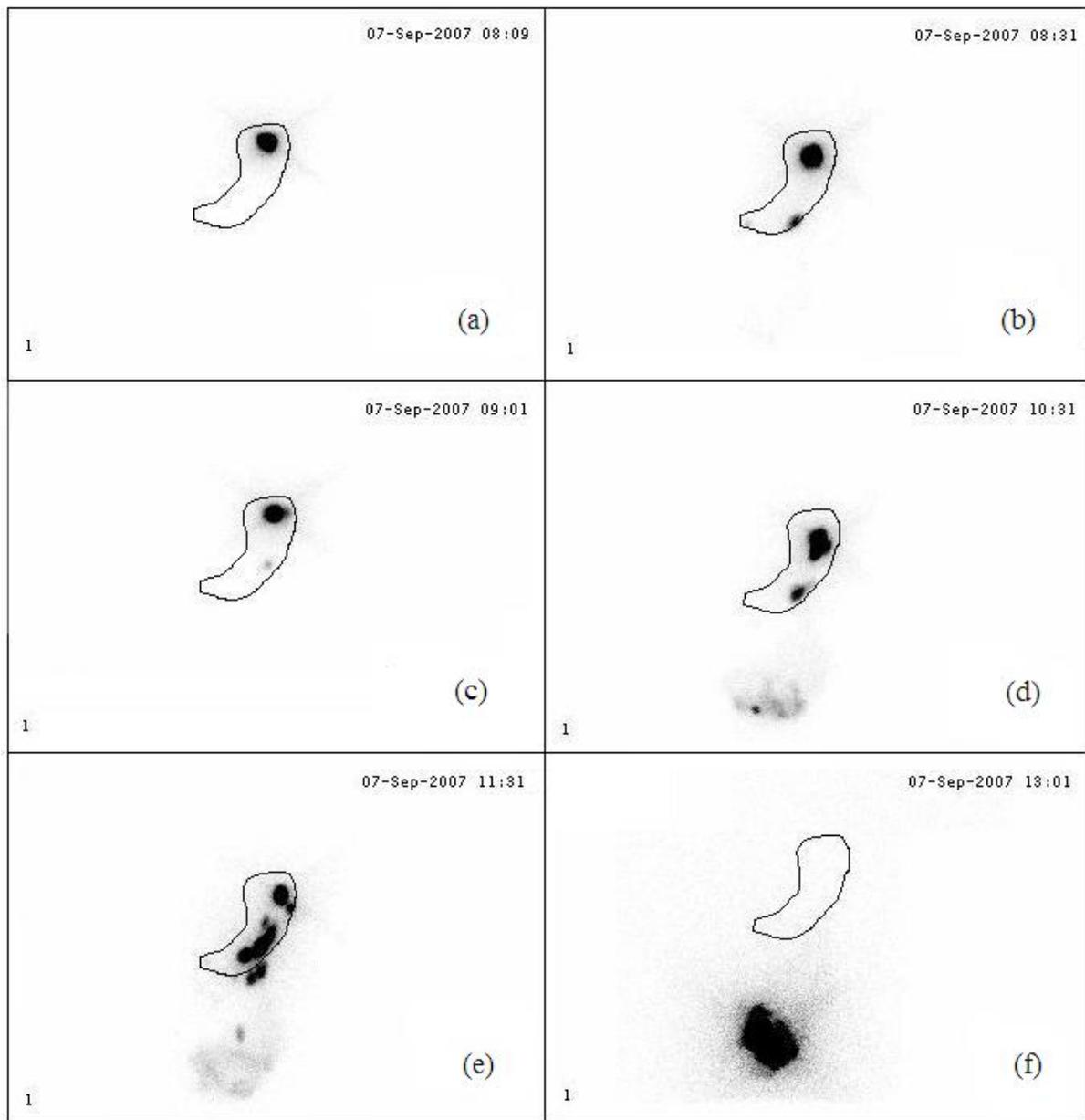


Figure 4:

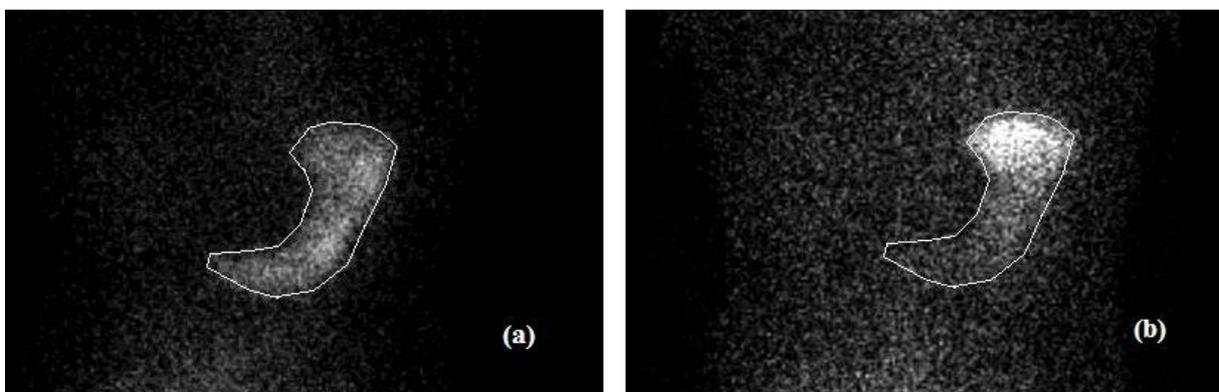
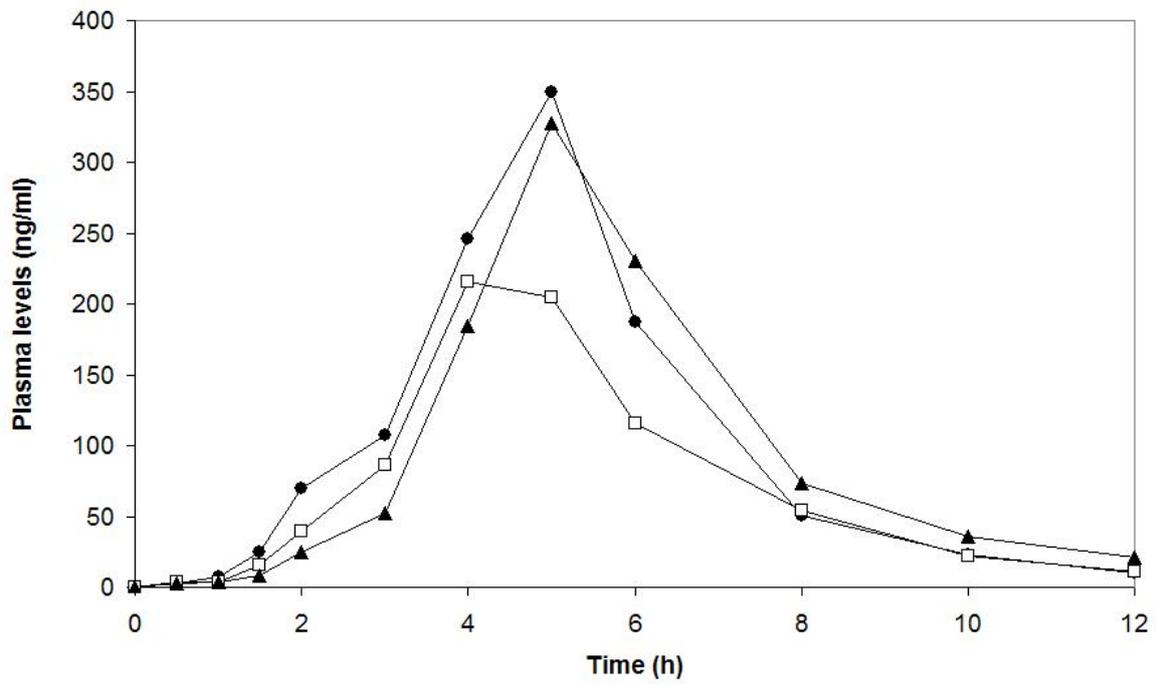


Figure 5:

(a)



(b)

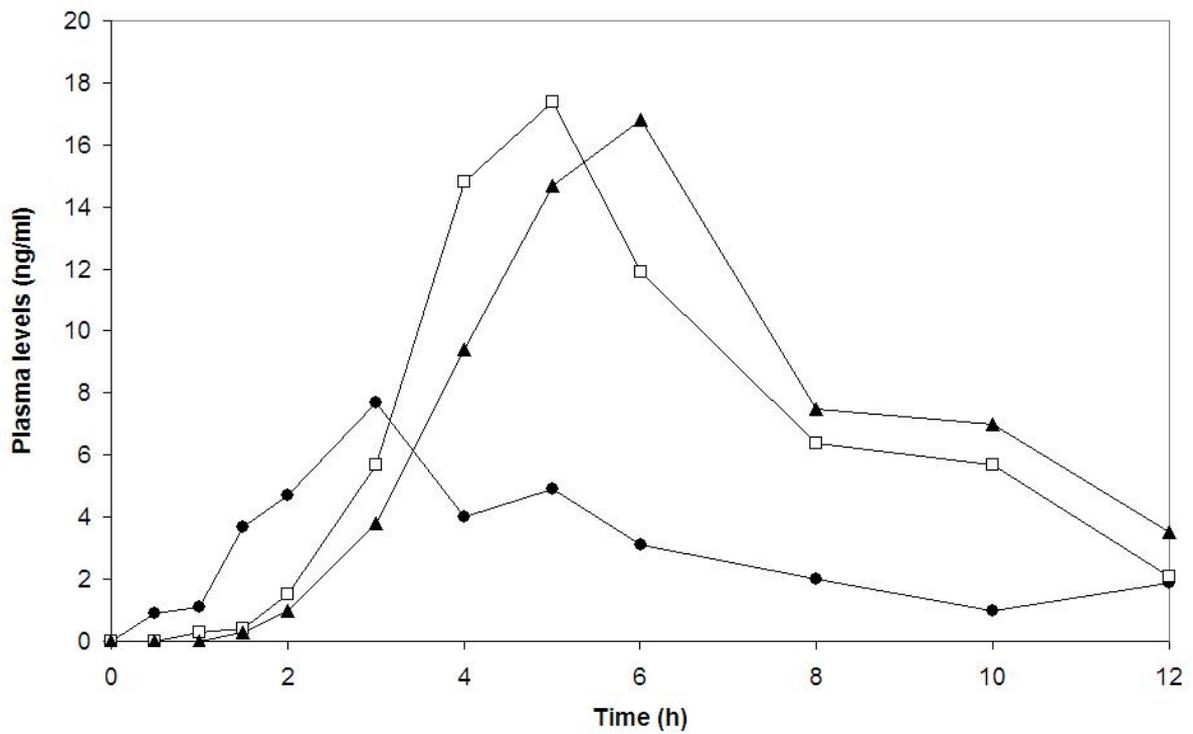
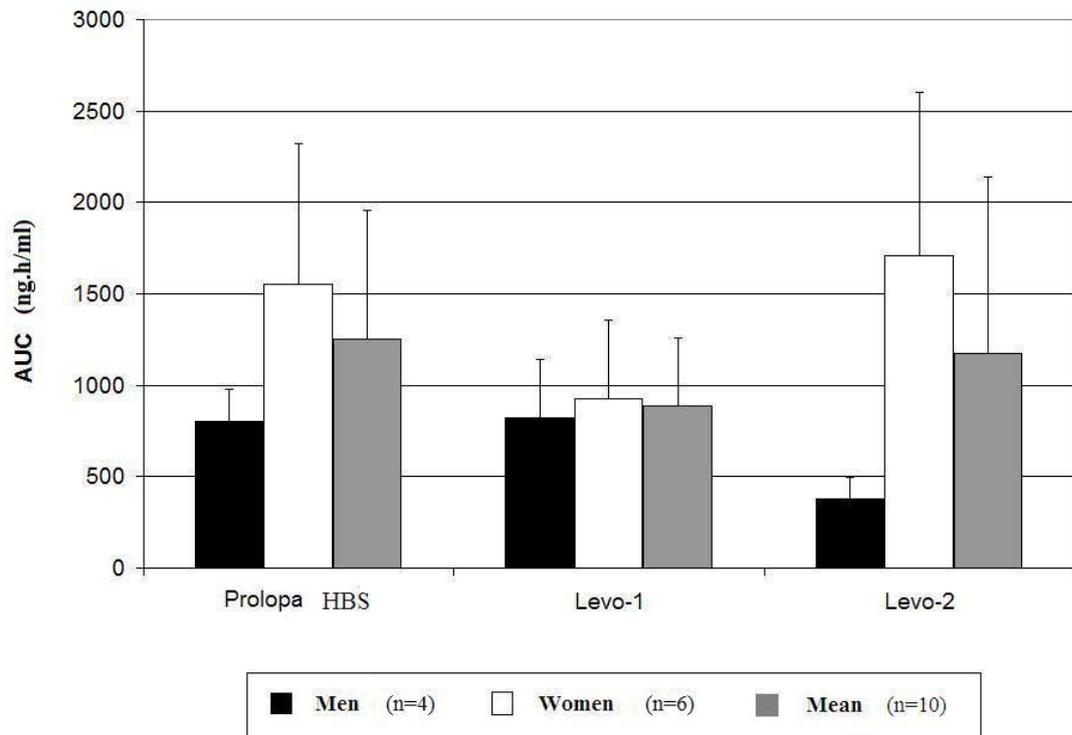
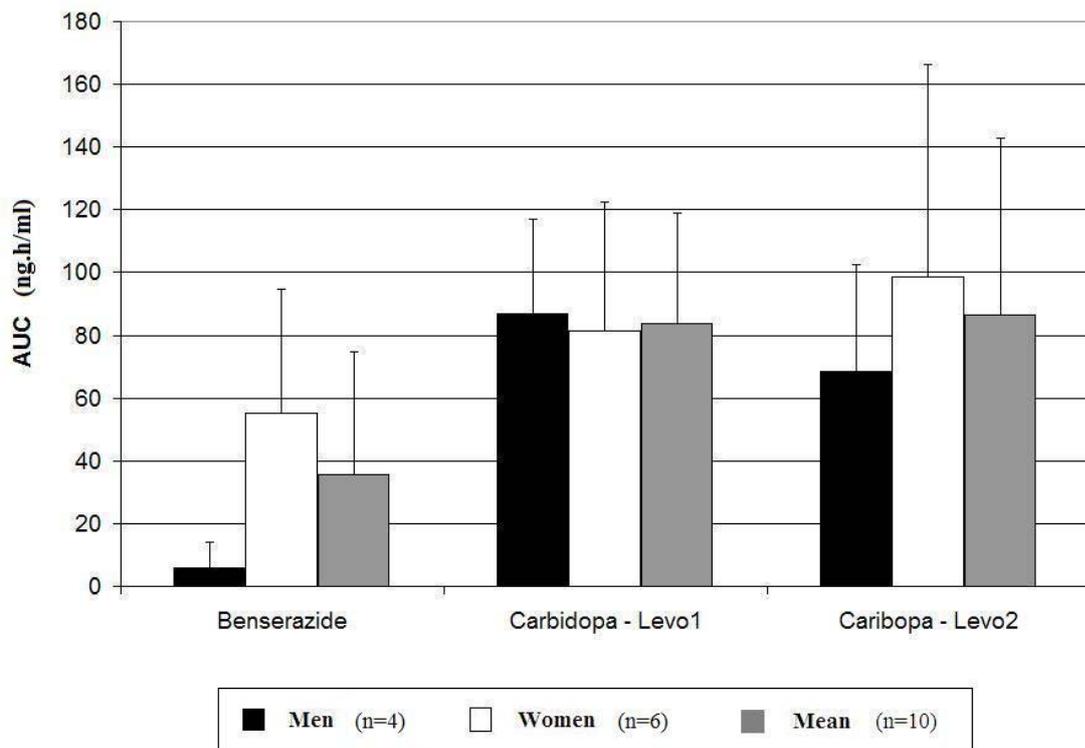


Figure 6:

(a)



(b)



Tables

Table 1: Compositions of the investigated granules (all quantities are given as percentages w/w) and corresponding minitablet properties.

	Uncoated FMT	Coated FMT
Levodopa	25.0	25.0
Carbidopa	6.25	6.25
Precirol [®] ATO 5	12.0	12.0
Methocel [®] K15M	25.0	-
CaCO ₃	10.0	10.0
NaHCO ₃	4.0	4.0
Tartaric acid	3.0	15.0
Lactose 450 mesh	14.75	27.75
Diameter (mm)	3	
Weight (mg)	20	
Compression force (N)	50-100	
Hardness (N) (n=10)	5 ± 1	

Table 2: Formulation used for the coating of the coated FMT

Formulation	F1
Eudragit [®] RL30D (g) (dry basis)	200
A TEC (g)	40
Talc (g)	50
Lactose (g)	20
Antifoam (g)	2
Water (g)	842
Solid content (% w/w)	25.6
Coating level (% w/w)	20

Table 3: Time schedule and feeding regimens used throughout the in vivo study.

Sample n°	Theoretical time (h:min)	Remarks	Blood sample	Scintigraphic imaging
P0	- 01:00	Pre-dose sample	Y	
	- 00:30	<u>Standardized breakfast (167 Kcal)</u> 200 ml of orange juice 3 slices of bread 10 g of margarine 20 g of jam 50 g of low fat white cheese		
	- 00:10	111 MBq of ^{99m} Tc by intra-venous		
	00:00	Administration of one capsule of reference or dosage forms with 200 ml of tap water		Y
P1	00:30		Y	Y
P2	01:00		Y	Y
P3	01:30		Y	Y
P4	02:00	<u>Standardized snack (230 Kcal)</u> 75 g of apple pie 150 ml of coffee or tea + 200 ml of tap water	Y	Y
	02:30			Y
P5	03:00		Y	Y
	03:30			Y
P6	04:00		Y	Y
	04:30	<u>Standardized lunch (499 Kcal)</u> 200 ml of green soup 150 g of roasted chicken 100 g of potatoes cooked in water 200 ml of mineral water		Y
P7	05:00		Y	Y
	05:30			Y
P8	06:00	200 ml of tap water	Y	Y
	06:30			Y
	07:00			Y
	07:30			Y
P9	08:00	200 ml of tap water	Y	Y
	08:30	<u>Standardized snack (230 Kcal)</u> 75 g of apple pie 150 ml of coffee or tea		
P10	10:00		Y	
	10:30	<u>Standardized dinner (718 Kcal)</u> 400 g of Tagliatelli ham cheese 55 g of bread stick 10 g of butter 120 g of banana 200 ml of mineral water		
P11	12:00		Y	

Table 4: Similarity factors from dissolution profiles of levodopa, carbidopa and benserazide, obtained with the three formulations - Levo-Form 1 (uncoated), Levo-Form 2 (coated) and Prolopa[®] HBS 125 - with and without ion-exchange resin.

	Levodopa	Carbidopa	Benserazide
Uncoated	98	90	-
Coated	76	76	-
Prolopa [®] HBS	96	-	80,6

Table 5: Gastric residence time of the formulations with AUC, C_{max} and T_{max} (mean±S.D.) of levodopa, carbidopa and benserazide.

		Prolopa [®] HBS	Levo-Form 1	Levo-Form 2
GRT (min)	Women (n=6)	245 ± 58	345 ± 131	300 ± 104
	Men (n=4)	203 ± 57	218 ± 45	203 ± 15
	Mean (n=10)	228 ± 59	294 ± 121	261 ± 93
Levodopa				
AUC (ng.h/ml)	Women	1554 ± 771	926 ± 428	1709 ± 897
	Men	799 ± 179	821 ± 319	379 ± 120
	Mean	1252 ± 702	884 ± 373	1177 ± 961
C _{max} (ng/ml)	Women	594 ± 339	248 ± 107	577 ± 302
	Men	258 ± 47	243 ± 72	119 ± 43
	Mean	459 ± 308	246 ± 90	394 ± 327
T _{max} (min)	Women	270 ± 33	290 ± 25	280 ± 31
	Men	240 ± 85	210 ± 35	240 ± 85
	Mean	258 ± 57	258 ± 49	264 ± 58
Benserazide				
		Prolopa [®] HBS	Carbidopa Levo-Form 1	Carbidopa Levo-Form 2
AUC (ng.h/ml)	Women	55 ± 39	81 ± 41	99 ± 68
	Men	6 ± 8	87 ± 30	68 ± 34
	Mean	36 ± 39	84 ± 35	87 ± 56
C _{max} (ng/ml)	Women	15 ± 9	21 ± 10	24 ± 15
	Men	4 ± 3	19 ± 3	22 ± 13
	Mean	11 ± 9	20 ± 8	23 ± 14
T _{max} (min)	Women	210 ± 99	310 ± 25	315 ± 59
	Men	128 ± 126	330 ± 180	330 ± 199
	Mean	177 ± 112	318 ± 106	321 ± 124

References

Belveal D., Bugge C.J., Garcia D.B., Keller K., Sowell K., Sullivan M.P., 2007, Determination of levodopa and carbidopa in human plasma by solid-phase extraction and LC/MS/MS, AAPPS Annual Meeting & Exposition

Bezard E., Brotchie J.M., Gross C.E., 2001, Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies, *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 577-588

Cedarbaum J.M., Kutt H., Mc Dowell F.H., 1989, A pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of Sinemet CR (50/200) and standard Sinemet (25/100), *Neurol.* 39, 38-44,

Clarke's Isolation and Identification of drugs in Pharmaceutics, Body Fluids, and Post-Mortem Material, 1986. 2nd ed., The Pharmaceutical Press, London

Crevoisier Ch., Hoevels B., Zürcher G., Da Prada M., 1987, Bioavailability of levodopa after Madropar HBS administration in healthy subjects, *Eur. Neurol.* 27 (suppl. 1), 36-46

Duvoisin R.C., 1974, Variation in the "on-off" phenomenon, *Adv. Neurol.* 5, 339-340

Forte G., Alimonti A., Violante N., Di Gregorio M., Senofonte O., Petrucci F., Sancesario G., Bocca B., 2005, Calcium, copper, iron, magnesium, silicon and zinc content of hair in Parkinson's disease, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 195-201

Gasser U.E., Crevoisier Ch., Ouwerkerk M., Lankhaar G., Dingemans J., 1998, Comparative single- and multiple-dose pharmacokinetics of levodopa and 3-O-methyldopa following a new dual-release and a conventional slow-release formulation of levodopa and benserazide in healthy subjects, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46, 223-228

Guidance for Industry, Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations, September 1997, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research.

Goole J., Vanderbist F., Amighi K., 2007, Development and evaluation of new multiple-unit levodopa sustained-release floating dosage forms, *Int. J. Pharm.* 334, 35-41

Goole J., Deleuze Ph., Vanderbist F., Amighi K., 2008a, New levodopa sustained-release floating minitablets coated with insoluble acrylic polymer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 310-318

Goole J., Vanderbist F., Amighi K., 2008b, Evaluation and floating enhancement of levodopa sustained-release floating minitablets coated with insoluble acrylic polymer, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, In press

Grahnén A., Eckernäs S.A., Collin C., Ling-Anderson A., Tiger G., Nilsson M., 1992, Comparative multiple-dose pharmacokinetics of slow-release levodopa products, *Eur. Neurol.* 32, 343-348

Griffiths G.H., Owen G.M., Kirkman S., Shields R., 1966, Measurement of the rate of gastric emptying using chromium 51, *Lancet* 51 (i), 1244-1245

Hamdani J., Moës A.J., Amighi K., 2002, Development and evaluation of prolonged release pellets obtained by the melt pelletization process, *Int. J. Pharm.* 245, 167-177

Hoffman A., Stepensky D., 1999, Pharmacodynamic aspects of modes of drug administration for optimization of drug therapy, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 16 (6), 571-639

Kamba M., Seta Y., Kusai A., Ikeda M., Nishimura K., 2000, A unique dosage form to evaluate the mechanical destructive force in the gastrointestinal tract, *Int. J. Pharm.* 208, 61-70

Kedzierewicz F., Thouvenot P., Lemut J., Etienne A., Hoffman M., Maincent P., 1999, Evaluation of peroral silicone dosage forms in humans by gamma-scintigraphy, *J. Control. Rel.* 58, 195-205

Kiil S., Dam-Johansen K., 2003, Controlled drug delivery from swellable hydroxypropylmethylcellulose matrices: model-based analysis of observed radial front movements, *J. Control. Release* 90, 1-21

Kordower J.H., Goetz C.G., 1999, The first miracle in neurodegenerative disease: The discovery of oral levodopa, *Brain Research Bulletin* 50, 377-378

Mardsen C.D., Parkes J.D., 1977, Success and problems of long-term L-dopa therapy in Parkinson's disease, *Lancet*, 345-349

Moës A.J., 1993, Gastroretentive drug-delivery systems, *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems* 15, 243-284

Monville C., Torres E.M., Dunnett S.B., 2005, Validation of the L-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model and evaluation of the effects of selective dopamine receptor agonists and antagonists, *Brain Research Bulletin* 68, 16-23

Pinder R.M., Brogden R.N., Sawyer P.R., Speight T.M., Avery G.S., 1976, Levodopa and Decarboxylase Inhibitors: A Review of their Clinical Pharmacology and Use in the Treatment of Parkinsonism, *Drugs* 11, 329-377

Rouge N., Buri P., Doelker E., 1996, Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery, *Int. J. Pharm.* 136, 117-139

Seth P.R., Tossounian J., 1984, The hydrodynamically balanced system (HBSTM): a novel drug delivery system for oral use, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 10, 313-339

Shah, V.P., Tsong, Y., Sathe, P., Liu, J-P, 1998, In vitro dissolution profile comparison - Statistics and analysis of the similarity factor f_2 , *Pharm. Res.* 15 (6), 889-896

Sharstry B.S., 2001, Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy, *Neur. Sci. Res.* 41, 5-12

Siepmann J., Lecomte F., Bodmeier R., 1999, Diffusion-controlled drug delivery systems: calculation of the required composition to achieve desired release profiles, *J. Control. Release* 60, 379-389

Stocchi F., Quinn N.P., Barbato L., Patsalos P.N., O'Connell M.T., Ruggieri S., Mardsen C.D., 1994, Comparison between a fast and a slow release preparation of levodopa and combination of the two : a clinical and pharmacokinetic study, *Clinical Neuropharmacology* 17, 38-44

Stops F., Fell J.T., Collett J.H., Martini L.G., Sharma H.L., 2006, Smith A-M, Citric acid prolongs the gastro-retention of a floating dosage form and increases bioavailability of riboflavin in the fasted state, *Int. J. Pharm.* 308, 14-24

Timmermans J., Van Gansbeke B., Moes A.J., 1989, Assessing by gamma scintigraphy the in vivo buoyancy of dosage forms having known size and floating force profiles as a function of time, *Proceed. 5th APGI Int. Conf. Pharm. Technol.*, 1: 42-51

Timmermans, J., Moës, A.J., 1990, Measuring the resultant-weight of an immersed test material: I. Validation of an apparatus and a method dedicated to pharmaceutical applications, *Acta Pharm. Technol.* 36, 171-175

Tothill P., McLoughlin G.P., Heading R.C., 1978, Techniques and errors in scintigraphic measurements of gastric emptying, *J. Nucl. Med.* 19, 256-261

Wilding I.R., Coupe A.J., Davis S.S., 2001, The role of γ -scintigraphy in oral drug delivery, *Advanced Drug Del. Rev.* 46, 103-124

Zhang L., Chen G., Hu Q., Fang Y., 2001, Separation and determination of levodopa and carbidopa in composite tablets by capillary zone electrophoresis with amperometric detection, *Analytica Chimica Acta* 431, 287-292