

Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles / Université libre de Bruxelles Institutional Repository **Thèse de doctorat/ PhD Thesis**

Citation APA:

Sebti, M. T. (2006). Développement et évaluation de formulations lipidiques à poudre sèche pour inhalation (Unpublished doctoral dissertation).

Université libre de Bruxelles, Institut de pharmacie, Bruxelles.

Disponible à / Available at permalink : https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/210862/4/ec913995-1e54-4c5d-b3e5-e4fd6fe73caa.txt

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à

prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que : - Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;

- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;

- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

------ English Version -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is

invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;

- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.

INSTITUT DE PHARMACIE

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie Professeur K. AMIGHI

DEVELOPPEMENT ET EVALUATION DE FORMULATIONS LIPIDIQUES A POUDRE SECHE POUR INHALATION



Thami SEBTI

Pharmacien d'industrie

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

Avril 2006



ULB

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

INSTITUT DE PHARMACIE

Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie Professeur K. AMIGHI

DEVELOPPEMENT ET EVALUATION DE FORMULATIONS LIPIDIQUES A POUDRE SECHE POUR INHALATION



Thami SEBTI

Pharmacien d'industrie

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

Avril 2006

ULB

Au terme de ce travail, j'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Karim Amighi, Directeur du Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie, pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer un Doctorat dans son service. Je lui exprime ici toute ma reconnaissance pour m'avoir apporté tout au long de ces années son soutien et ses encouragements et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail. Qu'il me soit permis de lui témoigner ma plus haute gratitude pour les conseils attentifs et bienveillants qu'il m'a prodigués, pour sa grande disponibilité, ainsi que pour m'avoir fait partager ses compétences lors de nos nombreuses discussions.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Docteur Serge Goldman, Chef du Département des Radio-Isotopes de l'hôpital Erasme, ainsi qu'au Docteur Alain Michils (Département de Pneumologie) pour avoir accepté de réaliser l'étude de déposition in vivo dans leur service. Je remercie plus particulièrement le Pharmacien Bernard Van Gansbecke (Départements des Radio-Isotopes et de Pharmacie Hospitalière) pour l'aide inestimable qu'il m'a fournie tout au long de cette étude pharmaco-scintigraphique.

Toute ma reconnaissance va également à Monsieur le Professeur Pierre Duez, Directeur du Laboratoire de Pharmacognosie, Bromatologie et Nutrition humaine, pour avoir mis à ma disposition l'appareillage de chromatographie en phase gazeuse. Je lui sais en outre gré de m'avoir fait profiter de ses larges connaissances en statistiques.

Je ne saurais oublier d'exprimer mes plus sincères remerciements à Mademoiselle Gabrielle Pilcer, Doctorante au sein des Laboratoires de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie, pour l'aide qu'elle m'a apportée dans la réalisation de l'étude clinique.

Je tiens aussi à remercier la firme SMB-Galéphar pour avoir mis gracieusement ses équipements à ma disposition. Ma profonde reconnaissance s'adresse aux personnes qui, au sein de cette firme, m'ont apporté leur aide et leur compétence. Je voudrais tout particulièrement remercier le Docteur Francis Vanderbist, Directeur du Département Recherche et Développement, pour m'avoir fait bénéficier de sa très vaste expérience en galénique et de ses précieux conseils. Je remercie également Madame Sonia Lebrun pour l'analyse et le traitement des données pharmacocinétiques. Qu'il me soit permis de remercier également tous ceux qui ont mis à ma disposition des moyens techniques particuliers et m'ont fait profiter de leur expérience :

- A Madame Tiriana Segato (Service de Chimie Industrielle), pour sa collaboration précieuse lors des études de diffraction aux rayons X.
- A Monsieur Patrizio Madau (Service de Chimie Industrielle), pour la réalisation de l'analyse par microscopie électronique à balayage.
- A Monsieur Ludovic Jeanne (UCB Pharma), pour sa collaboration lors des analyses Karl Fisher.

J'adresse également tous mes remerciements à mes collègues du service de Pharmacie Galénique, et plus particulièrement à Monsieur Philippe Deleuze, pour leur aide et leurs encouragements tout au long de ce travail.

De manière plus personnelle, mes pensées vont à l'ensemble de mes proches. Leur amour, leur confiance et leur soutien m'ont aidé à surmonter bien des obstacles. Ce travail est autant le mien que le leur.

Que ma mère sache à cet instant combien grande est ma gratitude pour sa bienveillance et son indéfectible soutien.

Enfin, tous mes remerciements et toute mon affection à Florence pour son support et son écoute inconditionnels.

TABLE DES ABRÉVIATIONS	1
I. RÉSUMÉ	5
II. INTRODUCTION	9
1. Anatomie et Physiologie du tractus respiratoire humain	9
1.1. Anatomie fonctionnelle des poumons	9
 Physiologie pulmonaire 	12
 Vascularisation pulmonaire 	16
 Ventilation pulmonaire 	16
2. Mécanismes de déposition d'un aérosol et devenir des particules inhalées	17
2.1. Facteurs influençant la déposition pulmonaire	19
2.1.1. Influence de la granulométrie des particules	19
2.1.2. Influence des paramètres de ventilation	20
Influence de la morphologie du tractus respiratoire	20
2.2. Clairance pulmonaire	21
3. Dispositifs d'inhalation	23
3.1. Les nébuliseurs	23
 Les aérosols doseurs (AD) 	25
 Les inhalateurs à poudre sèche (IPS) 	28
3.3.1. Facteurs affectant l'efficacité des IPS	30
3.3.1.1. La formulation	30
3,3,1,2, Le dispositif	32
4. Evaluation des formes pharmaceutiques administrées par la voie pulmonaire	36
4.1. Méthodes in vitro	36
4.1.1. Evaluation des caractéristiques physiques	30
4.1.2. Evaluation des proprietes aerodynamiques	39
4.1.2.7. L'impacteur à cascade multi-étages (Andersen Cascade Impactor)	30
4.1.2.3. L'impacteur liquide multi-étages (Multi-stage Liquid Impinger)	39
4.1.2.4. L'impacteur de « nouvelle génération » (Next Generation Impactor)	39
4.1.2.5. Expression des résultats de déposition	41
Méthodes in vivo	41
4.2.1. Les études pharmacocinétiques	43
4.2.2. L'imagerie médicale	45
4.2.2.1. La scintigraphie gamma	46
4.2.2.2. SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)	40
4.2.2.3. PE1 (Positron Emission Tomography) 4.2.2.4. Développements récents	46
5. Formulations médicamenteuses administrées par inhalation	49
5.1. Médicaments inhalés à action locale	49
5.1.1. Les bronchodilatateurs	49
5.1.3 Les inhibiteurs de la libération de médiateurs	51
5.1.4 Les mucolytiques	51
5.1.5. Les anti-infectieux	51
5.2. Perspectives futures d'application des formes inhalées	51
5.2.1. Médicaments inhalés à action systémique	51
5.2.2. Formulations à libération prolongée	53
5.2.2.1. Les liposomes	54
5.2.2.2. Les microsphères biodégradables	56
5.2.2.3. Les cyclodextrines	56

i

 6. Techniques de micronisation 6.1. Le broyage mécanique 6.2. L'utilisation de fluides supercritiques 6.2.1. Atomisation supercritique (RESS, pour Rapid Expansion of Supercritical Solutions) 6.2.2. Procédé antisolvant (SAS, pour Supercritical Anti Solvent) 6.3. Atomisation par « spray-drying » III. OBJECTIF DU TRAVAIL 	58 58 59 59 60 61 65
 6.1. Le broyage mécanique 6.2. L'utilisation de fluides supercritiques 6.2.1. Atomisation supercritique (RESS, pour Rapid Expansion of Supercritical Solutions) 6.2.2. Procédé antisolvant (SAS, pour Supercritical Anti Solvent) 6.3. Atomisation par « spray-drying » III. OBJECTIF DU TRAVAIL 	58 59 59 60 61 65
 6.2. L'utilisation de fluides supercritiques 6.2.1. Atomisation supercritique (RESS, pour Rapid Expansion of Supercritical Solutions) 6.2.2. Procédé antisolvant (SAS, pour Supercritical Anti Solvent) 6.3. Atomisation par « spray-drying » III. OBJECTIF DU TRAVAIL 	59 59 60 61 65
6.2.1. Atomisation supercritique (RESS, pour Rapid Expansion of Supercritical Solutions) 6.2.2. Procédé antisolvant (SAS, pour Supercritical Anti Solvent) 6.3. Atomisation par « spray-drying » III. OBJECTIF DU TRAVAIL	59 60 61 65
6.2.2. Procédé antisolvant (SAS, pour Supercritical Anti Solvent) 6.3. Atomisation par « spray-drying » III. OBJECTIF DU TRAVAIL	60 61 65
6.3. Atomisation par « spray-drying » III. OBJECTIF DU TRAVAIL	61 65
III. OBJECTIF DU TRAVAIL	65
IV. PARTIE EXPÉRIMENTALE	69
1. Production de microparticules linidiones solides (mPLS)	60
1.1. Sélection des linides	60
1.2 Matériels et méthodes	72
1.2.1. Produits utilisés	72
1.2.2 Equipment d'atomisation	73
1.2.3. Analyse granulométrique	75
1.2.4. Détermination de la teneur en solvant résiduel	70
1.2.5. Détermination de la teneur en eau	80
1.3. Résultats et discussion	81
1.3.1. Optimisation des paramètres d'atomisation	81
1.3.2. Détermination de la teneur en solvant résiduel	87
1.3.3. Détermination de la teneur en eau	88
1.4. Conclusion	91
2. Caractérisation des microparticules lipidiques solides (mPLS)	93
2.1. Introduction	93
2.2. Matériels et méthodes	95
2.2.1. Produits utilisés	95
2.2.2. Analyse granulométrique	96
2.2.5. Analyse de la morphologie	97
2.2.4. Evaluation des propriétés de tassement	.98
2.2.5. Evaluation des proprietes cristallines	100
2.2.5.1. Analyse DSC	100
2.2.5.2. Analyse DKA	103
2.2.0. Evaluation acrouynamique de l'acrosol	105
2.2.7. Etudes de stabilite 2.2.8. Méthodas statistiques	110
2.2.6. Methodes statistiques	112
2.3.1 Evaluation das argumitation abustianas das mBI C	112
2.3.1.1 Analyse granilandriana	112
2.3.1.2 Détermination des propriétés de tassament	115
2313 Analyse SEM	116
2.3.1.4 Analyse DSC et DRX	110
2.3.2. Evaluation des performances d'aérosolisation	125
2.3.2.1. Tests préliminaires sur les dispositifs d'inhalation	125
2.3.2.2. Détermination de la dose délivrée	127
2.3.2.3. Détermination de la fraction pulmonaire	128
2.3.2.4. Paramètres influencant la fraction pulmonaire	134
2.3.3. Etudes de stabilité	145
2.4. Conclusion	151
3. Optimisation des mélanges de poudres pour inhalation	153
3.1. Introduction	153
 Matériels et méthodes 	154
3.2.1. Produits utilisés	154
3.2.2. Préparation des différents ratios de lactose	154

3.2.3. Préparation des mélanges fluticasone/lactose	155
3.2.3.1. Le mélangeur Turbula	156
3.2.3.2. Le mélangeur planétaire	157
3.2.3.3. Le mélangeur High-Shear	158
3.2.4. Détermination de l'homogénéité	159
3.2.4.1. Echantillonnage	159
3.2.4.2. Détermination de la teneur en PA	160
3.2.5. Evaluation des performances d'aérosolisation	161
3.2.6 Evaluation des propriétés rhéologiques	161
3.2.7. Analyse par microscopie électronique à balavage	162
3.3. Résultats et discussion	163
3.3.1. Ontimisation du mélange Fluticasone : LactoseDCL21/Microfine	163
3.3.1.1. Mélangeur Turbula 2C	163
3.3.1.2. Colette MP-20	174
3.3.1.3. Mi-Pro	176
3.3.1.4. Analyse SEM	176
3.3.2. Ontimisation du mélanoe Budésonide / excinients linidiques	180
3.4. Conclusion	182
4. Evaluation de la déposition pulmonaire des mPLS sur volontaires sains	185
4.1. Introduction	185
4.2. Matériels et méthodes	185
4.2.1. Produits utilisés	185
4.2.2. Procédé de marguage	186
4.2.3. Validation du procédé de marquage	187
4.2.4. Protocole expérimental	188
4.2.5. Volontaires	189
4.2.6. Evaluation de la déposition in vivo	193
4.2.7. Monitoring des fonctions respiratoires	194
4.2.8. Détermination des paramètres pharmacocinétiques	195
4.2.9. Méthodes statistiques	196
Résultats et discussion	198
4.3.1. Validation du procédé de marquage	198
4.3.2. Evaluation de la déposition in vivo	202
4.3.3. Monitoring des fonctions respiratoires	211
4.3.4. Détermination des paramètres pharmacocinétiques	213
4.4. Conclusion	217
V. CONCLUSION GÉNÉRALE	221
VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	227
VII. ANNEXES	245
1. Certificats d'analyse	245
1.1. Cholestérol	245
1.2. Phospholipon 90H	246
1.3. Budésonide	247
1.4. Propionate de Fluticasone	248
2. Principaux documents relatifs à l'étude clinique	249
3. Donées PK	275

Table des abréviations

99m Tc	: Technétium 99 métastable
AD	: Aérosol doseur
AUC	: Area Under the concentration-time Curve
BPCO	: Bronchopneumopathie chronique obstructive
CD	: Cyclodextrines
CFC	: Chlorofluorocarbones
CFTR	: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
CG	: Chromatographie gazeuse
CGTase	: Cyclodextrine-glycosyl-transférase
Cmax	: Concentration maximale
CV	: Coefficient de variation
CVit.	: Capacité vitale
D(50)	: Diamètre volumétrique médian
D[4/3]	: Diamètre volumétrique moyen
dar	: Diamètre aérodynamique
DAMM	: Diamètre aérodynamique médian massique
dee	: Diamètre de coupure (impacteurs)
DDLE	: Détecteur de Diffusion de Lumière Evaporatif
DMPC	: Dimyristoylphosphatidylcholine
dp	: Débit de pulvérisation
DPF	: Dose en particules fines
DPI	: Dry powder inhaler
DPPC	: Dipalmitoylphosphatidylcholine
DRX	: Diffraction aux rayons X
DSC	: Differential Scanning Calorimetry
DSPC	: Distéaroylphosphatidylcholine
ETG	: Ecart-type géométrique
fA	‡ Faible affinité
fup	: Flux d'air de pulvérisation
fas	: Flux d'air de séchage
FIM	‡ Flux inspiratoire maximal
fM	: Formulation de type matriciel
fMP	: Formulation de type « mélange physique PA- excipients lipidiques »
FP	: Fraction pulmonaire
FSC	1 Fluide supercritique
hA	haute affinité
HFA	: Hydrofluoroalcanes
HPLC	1 High performance liquid chromatography

HR	: Humidité relative			
lc	: Indice de Carr			
IMC	: Indice de masse corporelle			
IPS	: Inhalateur à poudre sêche			
KF	‡ Karl Fisher			
LUV	Large unilamellar vesicle			
MDI	Metered dose inhaler			
MEC	: Méthyléthylcétone			
MLV	: Multilamellar vesicles			
MsLI	: Multi-stage Liquid Impinger			
mPLS	: Microparticules lipidiques solides			
PA	: Principe actif			
PC	: Phosphatidylcholine			
PET	: Positron Emission Tomography			
PK.	: Pharmacokinetic			
PL90H	: Phospholipon 90H [®]			
PLA	: Polylactid acid			
PLGA	: Polylactid-co-glycolid acid			
PLS	: Particules lipidiques solides			
PMSA	: Patented Multiple Scattering Algorithm			
PP	: Profil de pénétration pulmonaire			
RD	: Résistance du dispositif (IPS)			
RESS	: Rapid Expansion of Supercritical Solutions			
RI	: Région d'intérêt			
SAS	: Supercritical Anti Solvent			
SEM	: Scanning Electron Microscopy			
SOP	: Standard Operating Procedure			
SPECT	: Single Photon Emission Computed Tomography			
SUV	: Small unilamellar vesicle			
Te	: Température critique (transition de phase)			
T _{max}	: Temps de la concentration plasmatique maximale			
V<5µm	: Proportion en volume de particules ayant un diamètre < 5μm			
VEF ₁	: Volume expiratoire forcé en une seconde			
VEMS	: Volume expiratoire maximal pendant la première seconde			
Vt	: Volume tidal			
ΔPD	: Chute de pression			

1

RESUME

I. Résumé

De nos jours, la voie inhalée constitue le mode d'administration optimal dans le traitement de nombreuses affections respiratoires, et suscite beaucoup d'intérêt pour la délivrance systémique de médicaments. Cependant, le poumon est un organe complexe doté de mécanismes de défense efficients qui limitent la déposition des particules inhalées et les éliminent très rapidement. Cette voie d'administration fait donc l'objet de programmes de recherche intensifs visant à améliorer l'efficacité de la délivrance et la compliance du patient. Il faut néanmoins signaler que le nombre d'excipients dont l'innocuité a été démontrée en inhalation (sous forme de poudre sèche) reste extrêmement limité à l'heure actuelle. A cet égard, l'utilisation de microparticules lipidiques solides (mPLS), constituées d'un mélange de cholestérol et de phospholipides biodégradables et caractérisés par une température de transition de phase élevée, a été envisagée. Le procédé retenu pour la préparation de ces mPLS est la technique d'atomisation à température modérée (spray-drying).

Dans un premier temps, le travail a consisté à mettre au point les conditions opératoires de fabrication (température et débit de l'air d'entrée et de sortie, débit de pulvérisation, pression et température de l'air de pulvérisation, etc.) ainsi que les paramètres de formulation (proportions de cholestérol / phospholipides / principe actif (PA)) afin d'obtenir de manière reproductible des microparticules présentant les caractéristiques appropriées pour une délivrance pulmonaire.

Deux types de formes ont été développés :

 Une forme à poudre sèche dite conventionnelle (mélange physique PAexcipient). Les particules cohésives de PA sont mélangées au transporteur lipidique en vue d'améliorer leurs propriétés d'écoulement et de favoriser leur redispersion lors de l'inhalation.

 Une forme matricielle permettant également d'améliorer les propriétés d'écoulement et de dispersion, mais qui à la différence de la forme précédente ne nécessite pas d'étape de mélange. Elle consiste à incorporer le PA dans la masse lipidique. Dans ce casci, l'utilisation de tels excipients a pour effet de modifier les propriétés de dissolution du PA et donc de contrôler sa vitesse de libération. Ensuite, les caractéristiques physico-chimiques des mPLS ont été évaluées. Celles-ci comprenaient aussi bien la taille et la distribution de taille (analyse granulométrique par diffraction laser) que la forme (analyse par microscopie électronique à balayage) et la densité des particules produites (analyse par tassement). Ont suivi les évaluations de l'état physique (polymorphisme) et des propriétés thermiques par calorimétrie à balayage différentiel et par diffraction aux rayons X. Le procédé de micronisation par atomisation a permis d'obtenir des microparticules sphériques de structure homogène dont la surface apparaît comme parfaitement lisse et régulière. Les mPLS, et plus particulièrement les formulations matricielles, se caractérisent par des densités relativement faibles et de bonnes propriétés d'écoulement.

Les performances d'aérosolisation ont été étudiées au moyen de l'impacteur en verre et de l'impacteur liquide multi-étages. Les mPLS présentent un comportement aérodynamique remarquable ; les fractions pulmonaires (FP) sont significativement supérieures à celles des produits de référence (Pulmicort[®] Turbohaler[®] 200 µg et Flixotide[®] Diskus[®] 250 µg) ainsi qu'à celles d'autres formulations conventionnelles délivrées via le même dispositif d'inhalation (Aeroliser[®]). Puis, une étude de stabilité a été réalisée sur les formulations dont les propriétés satisfaisaient à nos exigences. Il en ressort que les mPLS conservent leurs caractéristiques initiales pour autant que les conditions de stockage ne dépassent pas les 30°C/65% HR.

Dans le cadre de l'optimisation du processus de mélange de poudres à PA cohésif et faiblement dosé (destinées à une inhalation sous forme de poudre sèche), une étude a porté sur l'influence vis à vis de l'homogénéité du mode d'action et des caractéristiques de trois types de mélangeurs fréquemment employés pour effectuer des mélanges solides pulvérulents : un mélangeur à cuve mobile de type Turbula[®], un mélangeur planétaire (Colette MP-20[®]) et un mélangeur-granulateur à haute vitesse (Mi-Pro[®]). Il a été démontré, par après, que les mélanges physiques PA-excipients lipidiques s'effectuent de façon efficace dans les conditions opératoires fixées.

Finalement, une étude pharmaco-scintigraphique a été menée à l'Hôpital Erasme sur six volontaires sains. Les résultats de déposition pulmonaire sont en parfaite corrélation avec les valeurs de FP observées in vitro. En revanche, les résultats de l'analyse pharmacocinétique ne sont pas assez concluants pour mettre en évidence la régulation de la cinétique de libération du PA à partir des formes matricielles.

INTRODUCTION

II. Introduction

1. Anatomie et Physiologie du tractus respiratoire humain

Le pourson est un organe complexe dont les fonctions physiologiques sont étroitement liées à la structure du tractus respiratoire. Une bonne connaissance de l'anatomie des voies respiratoires est, par conséquent, requise dans le but de mieux comprendre le fonctionnement de cet organe et d'optimaliser la délivrance des médicaments par inhalation.

1.1. Anatomic fonctionnelle des poumons

Le tractus respiratoire humain peut être divisé en deux parties distinctes :

- Les voies aériennes supérieures, qui s'étendent de la bouche et des narines jusqu'au sommet de la trachée.
- Les voies aériennes inférieures, qui comprennent l'arbre trachéo-bronchique (les voies aériennes centrales) et la région alvéolaire (les voies aériennes périphériques).

La trachée est un tuyau en forme de D composé d'anneaux cartilagineux. Elle se divise dans un premier temps en deux bronches primaires (ou souches), qui elles-mêmes se subdivisent en trois bronches secondaires (ou lobaires) dans le poumon droit et deux bronches secondaires dans le poumon gauche. A leur tour, celles-ci se ramifient en dix bronches ternaires (segmentaires) à droite et huit à gauche. Les bronches segmentaires, qui alimentent les segments de chaque lobe, se subdivisent ensuite en bronchioles de plus en plus petites. La dernière bronchiole purement conductrice s'appelle bronchiole terminale. Elle est dépourvue de cartilage et donne naissance à plusieurs bronchioles respiratoires. Chez l'homme, il existe trois générations de bronchioles respiratoires. Chaque bronchiole respiratoire se subdivise en une dizaine de canaux alvéolaires qui se terminent finalement dans des espaces dilatés appelés sacs alvéolaires. On estime entre 200 et 600 millions le nombre d'alvéoles présentes dans le poumon humain. Pour mieux comprendre et étudier le trajet des particules inhalées, le tractus respiratoire a été modélisé et l'arbre trachéo-bronchique, bien que asymétrique, fut assimilé à un réseau de tubes rigides avec des diamètres spécifiques, des longueurs définies et un système d'embranchements dichotomiques au fur et à mesure que l'on pénètre dans le poumon. Weibel [1] a décrit le modèle le plus vraisemblable : l'arbre trachéo-bronchique y est représenté comme une suite de 24 embranchements symétriques, la trachée portant le numéro 0 et les sacs alvéolaires le numéro 23 (Figure 1). D'autres modèles ont été proposés en tenant compte de l'asymétrie des poumons et des indications sur les angles de branchement mais leur complexité les rend inutilisables [2, 3].

En descendant de la trachée aux sacs alvéolaires, le tractus respiratoire subit des changements anatomiques influençant fortement la fonction respiratoire [4]; l'examen de la Figure 2 permet de constater que parallèlement à la diminution du calibre et de la longueur des conduits respiratoires, le nombre d'embranchements et l'aire de section augmentent de manière considérable au fur et à mesure que l'on pénètre dans le poumon. A titre d'exemple, le diamètre moyen de la trachée est de 1,8 cm pour une superficie de 2,54 cm², alors que le diamètre moyen des alvéoles ne dépasse pas 0,04 cm pour une surface totale de l'ordre de 140 m².

	Generation	2-19	Diameter, cm	Length, cm	Number	Total Cross- Sectional Area, cm ²
Zone	Trachea	0	1.80	12.0	1	2.54
	Bronchi	1	1.22	4.8	2	2.33
cting	501	2	0.83	1.9	4	2.13
		1 3	0.56	0.8	6	2.00
õ	Bronchiples 1	4	0.45	1.3	16	2,48
	Terminal Bronchioles	5	0.35	1.07	32 ↓ 5 ×104	3.11 ↓ 180.0
Zones	Respiratory Bronchioles	17 18 19	0.05	0.10	5 × 105	105
nsitiona	Alveolar Ducts	Ts 20 Ts 21 Ti 22	1	1	1	
Res	Alveolar Sacs (243	T 23	0.04	0.05	6 × 10 ⁶	104

Figure 1 : Représentation schématique de l'arbre trachéo-bronchique humain [5].

De ce fait, la vélocité de l'air inspiré, qui se présente au niveau des bronches primaires sous forme d'un mouvement turbulent, a tendance à diminuer considérablement pour atteindre une valeur pratiquement nulle dans les sacs alvéolaires, au niveau desquels l'air circule lentement et de manière parfaitement laminaire (Figure 2).



Figure 2 : Variation de la vélocité du flux d'air inhalé et de l'aire de section des voies aériennes en fonction des embranchements de l'arbre trachéo-bronchique ; la partie sombre correspond à la zone respiratoire [6].

Du point de vue fonctionnel, le système respiratoire est composé de deux zones principales, la zone de conduction et la zone respiratoire, séparées par une zone intermédiaire, appelée zone de transition (Figures 1 et 3) [6-8]:

- La zone de conduction comprend, outre les voies aériennes supérieures (la cavité nasale et les sinus associés, le nasopharynx, l'oropharynx, le larynx), la trachée, les bronches et les bronchioles, incluant les 16 premières générations de l'arbre trachéobronchique de Weibel. Ces structures ont plusieurs fonctions telles que la défense contre les contaminants de l'air environnant, l'olfaction et la voix, le conditionnement de l'air (augmentation de la température et de l'humidité relative de l'air respiré), et le transfert des gaz jusqu'à la zone d'échange. La zone de transition est constituée des bronchioles respiratoires (générations
 17 à 19 de l'arbre trachéo-bronchique de Weibel). La résorption y est très faible et les échanges gazeux y sont limités.

 La zone respiratoire comprend les canaux alvéolaires et les sacs alvéolaires terminaux (générations 20 à 23 de l'arbre trachéo-bronchique de Weibel). Son rôle est de participer aux échanges gazeux entre les alvéoles et les capillaires sanguins y accolés.



Figure 3 : Illustration (a) du tractus respiratoire humain et (b) de la région respiratoire [1].

1.2. Physiologie pulmonaire

Le tractus respiratoire est constitué d'une variété de cellules épithéliales dont les fonctions bien définies sont dépendantes de leur distribution spécifique dans l'arbre trachéobronchique.

L'épithélium de la trachée et des bronches est principalement constitué de cellules ciliées, de cellules muqueuses en gobelet et de cellules basales. Les cellules en gobelet sécrètent le mucus, composé riche en mucopolysaccharides et en glycoprotéines (mucine) présentant des propriétés viscoélastiques. L'entièreté de l'arbre trachéo-bronchique, des voies aériennes supérieures jusqu'aux bronchioles terminales, est recouverte d'une couche de mucus d'une épaisseur variant de 0,5 à 5 µm. Cela sert à hydrater l'épithélium, à humidifier l'air inspiré et constitue une barrière à la pénétration des particules étrangères.

Les cellules ciliées, présentes en abondance, participent activement à la protection du système respiratoire en produisant des glycoprotéines et en propulsant continuellement à l'aide de battements ciliaires coordonnés et orientés, le mucus des voies respiratoires inférieures vers la trachée et le pharynx, où celui-ci sera dégluti ou expectoré. Ce processus est connu sous le nom de clairance mucociliaire ou escalateur mucociliaire [6-8].

Il est à noter que cette clairance est variable selon la localisation dans le tractus respiratoire. En effet, le déplacement du mucus est conditionné par le nombre de cellules ciliées et leur fréquence de battement. A titre d'exemple, le mucus est véhiculé à une vitesse de l'ordre de 5 à 20 mm/min, au niveau de la trachée ; au fur et à mesure que les voies rétrécissent, le nombre de cellules ciliées diminue et la vitesse chute à 0,5 à 1 mm/min dans les voies les plus profondes [9-11].

Au niveau des bronchioles, la surface épithéliale est recouverte de petites cellules cubiques ciliées entre lesquelles se retrouvent des cellules non ciliées, les cellules de Clara. Celles-ci sécrètent des lipides et des protéines dont certaines sont des enzymes. Elles interviennent dans la formation du surfactant par l'action des phospholipases et participent au métabolisme des xénobiotiques grâce à leurs oxydases liées aux cytochromes P450 [6].

La région alvéolaire, quant à elle, se caractérise par un épithélium très fin, recouvert non plus de mucus mais d'une couche de liquide surfactant. On y distingue trois types de cellules :

Les pneumocytes de type I: ils recouvrent environ 90% de la surface alvéolaire [11, 12]. Ils sont unis entre eux par des jonctions étanches serrées (tight-junctions), et reposent sur une lame basale continue qui est largement fusionnée avec la lame basale de l'endothélium des capillaires alvéolaires. Ainsi, l'endothélium capillaire, la lame basale commune et le cytoplasme des pneumocytes constituent la membrane alvéolo-capillaire à travers laquelle se font les échanges gazeux (Figure 4).



Figure 4 : La membrane alvéolo-capillaire [7].

Les pneumocytes de type II : ils recouvrent seulement 5 à 10 % de la surface alvéolaire. Ils sécrètent le surfactant pulmonaire et peuvent se différencier et se multiplier pour donner naissance à des pneumocytes de type I en cas de lésion parenchymateuse d'origine inflammatoire ou infectieuse [7].

Le surfactant pulmonaire est un mélange complexe de lipides et de protéines ; il est constitué de 85 à 90 % de phospholipides, de 6 à 8 % de protéines biologiquement actives (SP-A, SP-B, SP-C et SP-D), de 4 à 7 % de lipides neutres (essentiellement du cholestérol) et d'une petite fraction d'hydrates de carbones.

La composition en phospholipides est renseignée dans le Tableau 1. La phosphatidylcholine est de loin la classe la plus répandue (\pm 80 %). D'autres classes de phospholipides telles que la phosphatidylglycérine, le phosphatidylinositol et la phosphatidylsérine sont présentes en quantités moindres. Par ailleurs, il est intéressant de souligner que les phospholipides du surfactant endogène sont en grande partie saturés ; la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) constitue le composé le plus abondant (jusqu'à 40 % des phospholipides totaux). Une fois expulsé par exocytose dans l'hypophase alvéolaire, le surfactant agit essentiellement en abaissant la tension superficielle évitant ainsi tout risque d'atélectasie. De plus, il augmente la compliance pulmonaire en diminuant l'effort musculaire nécessaire pour ventiler les poumons et les maintenir remplis de gaz. Enfin, il joue un rôle important dans le maintien tant de l'homéostasie du liquide alvéolaire que d'une perméabilité convenable et participe à divers mécanismes de défense.

Seulement 2 à 5 % du surfactant pulmonaire sont éliminés par l'escalateur mucociliaire, 10 à 15 % sont repris par les macrophages tandis que la plus grande partie est capturée par les pneumocytes de type II en vue d'un recyclage des éléments constitutifs du surfactant pour une réutilisation ultérieure [14].

Classe de phospholipides	Teneur (en % m/m)	
Phosphatidylcholine (PC) Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)	80 40	
Phosphatidylglycérine (PG)	8	
Phosphatidylinositol (PI)	1.6	
Phosphatidylsérine (PS)	70	
Phosphatidyléthanolamine (PE)	4	
Sphingomyéline (SPH)	2	

Tableau 1 : Composition quantitative en phospholipides du surfactant pulmonaire [14].

Cette composition varie en fonction de l'âge et de l'espèce étudiée [13].

Les macrophages : ce sont des cellules mobiles qui représentent la majorité des cellules immunitaires présentes dans les alvéoles et l'interstitium pulmonaire [15]. Ils constituent le mécanisme principal de la clairance alvéolaire en phagocytant les substances étrangères ayant échappé à l'escalateur mucociliaire. De plus, une fois activés, ils libèrent de nombreux médiateurs et enzymes pouvant affecter le fonctionnement des voies respiratoires [16].

1.3. Vascularisation pulmonaire

La vascularisation intra-thoracique normale comporte deux systèmes vasculaires, l'un fonctionnel (pulmonaire), l'autre nourricier (bronchique).

La circulation pulmonaire proprement dite consiste en un lit vasculaire qui quitte le cœur droit via l'artère pulmonaire, puis se ramifie en un lit capillaire très dense entourant les alvéoles, pour ensuite se regrouper en veinules et en veines pulmonaires qui retournent au cœur gauche. Le flux sanguin y circule à un débit très élevé (100% du débit cardiaque) et à une pression relativement basse (25 mm Hg).

La fonction principale de cette circulation est l'échange gazeux avec l'air présent dans la zone respiratoire ; le sang veineux, riche en gaz carbonique et pauvre en oxygène, est totalement réoxygéné au contact des alvéoles, puis regagne le cœur par les veines pulmonaires qui débouchent dans l'oreillette gauche.

Par ailleurs, le poumon reçoit un apport supplémentaire de sang en provenance de la circulation systémique. Les artères bronchiques, qui naissent de la crosse de l'aorte, fournissent du sang oxygéné à la trachée et aux voies aériennes centrales, ainsi que des nutriments aux différents constituant de l'arbre trachéo-bronchique (épithélium, muscle lisse, nerfs, etc.). En cas d'obstruction de la circulation pulmonaire (embolie), la circulation systémique apporte, par un mécanisme de dilatation et de connexions avec le lit capillaire, du sang à la zone alvéolaire [6].

1.4. Ventilation pulmonaire

La fonction dynamique des poumons est le processus de ventilation, c'est-à-dire l'entrée et la sortie de l'air des poumons. L'aspect le plus important de ce processus est la coordination entre la ventilation alvéolaire, qui correspond à la quantité d'air qui transite par la région où se produisent les échanges gazeux, et la perfusion. Dans des conditions physiologiques normales, le rapport ventilation/perfusion, V/P, est compris entre 0,8 et 1,2. Comme nous l'avons souligné précédemment, le débit sanguin est élevé et constant (au repos) dans la circulation pulmonaire. Par contre, la ventilation dépend fortement du volume pulmonaire et de la façon d'inspirer. Il est donc plus facile de réguler la ventilation afin d'optimaliser ce rapport.

La ventilation alvéolaire par minute est inférieure au volume total d'air qui entre et sort du poumon par minute car la dernière fraction de chaque inspiration reste dans la zone conductrice, avant son expulsion du poumon. Cette fraction est considérée comme étant l'espace mort anatomique puisqu'aucun échange gazeux n'a lieu dans cette zone. Parallèlement, le volume d'air qui ventile la zone respiratoire, mais qui ne participe pas aux échanges avec le sang, représente l'espace mort alvéolaire. Chez les personnes saines, l'espace mort alvéolaire est quasi nul. Par contre, dans certaines conditions physiopathologiques, comme chez les insuffisants cardiaques, l'espace mort alvéolaire peut être significativement important, réduisant ainsi la ventilation alvéolaire. De même, une respiration rapide et peu profonde est caractérisée par un rapport V/P défavorable car les voies respiratoires supérieures sont ventilées préférentiellement à la zone alvéolaire [6, 8].

2. Mécanismes de déposition d'un aérosol et devenir des particules inhalées

La déposition de particules inhalées dans le tractus respiratoire peut être influencée par différents facteurs, parmi lesquels on retrouve la granulométrie et la densité des particules de l'aérosol, les paramètres de ventilation et la morphologie de l'appareil respiratoire. L'efficacité des principaux mécanismes de déposition (Figure 5), que sont l'impaction inertielle, la sédimentation, la diffusion et dans une moindre mesure l'interception et l'attraction électrostatique, sera directement liée à ces variables [17].

 L'impaction se produit principalement au niveau de la sphère oropharyngée et des dix premières générations de bronches, où l'air est très turbulent et change brusquement de direction. Ce mécanisme est prépondérant pour les particules dont le diamètre est supérieur à 5 µm. À cause de leur inertie, ces particules ne sont plus entraînées par le flux d'air et poursuivent une trajectoire rectiligne.

 La sédimentation concerne surtout les voies périphériques au niveau desquelles le mouvement de l'air est pratiquement laminaire. Les particules de taille comprises entre 0,5 à 5µm, présentant une masse suffisante, s'y déposent essentiellement sous l'action de la force de gravité. La diffusion est prépondérante pour les particules submicroniques qui sont animées du mouvement Brownien. Elles sont bombardées de manière aléatoire par les molécules gazeuses jusqu'à ce qu'elles soient projetées sur les parois des voies respiratoires.

 L'interception est généralement significative pour de longues particules fibreuses dont la partie distale entre en contact de façon « accidentelle » (non liée à l'inertie) avec la paroi des voies respiratoires.

 Enfin, la génération mécanique des aérosols peut produire des charges électriques susceptibles d'interagir avec les charges présentes à la surface de l'épithélium pulmonaire.





2.1. Facteurs influençant la déposition pulmonaire

2.1.1. Influence de la granulométrie des particules

Parmi les facteurs influençant le profil de la déposition pulmonaire d'un aérosol, on retrouve principalement la taille des particules inhalées. Elle est, le plus souvent, exprimée en termes de diamètre aérodynamique (d_{ae}) afin de tenir compte à la fois du diamètre géométrique, de la forme et de la densité des particules.

Le d_{ae} peut être défini comme étant le diamètre d'une particule sphérique de densité unitaire ayant la même vitesse de dépôt que la particule mesurée. Il est calculé selon la relation suivante :

$$d_{ae} = \rho^{1/2} d_{geom}$$
(1)

Où d_{géom}: diamètre géométrique de la particule,
 et ρ: densité de la particule.

On considère en général que les particules efficaces, c'est-à-dire celles qui atteignent le poumon, sont celles qui présentent un d_{ac} compris entre 0,5 et 5 μ m. Les particules dont le d_{ac} est supérieur à 5 μ m se déposent essentiellement par impaction inertielle au niveau des voies aériennes supérieures, tandis que la grande majorité des particules de taille inférieure à 0,5 μ m, animées du mouvement Brownien, est susceptible d'être éliminée durant l'expiration [7, 18]. A titre d'exemple, Zanen et al. [19] ont mesuré chez des sujets asthmatiques l'action bronchodilatatrice de trois aérosols à base d'ipratropium dont les diamètres aérodynamiques médians massiques (DAMM) étaient, respectivement, de 1,5 μ m, 2,8 μ m et 5 μ m. Ils ont observé une activité similaire pour les particules de 1,5 et 2,8 μ m, alors que celles de 5 μ m étaient moins efficaces. Ils expliquent cela par le fait que les particules les plus fines au niveau des voies aériennes supérieures, induisant ainsi une diminution de la dose en principe actif au niveau du site d'action. La taille des particules est, par conséquent, un critère primordial qui influence considérablement le site de déposition et donc la fraction respirable de la formulation médicamenteuse administrée.

Par ailleurs, l'humidité relative, présente à hauteur de 99,0 à 99,8% à la température corporelle dans la trachée et les voies respiratoires distales [20], peut également influencer le mécanisme et le site de déposition particulaire. Les substances hygroscopiques vont se charger en eau, ce qui modifiera leur forme, leur masse et par conséquent leur d_{ac} [21, 22].

2.1.2. Influence des paramètres de ventilation

L'importance des paramètres de ventilation est mise en évidence par l'augmentation significative de la quantité de particules déposée par impaction dans les voies respiratoires supérieures lorsque le flux inspiratoire s'intensifie [23]. À l'inverse, la fraction particulaire, déposée dans la région alvéolaire par sédimentation et diffusion, est amplifiée lorsque le volume courant (Vt, volume tidal, c'est-à-dire le volume d'air mobilisé à chaque inspiration lors d'un cycle normal (en situation calme)) croît ou encore lorsque le patient retient son souffle pendant 2 à 6 secondes après la fin de l'inspiration [18, 24].

2.1.3. Influence de la morphologie du tractus respiratoire

La structure de l'arbre trachéo-bronchique, compte tenu des nombreuses bifurcations (angles d'embranchement) et des différents calibres et longueurs des conduits aériens présents au fur et à mesure que l'on pénètre profondément dans le poumon, conditionne le profil du flux d'air inspiré et de ce fait la déposition des particules inhalées. Plusieurs expérimentations ont mis en exergue l'influence que pourrait avoir la variabilité inter-sujets (du point de vue anatomique) sur la déposition de particules présentant une granulométrie identique [25-27]. Plus récemment, une étude plus théorique, basée sur la déposition particulaire, dans des conditions contrôlées (un volume courant de 750 ml, une fréquence respiratoire fixée à 12 min⁻¹, etc.), sur dix modèles pulmonaires morphométriquement différents [28], a confirmé cette influence puisque la déposition de particules de même granulométrie variait de 20 à 30 % en moyenne (Figure 6).



Figure 6 : Valeurs extrêmes et moyennes de la déposition de particules de 1µm (a) et 10 µm (b) en fonction des embranchements de l'arbre trachéo-bronchique de dix modèles pulmonaires morphométriquement différents [28].

2.2. Clairance pulmonaire

Du fait de l'énorme surface d'échange avec l'environnement externe, le système respiratoire a élaboré des mécanismes de défense efficients protégeant les tissus des voies aériennes de la pénétration de corps étrangers. Comme nous l'avons évoqué plus haut, les particules déposées au niveau de la zone dite de conduction sont directement éliminées par l'escalateur mucociliaire. Celles qui se retrouvent au niveau alvéolaire sont susceptibles d'être transportées vers la région ciliée (zone de conduction) ou bien phagocytées par les macrophages. Lors de la clairance alvéolaire, les particules adhèrent à la surface des macrophages via des interactions électrostatiques ou via des récepteurs spécifiques à certaines macromolécules telle que les immunoglobulines [16], puis elles sont intériorisées, suite à la formation de pseudopodes, de vacuoles ou de cavitations de surface, avant d'être digérées par

une variété d'enzymes contenues dans les lysosomes [29]. Par après, les macrophages empruntent la voie mucociliaire avant d'être éliminés par le tractus gastro-intestinal ou bien migrent à travers l'épithélium alvéolaire (vers l'espace interstitiel) pour gagner directement les ganglions lymphatiques. Il est à noter que la phagocytose est dépendante de la taille et de la composition chimique des substances étrangères [30, 31]. Des particules de 6 µm sont capturées et digérées plus lentement que celles dont le diamètre est de 3 µm, alors que celles qui sont inférieures à 0,26 µm n'interagissent quasiment pas avec les macrophages [32].

Par ailleurs, il existe un autre mécanisme d'élimination par résorption qui repose sur le transport des particules dissoutes à travers l'épithélium pulmonaire. Les substances hydrophobes, solubilisées dans la fine couche du fluide épithélial tapissant la paroi alvéolaire, diffusent à travers les cellules épithéliales jusqu'à l'interstice puis dans la lumière des capillaires (Figure 7). Ce passage s'effectue par diffusion simple à une vitesse déterminée par le coefficient de partage des substances concernées [33, 34]. Les substances hydrophiles sont, quant à elles, transportées lentement par diffusion limitée à travers les pores aqueux ; la vitesse de diffusion y est inversement proportionnelle à leur poids moléculaire et limitée par la perméabilité de l'épithélium. Cette dernière, étant dix fois moindre que la perméabilité de l'endothélium capillaire [34, 35], constitue souvent l'étape limitante de la résorption des substances hydrophiles. En outre, il existe, pour certaines substances, des récepteurs spécifiques au niveau de l'épithélium alvéolaire qui assurent le passage par transport actif ou par diffusion facilitée [36, 37].



Figure 7 : Représentation schématique du transport des gouttelettes d'aérosol au niveau de la membrane alvéolo-capillaire [34].

Enfin, le poumon est doté d'un arsenal enzymatique complexe, bien que largement moins actif que celui du tractus gastro-intestinal, capable de métaboliser certains xénobiotiques. On répertorie pas moins de quarante systèmes enzymatiques différents dont le plus étudié est le complexe Cytochrome P450 qui convertit les substances lipophiles en métabolites plus hydrophiles [6].

3. Dispositifs d'inhalation

Actuellement, il existe trois systèmes d'administration de médicaments par la voie pulmonaire. Il s'agit des nébuliseurs, des aérosols doseurs (AD) ou MDI (Metered Dose Inhalers) et des inhalateurs à poudre sèche (IPS) ou DPI (Dry Powder Inhalers).

Un bon dispositif requiert la génération d'un aérosol dont la plupart des particules actives ont un $d_{ae} < a 10 \ \mu m$, idéalement compris entre 0,5 et 5 μm . La dose délivrée doit être reproductible et la stabilité physique et chimique du médicament préservée. Par ailleurs, le système doit être facilement utilisable par le patient.

A côté de ces critères dits « essentiels », les fabricants prennent de plus en plus en considération le coût, le design ou encore d'autres paramètres pouvant améliorer la compliance du patient (inhalateur multidose, indicateur de doses, etc.) lors de la conception de nouveaux dispositifs [38, 39].

3.1. Les nébuliseurs

Les nébuliseurs sont les dispositifs les plus anciens, leur utilisation dans le traitement des affections respiratoires remonte au début du XIX^{ème} siècle [40].

Traditionnellement, ce système requiert un courant de gaz comprimé (nébuliseur pneumatique), qui par effet venturi, va générer de fines gouttelettes d'aérosol à partir d'une solution ou une suspension contenant le principe actif. La zone de dépression, créée par le passage forcé du gaz comprimé à travers un tube de faible diamètre, induit l'aspiration de la partie superficielle du liquide qui se vaporise sous forme de fines gouttelettes au contact du courant gazeux circulant à très haute vitesse. Un système de filtration inertielle permet, par la disposition d'un « écran » approprié (paroi brise-jet), de retenir les gouttelettes les plus larges (Figure 8). Alternativement au nébuliseur pneumatique, le nébuliseur à ultrasons (Figure 9) repose sur l'utilisation de cristaux piézo-électriques oscillants dont les ondes ultrasoniques de haute fréquence (> à 100 kHz) fournissent l'énergie nécessaire pour atomiser le liquide.



Figure 8 : Illustration des composants d'un nébuliseur pneumatique [41].

Les liquides pour nébulisation, composés de principes actifs se trouvant en solution ou en suspension dans des liquides aqueux, contiennent généralement des adjuvants pour assurer la stabilité physico-chimique du produit. Parmi les produits couramment employés, nous retrouvons des antimicrobiens (chlorbutanol, parabens, etc.), des agents stabilisants (EDTA, métabisulfite), des édulcorants tel que le saccharinate de sodium, ainsi que des sels et des acides pour ajuster la tonicité et le pH des formulations.

Le principal avantage des nébuliseurs réside dans la génération de fines gouttelettes indépendamment des mouvements respiratoires. Par conséquent, ces appareils peuvent être utilisés chez les patients, tels que les jeunes enfants, les patients âgés ou inconscients, incapables de coordonner leurs mouvements respiratoires avec la génération de l'aérosol [42, 43]. En outre, ils représentent le système d'administration idéal pour les dérivés peptidiques ou pour des systèmes encapsulés tels que les liposomes [44] et les microsphères [45] dont les formulations sont particulièrement adaptées à ce type de dispositif.



Figure 9 : Illustration des composants d'un nébuliseur à ultrasons [41].

Néanmoins, les nébuliseurs sont généralement très encombrants, requièrent un nettoyage régulier et présentent des rendements de nébulisation très faibles. La quantité importante de liquide piégée dans le volume mort de l'appareil, une distribution de taille particulaire assez large ainsi que la libération en continu de l'aérosol (aussi bien pendant la phase inspiratoire qu'expiratoire du patient) font que la fraction pulmonaire ne dépasse guère les 10 % de la dose nominale [46, 47].

Pour remédier à ces problèmes majeurs et afin d'améliorer la compliance du patient, les nébuliseurs connaissent des développements permanents. Parmi les innovations récentes, citons l'utilisation de récepteurs/capteurs électroniques permettant de générer l'aérosol uniquement pendant l'inspiration du patient, la miniaturisation des dispositifs ou encore le développement de systèmes reposant sur l'atomisation, à travers de micro-orifices, d'un liquide à très haute pression et formant des gouttelettes plus fines [48, 49].

3.2. Les aérosols doseurs (AD)

Il s'agit du système de délivrance d'aérosols le plus fréquemment rencontré depuis les années 1950. Les aérosols doseurs présentent trois composants principaux (Figure 10):

> Un réservoir contenant la substance active en solution ou en suspension dans le gaz propulseur liquéfié (propellant).

- Une valve doseuse permettant de délivrer une dose précise et reproductible de médicament
- Un système d'activation.



Figure 10 : Illustration des composants d'un aérosol doseur [41].

Dans ce cas, le gaz líquéfié est en équilibre avec sa tension de vapeur. Lorsque la valve doseuse est activée, la quantité souhaitée de médicament est éjectée sous l'effet de pression du liquide propulseur en ébullition. Le mélange liquide-vapeur en expansion génère des gouttelettes dont le processus de formation est identique à celui décrit pour la nébulisation. L'évaporation quasi-instantanée du liquide propulseur permet l'obtention de particules dont la distribution de taille est plus uniforme que celle des particules obtenues par nébulisation (Figure 11).

Les gaz les plus communément utilisés sont les gaz aux chlorofluorocarbones (CFC), tels que le CFC-11 (trichlorofluorométhane), le CFC-12 (dichlorodifluorométhane) et le CFC-114 (dichlorotétrafluoroéthane). Ils sont généralement combinés dans les formulations de manière à atteindre des valeurs de tension de vapeur, de densité du liquide et de solubilité adéquates [38].

Les CFC sont intéressants de par leur tolérance et leur faible toxicité pulmonaire ainsi que leur pureté et stabilité chimiques élevées. De plus ils ne sont pas inflammables et sont compatibles avec la plupart des matériaux utilisés.



Figure 11 : Schéma illustrant le mécanisme de formation des particules à partir d'un aérosol doseur [38].

Malheureusement, seule une faible fraction de la dose délivrée, ne dépassant généralement pas les 20 %, se dépose dans les voies respiratoires profondes. Ce faible rendement est dû essentiellement à la vitesse importante à laquelle le gaz propulseur expulse les particules ($v > 30 \text{ m.s}^{-1}$) qui viennent s'impacter au niveau de la sphère oropharyngée [39] et au manque de coordination entre l'activation du dispositif et l'inspiration pour certaines catégories de patients (les jeunes enfants, les patients âgés ou inconscients). Des chambres d'inhalation ont, dès lors, été mises au point pour pallier à ces problèmes. Le principe est d'introduire un espace entre la sortie de l'aérosol et l'orifice buccal du patient en vue de réduire la vitesse des particules et entraîner l'évaporation complète du gaz propulseur tout en éliminant le besoin de synchronisation. La déposition pulmonaire n'est pas améliorée pour autant, mais ce système a permis de réduire de manière considérable la déposition oropharyngée [38].

Par ailleurs, la capacité de contenance de la valve doseuse est généralement comprise entre 25 et 100 µL. De ce fait, la quantité de PA délivrée est limitée (doses de l'ordre de 10 à 500 µg).

Enfin, l'inconvénient majeur de ces dispositifs est l'impact nocif des gaz propulseurs utilisés sur l'environnement. En effet, les CFC contribuent à la destruction de la couche d'ozone et sont progressivement remplacés par les hydrofluoroalcanes (HFA); les plus connus étant le HFA 134a (tétrafluoroéthane) et le HFA 227 (heptafluoropropane). Toutefois, le passage aux dérivés HFA continue de nécessiter d'importantes optimisations galéniques ainsi que la mise en œuvre de nombreux essais de toxicité.

3.3. Les inhalateurs à poudre sèche (IPS)

Le principe de fonctionnement des inhalateurs à poudre sèche (IPS) repose sur l'utilisation de l'énergie fournie par l'inhalation du patient pour disperser la poudre contenant le principe actif. Les IPS représentent une bonne alternative aux aérosols doseurs (AD) puisqu'ils ne contiennent pas de CFC et surtout ne requièrent aucune synchronisation entre l'inhalation et l'activation. De plus, de nombreuses études de déposition, aussi bien in vitro que in vivo, ont démontré que la déposition pulmonaire, pour une substance active donnée, est significativement plus importante lors de l'administration via un IPS comparativement aux autres dispositifs d'inhalation [50].

Les IPS peuvent être classés en deux catégories :

Les systèmes unidoses :

Ils sont équipés d'un réservoir ne pouvant contenir qu'une dose unitaire. La quantité de poudre est préconditionnée dans des gélules emballées dans des blisters pour les préserver de l'humidité (Cyclohaler[®] = Aeroliser[®], Rothaler[®], Spinhaler[®], etc.).

Les systèmes multidoses :

Ils sont équipés d'un réservoir multidoses. La quantité de poudre souhaitée (unitaire) est prélevée à l'aide d'une valve doseuse (Turbohaler[®]), ou bien, elle est préconditionnée dans des blisters (système multi-unidoses : Diskhaler[®], Diskus[®], etc.).

Quelle que soit leur catégorie, les IPS sont tous dotés d'un mécanisme d'aérosolisation et de désagrégation des amas de poudre et d'un adaptateur pour diriger l'aérosol dans la bouche du patient [38]. A titre d'exemple, dans le Spinhaler[®], la gélule est percée au moyen de deux fines aiguilles puis une hélice est activée lors de l'inhalation et permet de disperser les particules dans le flux d'air (Figure 12). Dans le Turbohaler[®], la dose requise est libérée par un système à roulette située à la base de l'appareil. Lorsque le patient inhale, le flux d'air, passant à travers des canaux tortueux et spiralés, devient turbulent et favorise la dispersion des amas de particules qu'il véhicule (Figure 13).



Figure 12 : Illustration des composants du Spinhaler[®] [38].



Figure 13 : Illustration des composants du Turbohaler® [38].

Actuellement, de nombreuses innovations tendent, en fournissant une « énergie » supplémentaire, à rendre la désagglomération et la dispersion de la poudre indépendante du flux inspiratoire du patient. Citons par exemple l'utilisation de micro-moteurs à hélice, l'incorporation de compresseurs à air ou encore l'usage combiné de composants piézoélectriques [48, 49].

3.3.1. Facteurs affectant l'efficacité des IPS

Il est évident que l'efficacité pharmacologique des molécules administrées par inhalation dépend étroitement de la fraction de particules actives atteignant la zone cible quel que soit le dispositif utilisé. Or, compte tenu de l'implication du flux inspiratoire du patient lors de l'administration via un IPS, la désagglomération et la redispersion des particules constituent dans ce cas-ci le facteur déterminant de la déposition pulmonaire. Celui-ci est conditionné par deux paramètres étroitement liés : la formulation proprement dite et le design du dispositif.

3.3.1.1. La formulation

On admet que pour atteindre les poumons, les particules de principe actif (PA) doivent avoir un diamètre aérodynamique compris entre 0,5 µm et 5 µm [7, 18]. Or, les particules micronisées sont caractérisées par des forces interparticulaires importantes qui rendent la poudre cohésive et entravent la redispersion sous forme de particules individualisées.

Les forces de Van der Waals ainsi que les forces capillaires et électrostatiques constituent les principales forces d'interaction interparticulaires. Elles sont influencées par différents paramètres incluant la densité particulaire, la taille et la distribution de taille, et les propriétés de surface des particules (forme, rugosité des surfaces, charges électriques, etc.).

Pour rappel, les forces de Van der Waals sont des forces additives qui peuvent être atténuées en augmentant la distance de séparation interparticulaire (diminution de la densité, modification de la rugosité de surface, etc.). Les forces électrostatiques sont des forces interparticulaires liées aux différentes charges surfaciques des particules en présence ; elles sont attractives ou répulsives selon la répartition des charges. Elles décroissent en milieu humide au profit des forces capillaires. Lorsque l'humidité relative de l'air ambiant dépasse 65 %, de l'eau se condense à la surface des particules et des ponts liquides se forment dans les espaces interparticulaires

Plusieurs approches ont été envisagées pour améliorer la redispersion des poudres. Parmi les méthodes employées, la « sphéronisation » ou « pelletisation », qui consiste à contrôler l'agrégation des particules micronisées dans un mélangeur à cuve mobile (rotating blender), de manière à obtenir un agglomérat lâche possédant des forces d'interaction interparticulaires assez faibles et de bonnes propriétés d'écoulement [51, 52]. Le Pulmicort Turbohaler[®] est un exemple d'IPS contenant uniquement de la budésonide sous forme d'agglomérats de particules (Figure 14).



Figure 14 : Image prise par microscopie électronique représentant un agglomérat de particules de budésonide contenu dans le Pulmicort Turbohaler[®] [53].

Une autre approche consiste à mélanger les particules micronisées à des transporteurs de granulométrie grossière dont le diamètre est généralement compris entre 30 et 90 µm [51]. Ces transporteurs doivent être physiquement et chimiquement inertes et sont censés ne pas exercer d'effets nocifs sur le tractus respiratoire. Notons tout de même que le nombre d'excipients dont l'innocuité a été démontrée en inhalation est extrêmement limité à l'heure actuelle, les hydrates de carbone, et plus particulièrement le lactose et le mannitol étant les composés les plus couramment utilisés.

L'incorporation d'un tel excipient permet non seulement de favoriser la dispersion de la poudre en s'interposant entre les particules actives, mais lui confère également de bonnes propriétés d'écoulement, améliorant ainsi considérablement le remplissage des gélules et/ou du réservoir. De plus, dans le cas de formulations très faiblement dosées en PA, le mélange physique PA/excipient assure, par un effet de dilution, une meilleure uniformité des doses délivrées [54-57]. Enfin, de par son goût et le fait qu'il se dépose principalement dans la zone oropharyngée, l'excipient procure au patient une sensation (souvent irritante) lui indiquant la prise effective du médicament [58].
Toutefois, les forces d'adhésion PA-transporteur doivent être réversibles afin de permettre une redispersion optimale des particules actives. Plusieurs facteurs influençant ces forces d'adhésion sont à prendre en considération lors de la mise au point et de l'optimisation de formulations délivrées par un inhalateur à poudre sèche. Parmi ceux-là, on retrouve les propriétés de surface des particules de PA ou de l'excipient porteur, le rapport pondéral PA/transporteur ou encore l'addition d'un excipient compétiteur.

D'après Staniforth [59], la surface du transporteur présente des sites à haute capacité de liaison pour les particules de PA ainsi que des sites de faible affinité. Les premiers sont d'autant plus nombreux que la surface est rugueuse, et entravent la redispersion des particules actives. Par ailleurs, lorsque la quantité en PA dans le mélange augmente, les particules actives saturent logiquement les sites à haute affinité (hA) puis ceux à faible affinité (fA). L'excédent éventuel des particules de PA s'agglomère en amas et est souvent à l'origine du phénomène de ségrégation particulaire et de démélange de la formulation. On comprend aisément qu'en vertu de cette théorie, un rapport pondéral PA/excipient porteur trop faible ou trop élevé est à proscrire.

En outre, un second excipient, beaucoup plus fin, peut être ajouté en faible proportion dans le mélange binaire en vue de modifier ces forces d'adhésion. Généralement, l'excipient micronisé est préalablement mélangé au transporteur grossier dans le but de saturer les sites à haute affinité puis le PA est incorporé. Le stéarate de magnésium, la L-leucine, des phospholipides ou encore plus classiquement des hydrates de carbone de granulométrie fine sont des exemples d'excipients compétiteurs. Zeng et al. [60] ont mis en exergue l'impact positif de l'addition d'un second excipient, dit compétiteur, sur l'homogénéité et la dispersion d'un mélange binaire lactose-dipropionate de béclométhasone. Ainsi, il a été démontré que le mélange était homogène lorsque le PA était ajouté en dernier, et que la formulation contenant 2,5% (m/m) de lactose micronisé présentait une dose particulaire fine significativement plus importante que le mélange binaire dans des conditions opératoires identiques (débit d'air, inhalateur, etc.).

3.3.1.2. Le dispositif

Contrairement aux autres types d'inhalateurs, l'activation et l'efficacité des IPS dépendent du débit inspiratoire du patient. Ces dispositifs doivent être en mesure de créer des zones de turbulence suffisamment puissantes afin de provoquer la désagrégation des amas de PA et/ou la rupture des forces d'adhésion PA-transporteur chez tous les patients, y compris chez ceux dont le flux inspiratoire est faible (enfants, personnes âgées, et malades sévèrement atteints).

Un moyen efficace pour augmenter le niveau de turbulence consiste à faire passer l'air à travers un chemin très étroit et tortueux (Turbohaler[®]). Néanmoins, l'amplification de la turbulence entraîne généralement une augmentation de la résistance à l'air du dispositif [61]. Celle-ci correspond à la fraction du débit inspiratoire (du patient) qui est « absorbé » par l'inhalateur, elle représente la constante de proportionnalité entre la racine carrée de la chute de pression (Δ PD) se développant dans l'IPS et le flux d'inhalation [62] :

$$\Delta PD^{\frac{1}{2}} = (PA-Poral)^{1/2} = RD.Q$$
⁽²⁾

Où PA : Pression atmosphérique, Poral : Pression dans la cavité buccale, RD : Résistance spécifique du dispositif,

et Q : Flux d'inhalation.

Clark et Hollongworth [61] ont créé un système simple permettant de mesurer cette résistance de façon précise. Le système consiste à coupler à l'IPS un débitmètre et une chambre de capacité de 2 litres, reliée à un manomètre, à une pompe à vide et à une valve de sortie. Pour différentes valeurs de pression exercées sur l'inhalateur, le flux correspondant a été mesuré. La Figure 15 représente la relation qui existe entre la racine carrée de la pression de goutte et le flux d'inhalation pour six dispositifs commercialisés. La résistance spécifique (R_D) correspond à la pente obtenue pour chaque dispositif.

Les R_D des IPS testés sont repris dans le Tableau 2. Les inhalateurs unidoses (Rotahaler[®], Spinhaler[®], ISF Inhaler = Aeroliser[®]) présentent une résistance plus faible que les dispositifs multidoses (Diskhaler[®], Turbohaler[®], Inhalator[®]). Ces derniers nécessitent l'assemblage d'un plus grand nombre de pièces, ce qui pourrait expliquer leur résistance accrue au passage de l'air comparativement aux unidoses dont la conception est nettement plus simple.

Les IPS peuvent être répartis en trois catégories selon la valeur de leur résistance spécifique [63] :

- les dispositifs à faible résistance : R_D < 0,05 cm H₂O^{1/2} / L.min⁻¹.
- Les dispositifs à moyenne résistance : $0.05 < R_D < 0.1 \text{ cm } H_2O^{1/2} / L.min^{-1}$.
- Les dispositifs à haute résistance : R_D > 0,1 cm H₂O^{1/2} / L.min⁻¹.



Figure 15: Relation entre la chute de pression et le flux d'inhalation pour six IPS commercialisés [61].

Dispositif	Résistance spécifique (cm H ₂ O ^{1/2} /L.min ⁻¹)	
Rotahaler	0,04	
Spinhaler	0,051	
Cyclohaler (ISF inhaler)	0,055	
Diskhaler	0,067	
Turbohaler	0,10	
Inhalator	0,18	

Tableau 2 : Résistance spécifique de six IPS commercialisés [61].

Les inhalateurs présentant une grande résistance sont généralement les plus aptes à provoquer la redispersion des agglomérats de particules [38, 64]. Cependant, en « absorbant » considérablement le flux inspiratoire, ils peuvent s'avérer inadéquats, voire dangereux pour les personnes présentant un débit inspiratoire initial faible.

L'influence de la résistance spécifique des IPS sur le flux inspiratoire maximal (FIM) a été étudiée chez le volontaire sain [61, 65]. La Figure 16 révèle une bonne corrélation entre ces deux paramètres, le FIM est d'autant plus petit que la R_D du dispositif utilisé est élevée. À titre d'exemple, le FIM est réduit de plus de 76 % lors de l'inspiration via l'Inhalator[®] (Tableau 3). Il serait dès lors judicieux d'arriver à un bon compromis entre ces deux paramètres divergents, en utilisant par exemple un inhalateur caractérisé par une R_D moyenne.

Tableau 3 : Flux inspiratoires maximaux (FIM) chez des volontaires sains de sexe masculin et féminin, en présence et en absence de différents dispositifs d'inhalation [65].

Dispositif	FIM (L/min) (movenne ± d.s)		Réduction du FIM	
	Homme	Femme	Homme	Femme
Blanc (control)	333 ± 98	214 ± 71		
Rotahaler	216 ± 46	160 ± 44	$33,3\pm9,7$	$24{,}4\pm10{,}6$
Spinhaler	186 ± 41	134 ± 36	$42,9\pm9,4$	$35,7\pm11,8$
Turbohaler	82 ± 13	56 ± 13	$74,7\pm4,1$	$72,9\pm4,1$
Inhalator	70 ± 19	48 ± 13	$78,\!4\pm4,\!4$	$76,5\pm5,1$



Figure 16 : Relation entre la résistance spécifique des IPS et le flux inspiratoire maximal chez le volontaire sain [61].

Dans le cadre de notre étude expérimentale, nous avons opté pour le dispositif unidose Aeroliser[®]. Celui-ci, bien qu'étant moyennement résistant, présente une capacité de redispersion importante grâce aux effets combinés de l'inspiration du patient et du passage de la poudre à travers une grille, de maillage approprié, disposée à la base de l'inhalateur (cf. IV.2.3.2. Evaluation des performances d'aérosolisation)

4. Evaluation des formes pharmaceutiques administrées par la voie pulmonaire

Différentes techniques, aussi bien in vitro que in vivo, ont été élaborées afin de caractériser les formulations destinées à être administrées par inhalation et d'évaluer au mieux leur performance d'aérosolisation.

4.1. Méthodes in vitro

4.1.1. Evaluation des caractéristiques physiques

Les caractéristiques physiques (taille, forme, densité, etc.) des particules ont bien évidemment une influence critique sur les performances des formes inhalées. Elles font l'objet d'études approfondies lors de la phase de développement. La microscopie électronique à balayage, par exemple, permet notamment l'étude des propriétés de surface de l'excipient et du principe actif (interactions PA-PA et/ou PA-excipients). Lorsqu'elle est couplée à la cartographie (« mapping » : détection et/ou quantification d'un atome particulier de la molécule active), elle renseigne davantage sur l'homogénéité de répartition du PA. En ce qui concerne la détermination de l'état physique et des propriétés thermiques, la calorimétrie à balayage différentiel et la diffraction aux rayons X constituent les techniques les plus couramment employées. La taille et la distribution de taille particulaire peuvent être estimées rapidement par diffraction laser. Cette technique se caractérise par sa flexibilité, permettant la mesure de particules dont la morphologie peut être variable et complexe, et sa capacité à obtenir facilement et de manière quasi-instantanée des mesures précises [66-68]. Elle comprend deux méthodes de mesure :

- La méthode dite classique qui mesure la taille des particules après désagglomération en utilisant un dispositif approprié.
- La méthode adaptée aux formes pulmonaires, qui mesure la taille des particules à leur sortie du dispositif d'inhalation dans des conditions « réelles » d'utilisation.

Le principe de fonctionnement des appareillages servant à évaluer les caractéristiques physiques citées ci-dessus sera détaillé dans la partie expérimentale.

4.1.2. Evaluation des propriétés aérodynamiques

Afin d'évaluer au mieux le comportement aérodynamique des aérosols, la Pharmacopée Européenne décrit des méthodes se basant sur le fractionnement et la collecte des particules sur impacteurs [69]. Il s'agit en quelque sorte de modèles de tractus respiratoire artificiel dans lesquels les formulations sont testées dans des conditions simulant au mieux la situation in vivo.

Le principe de fonctionnement des impacteurs repose sur le passage du flux d'air véhiculant le nuage de particules à travers des orifices de plus en plus étroits séparés par des plateaux dits d'impaction. Ces dispositifs tiennent compte du diamètre et de la densité des particules ; celles dont l'inertie excède une certaine valeur vont poursuivre une trajectoire rectiligne et donc s'impacter sur les plateaux, les autres restent en suspension dans l'air et continuent leur chemin. En pénétrant plus profondément dans le dispositif, le flux d'air devient de plus en plus rapide, et force les particules les plus petites à s'impacter progressivement à leur tour au niveau des étages inférieurs (Figure 17).



Figure 17 : Mécanisme de déposition particulaire dans un impacteur [70].

Cinq types d'impacteurs sont décrits et recommandés par la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition pour l'évaluation aérodynamique des particules fines [69]:

4.1.2.1. L'impacteur en verre à deux étages (Glass Impinger)

Il s'agit d'un appareil d'utilisation simple, permettant d'évaluer rapidement mais de manière approximative les performances aérodynamiques d'un aérosol donné. Il est constitué d'un élément coudé mimant la gorge du patient, d'une partie supérieure et d'une partie inférieure contenant, toutes les deux, un volume donné de liquide (Figure 18a). Contrairement aux impacteurs multi-étages, il ne peut être utilisé qu'à un débit d'air de 60 L/min et les fractions de particules recueillies, selon qu'elles soient dans la partie supérieure ou inférieure, sont caractérisées par un $d_{ae} > ou < à 6,4 \mu m$.

4.1.2.2. L'impacteur à cascade multi-étages (Andersen Cascade Impactor)

Il se compose de huit plateaux, allant de l'étage 0 à 7, et d'un filtre terminal (Figure 18b). Le diamètre de coupure (d_{ce}) de chaque étage, correspondant à une efficacité de rétention de 50 % des particules (D(50)), est dépendant du flux d'air sélectionné.

C'est un impacteur qui, de par ses nombreux plateaux, donne des indications plus précises sur la répartition granulométrique des particules. Néanmoins, son utilisation ne nécessite pas d'eau et de ce fait, la corrélation in vitro / in vivo est parfois difficile à établir puisqu'il ne permet pas de rendre compte de l'impact éventuel de l'humidité sur le comportement aérodynamique des particules.

4.1.2.3. L'impacteur liquide multi-étages (Multi-stage Liquid Impinger)

Il s'agit du dispositif le plus couramment utilisé. Il comporte quatre étages de dépôt, numérotés de l à 4, contenant une quantité donnée de liquide mimant le taux d'humidité résiduel rencontré dans les voies respiratoires, et un étage de filtration intégré (étage 5) (Figure 18c). Les d_{ce} sont également dépendants du débit d'air auquel se fait la mesure.

4.1.2.4. L'impacteur de « nouvelle génération » (Next Generation Impactor)

Récemment, un impacteur a été développé dans l'optique de remplacer l'impacteur de type Andersen. Cet impacteur de « nouvelle génération » se compose de sept plateaux de dépôt horizontaux et d'un collecteur terminal à micro-orifices (Figure 18d). Sur la plage de débit allant de 30 L/min à 100L/min, les d_{ce} s'échelonnent de 0,24 µm à 11,7 µm, à intervalles constants sur une échelle logarithmique. Sur cette plage de débit, l'appareil comporte toujours au moins cinq étages dont les D(50) se situent entre 0,5 µm et 6,5 µm.

Sa conception horizontale et l'utilisation de coupelles d'impaction amovibles, se caractérisant par des d_{ce} mieux répartis, facilitent la récupération des particules s'y impactant et permettent une caractérisation encore plus précise de la distribution granulométrique des particules.



Figure 18 : Schémas des différents impacteurs [69] : a) l'impacteur en verre à deux étages,

- b) l'impacteur à cascade de type Andersen,
- c) l'impacteur liquide multi-étages,
- d) l'impacteur NGI.

4.1.2.5. Expression des résultats de déposition

La Pharmacopée Européenne recommande d'exprimer les résultats de déposition particulaire en termes de Dose Particulaire Fine (DPF). Celle-ci correspond à la masse de principe actif possédant un diamètre aérodynamique inférieur à 5 µm. Elle est obtenue par interpolation à partir de la courbe représentant la masse cumulée de principe actif recueillie sur les différents étages de l'impacteur en fonction de la granulométrie seuil des étages correspondants (d_{ce}). Une seconde façon d'exprimer les résultats est la fraction pulmonaire (FP) qui représente le quotient (en %) de la dose particulaire fine par rapport à la dose nominale. Cela permet une comparaison directe entre différentes formulations quelle que soit la teneur en substance active.

Si nécessaire, deux autres paramètres peuvent être mesurés:

- Le diamètre aérodynamique médian massique (DAMM), qui correspond au diamètre pour lequel 50 % des particules déposées dans l'impacteur ont un diamètre plus petit et 50 % ont un diamètre plus grand.
- L'écart-type géométrique (ETG), qui permet de déterminer l'étendue de la distribution de taille des particules. Il est calculé selon la formule suivante :

ETG =
$$\sqrt{\frac{d_{ac} \, 84.13\%}{d_{ac} \, 15.87\%}}$$
 (3)

Où d_{ae} 84.13% correspond au diamètre aérodynamíque interpolé à 84.13% de la fréquence cumulée de PA recueillie dans l'impacteur.

Et d_{ae} 15.87% correspond au diamètre aérodynamique interpolé à 15.87% de la fréquence cumulée de PA recueillie dans l'impacteur.

Un aérosol est considéré en général comme étant monodisperse lorsque son ETG est inférieur à 1,22 [18].

4.2. Méthodes in vivo

En général, quel que soit le dispositif d'inhalation utilisé, seule une faible fraction (10 à 40 %) de la dose de PA administrée pénètre dans le poumon. La fraction majoritaire (60 à 90 %) atteint la sphère oropharyngée, puis rejoint la circulation générale via le tractus gastrointestinal (Figure 19). Les particules se déposant dans les voies respiratoires inférieures sont susceptibles d'agir localement, d'être résorbées à travers l'épithélium pulmonaire et atteindre la circulation systémique ou encore d'être éliminées suite à la clairance pulmonaire (escalateur mucociliaire et phagocytose par les macrophages alvéolaires).

Le devenir d'une molécule inhalée est par conséquent assez complexe ; plusieurs méthodes et modèles, tenant compte des facteurs pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, ont été mis au point dans le but d'évaluer la déposition et l'efficacité des formulations.

Nous aborderons dans cette partie les principales techniques relatives à l'évaluation in vivo de la déposition pulmonaire.



Figure 19 : Représentation schématique du devenir d'un médicament inhalé [72].

4.2.1. Les études pharmacocinétiques

Pendant tout un temps, l'évaluation de la déposition pulmonaire par une approche pharmacocinétique classique a été écartée, compte tenu de l'absence de techniques analytiques assez sensibles (la concentration plasmatique étant le plus souvent de l'ordre du pg/mL). Actuellement, avec l'utilisation de la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse, les études pharmacocinétiques (PK, Pharmacokinetic), fournissent des informations significatives sur le devenir des molécules inhalées. Les paramètres habituellement mesurés sont :

- L'AUC (Area Under the concentration-time Curve), l'aire sous la courbe de la concentration plasmatique d'un médicament en fonction du temps suivant son administration (en h.pg/mL).
- Le C_{max}, correspondant au pic de concentration plasmatique maximale (en pg/mL).
- Le T_{max}, correspondant au temps requis pour atteindre le pic maximal (en h).

Dans le cadre des études PK, la teneur mesurée tient compte à la fois de la fraction de particules actives ayant été absorbée via le tractus respiratoire et celle ayant été absorbée via le tractus gastro-intestinal. Il est, dès lors, impératif de connaître la biodisponibilité orale du PA en question pour établir avec exactitude la fraction pulmonaire (pour autant que la métabolisation au niveau du poumon soit négligeable).

Cela ne pose pas de problème pour les PA, tels que le propionate de fluticasone, qui se caractérisent par une biodisponibilité orale négligeable [73]; les paramètres PK mesurés reflètent exactement le comportement du PA dans le poumon. Pour les PA présentant une biodisponibilité orale significative (acétonide de triamcinolone, budésonide, etc.) [74, 75], différentes approches ont été élaborées afin d'estimer au mieux la déposition pulmonaire [76, 77].

Une première méthode consiste à soustraire à la biodisponibilité systémique la contribution orale du PA concerné. La biodisponibilité pulmonaire est donnée par la formule suivante :

$$F_{lung} = \frac{F_{syst} - F_{oral \times} (1 - ret)}{1 - F_{oral}}$$
(4)

43

Où,
$$F_{sys} = \frac{AUC_{inh} \times Dn}{AUC_{in'} \times D_{inh}} \times 100 , F_{oral} = \frac{AUC_{oral} \times Dn}{AUC_{in'} \times D_{oral}} \times 100$$

et,

@ret»: fraction de la dose retenue dans le dispositif d'inhalation et exhalée sur un filtre.

Flung: biodisponibilité pulmonaire.

F_{sys}: biodisponibilité systémique.

Foral : biodisponibilité orale.

AUC_{init}: aire sous la courbe de la concentration plasmatique en fonction du temps pour la forme inhalée.

AUC_{IV}: aire sous la courbe de la concentration plasmatique en fonction du temps pour la forme injectée par intraveineuse.

AUC_{oral}: aire sous la courbe de la concentration plasmatique en fonction du temps pour la forme administrée per os.

D: dose de principe actif.

Une autre méthode consiste à administrer per os du charbon actif, généralement au moment de l'inhalation puis une à deux heures plus tard, pour « bloquer » l'absorption par le tractus GI de la quantité de médicament déposée dans les voies respiratoires supérieures. Cette technique a été validée pour différents PA et continue à être utilisée actuellement.

Thorsson et al. [78] ont utilisé les deux méthodes en vue de comparer la déposition pulmonaire de la budésonide à partir du Turbohaler[®] et d'un aérosol doseur (AD) chez des volontaires sains. La Figure 20 représente les différents profils plasmatiques de la budésonide obtenus après une administration par voie orale en présence de charbon actif, ainsi qu'après une administration par voie inhalée via les deux dispositifs, avec ou sans prise concomitante du charbon.

Selon la première méthode, la déposition, en tenant compte d'une biodisponibilité orale de 13%, fut de 32% pour l'IPS et de 15% pour l'AD. En utilisant du charbon actif, le taux de déposition pulmonaire fut quasiment similaire à celui obtenu par la première technique: 32% pour l'IPS et 18% pour l'AD. La gélule de PA, avalée par les patients, a permis de s'assurer de l'efficacité du charbon actif; la biodisponibilité orale a été réduite de près de 80% (passant de 13% à 2,5%) et la fraction tout de même résorbée a été déduite des calculs de biodisponibilité.



Figure 20 : Concentrations plasmatiques moyennes de budésonide obtenue après : (a) inhalation via le Turbohaler (1mg); (b) via l'AD (1mg), avec (-----) ou sans (-----) prise concomitante de charbon actif, et après administration orale avec du charbon actif (-----) (4mg), chez 13 volontaires sains [78].

4.2.2. L'imagerie médicale

La technique in vivo la plus largement utilisée pour évaluer la déposition pulmonaire est celle se basant sur l'utilisation de radioéléments de courte durée de vie. Elle quantifie non seulement la dose de PA déposée dans le pournon mais permet également d'évaluer sa répartition dans les différentes zones du tractus respiratoire (voies supérieures, centrales et périphériques) [79].

Le marquage par radio-isotopes a été initialement introduit à des fins diagnostiques dans la médecine hospitalière nucléaire ; plusieurs éléments radioactifs ont été administrés aux patients dans le but d'obtenir des informations sur la structure et le fonctionnement de différents organes [80]. Le radio-isotope le plus utilisé est le technétium 99 métastable (^{99m}Tc) car il présente une période (de décroissance) radioactive adéquate (temps de demi-vie de 6h) et une énergie de rayonnement suffisamment élevée pour être repéré à travers les tissus corporels sans pour autant provoquer de dégâts tissulaires (140 KeV). Ce n'est que dans les années 1970 que cette technique fit son apparition dans le domaine pharmaceutique, servant à

évaluer le comportement et le devenir des médicaments dans l'organisme via différentes voies d'administration [81-83].

4.2.2.1. La scintigraphie gamma

Cette technique consiste à marquer la forme pharmaceutique à l'aide d'un radioisotope émettant des rayonnements gamma.

Lors de l'évaluation de formes inhalées, les scintillations, produites par le marqueur fixé à la surface des particules de PA, sont détectées par une caméra gamma à simple ou à double tête. Un traitement informatique complexe permet l'acquisition d'une image en 2D du poumon. Cette méthode fera l'objet d'un chapitre et sera donc développée ultérieurement.

4.2.2.2. SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)

La tomoscintigraphie par émission monophotonique repose sur le même principe de fonctionnement que la technique précédente, mais à la différence de la scintigraphie gamma, la SPECT tient compte de la structure tridimensionnelle du poumon. La caméra pivote autour du patient, prenant des images en provenance de 64 angles différents [84]. La répartition régionale (du PA) qui en résulte est de ce fait nettement plus précise.

En contrepartie, le temps d'analyse est beaucoup plus lent ; les 64 images sont généralement acquises en 16 minutes. Il est par conséquent souvent nécessaire d'employer une dose sensiblement plus élevée de radionucléide, ce qui, dans certains cas, peut limiter le nombre de bras d'une étude en cross-over de formes pharmaceutiques données [79].

4.2.2.3. PET (Positron Emission Tomography)

La tomographie par émission de posit(r)ons est bien connue et couramment utilisée dans le développement de nouvelles formes pharmaceutiques pour obtenir des images « fonctionnelles » en prenant en compte les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'une molécule donnée [85]. La PET nécessite l'usage de radio-isotopes émetteurs de positons tels que le ¹¹C et ¹⁸F. En percutant un électron, ils produisent une réaction d'annihilation électron-positon qui émet deux photons diamétralement opposés qui interagissent avec des récepteurs constitués de germanate de bismuth [86].

A la différence des deux autres techniques où le marquage se fait par l'intermédiaire d'un radio-isotope se fixant à la surface des particules, la PET se base sur le marquage direct de la molécule chimiquement active en permutant un atome de carbone, d'azote ou autre par un isotope émetteur de positrons. Cette approche quantifie directement la fraction de PA présente dans le poumon et permet d'évaluer sa clairance pulmonaire. Toutefois, la très courte durée de vie des radionucléides nécessite leur production par un cyclotron sur le site même de leur utilisation; les temps de demi-vie du ¹⁵O, ¹³N, ¹¹C sont respectivement de 2, 9 et 20 minutes, celui du ¹⁸F, plus adéquat, est de 110 minutes [79]. De plus, les rendements de la synthèse chimique sont faibles, ce qui requiert un travail à un niveau de radioactivité élevé.

En résumé, la SPECT et la PET, en permettant une visualisation en 3D de la distribution particulaire (Figure 21), seront privilégiées lors du ciblage d'une région précise du poumon. Autrement, pour des raisons pratiques (rapidité d'acquisition et simplicité d'utilisation) et parce qu'elle présente le meilleur rapport bénéfice-coût, la scintigraphie gamma reste la technique la plus largement utilisée. Elle offre la possibilité d'évaluer rapidement l'impact de différents paramètres sur la déposition pulmonaire de formes pharmaceutiques. Cela a permis, par exemple, de montrer comment la déposition pouvait être optimalisée en variant la technique d'inhalation [88, 89] ou en ajoutant une chambre d'expansion (spacer) à la sortie d'un aérosol doseur [90]. En outre, cette méthode est de plus en plus employée en développement pour le positionnement par rapport à un traitement de référence. En effet, la comparaison des profils de déposition sur une dizaine de personnes peut s'avérer d'une grande utilité avant la mise en place des études cliniques plus longues et plus onéreuses (pivotal clinical trials), qui auront pour objectif d'établir l'équivalence thérapeutique entre les produits [91-93].



Figure 21 : Représentation en 2D et en 3D de la déposition pulmonaire. Selon la technique utilisée, le poumon est divisé en trois régions représentant approximativement les voies aériennes centrales, intermédiaires et périphériques [87].

4.2.2.4. Développements récents

Le marquage conventionnel des formes à poudre sèche consiste à fixer l'élément radioactif, généralement le technétium 99 métastable (^{99m}Tc), à la surface des particules de PA suite à l'évaporation d'un solvant, organique ou aqueux, contenant le traceur et la poudre en question. Néanmoins, ce procédé est confronté à deux inconvénients majeurs. D'une part, la dissolution rapide du marqueur dans le tractus respiratoire et son passage dans la circulation systémique peuvent parfois conduire à une quantification erronée de la fraction pulmonaire, notamment lorsque les expérimentations nécessitent un temps d'acquisition important (SPECT). D'autre part, l'utilisation d'un solvant peut altérer la distribution de la taille particulaire de la formulation initiale, entraînant ainsi une déposition pulmonaire complètement tronquée.

Afin de pallier à ces limitations, une nouvelle technique de marquage « à sec », TechneCoat[®], a été développée et approuvée par les autorités compétentes [94]. La poudre à marquer est mélangée à des nanoparticules de technétium recouvert de plusieurs couches de graphite (30 à 100 nm de diamètre et 3 nm d'épaisseur). Compte tenu de leur clairance pulmonaire suffisamment lente, ces nanoparticules sont des marqueurs appropriés aussi bien pour la gamma scintigraphie que pour la SPECT [95].

5. Formulations médicamenteuses administrées par inhalation

La thérapie par les aérosols est connue depuis des siècles. Par exemple, Galien recommandait à ses malades d'aller inhaler les vapeurs sulfureuses qui émanaient du Vésuve en vue de soigner leur bronchite chronique. Plus tard, la fumée de cigarettes de Belladone et de Datura a été utilisée pour traiter les crises d'asthme [96].

De nos jours, suite aux avancées technologiques remarquables et au développement de la recherche médicale, l'inhalation de médicaments constitue le mode d'administration optimal dans le traitement de nombreuses affections des voies respiratoires. En effet, la délivrance du principe actif in situ procure un effet rapide et efficace à dose faible, et provoque par la même occasion nettement moins d'effets secondaires comparativement aux autres voies d'administration. Par ailleurs, le tractus respiratoire, de par ses caractéristiques spécifiques, est considéré comme une porte d'entrée non invasive potentielle vers la circulation systémique.

Ainsi le nombre important d'alvéoles (200 à 600 millions) confère au poumon une surface d'échange particulièrement grande, de l'ordre de $140m^2$, au niveau de laquelle le passage des substances est régulé par la présence d'une très fine barrière alvéolo-capillaire (0,1 à 0,2µm d'épaisseur). De plus, l'inhalation permet d'éviter l'effet de premier passage hépatique et le poumon présente une métabolisation enzymatique réduite (l'arsenal enzymatique est certes complexe mais largement moins actif que celui du tractus gastro-intestinal). L'ensemble de ces caractéristiques couplé à un flux sanguin élevé (5L/min) permet généralement d'obtenir une absorption rapide des substances inhalées avec une distribution directe dans la circulation générale [5].

5.1. Médicaments inhalés à action locale

Les médicaments administrés par la voie inhalée, pour traiter les affections respiratoires, peuvent être divisés en différentes catégories :

5.1.1. Les bronchodilatateurs

Ils exercent une action relaxante directe sur les muscles lisses des voies respiratoires. On distingue :

Les agonistes \u03b32-adrénergiques

Leur utilisation en cas de bronchospasme repose surtout sur leur effet bronchodilatateur mais aussi sur un effet protecteur contre divers stimuli grâce à une stimulation des récepteurs β_2 des muscles lisses des voies respiratoires. Les β_2 -mimétiques à courte durée d'action (salbutamol, fénotérol, etc.) sont administrés par inhalation en cas de crise, et à titre préventif et thérapeutique dans l'asthme d'effort; leur usage selon un schéma fixe n'est plus conseillé. Les β_2 -mimétiques à action prolongée (salmétérol, formotérol, etc.) sont destinés au traitement d'entretien et doivent toujours être utilisés en association à des corticostéroïdes à inhaler [97]. Outre l'asthme, l'inhalation de médicaments de type β_2 sympathicomimétiques s'avère intéressante dans le but de soulager les symptômes de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et contribue à éviter les complications qui en découlent.

Les anti-cholinergiques

Les anti-cholinergiques sont délivrés en aérosol de manière à réduire les effets indésirables génants qui se manifestent lors de leur usage par voie systémique (sécheresse de la bouche, troubles de l'accommodation et de la miction). On distingue ceux à courte durée d'action (ipratropium) et ceux à longue durée d'action (tiotropium). Ils sont surtout utilisés dans le traitement de la BPCO. En cas d'asthme, ils constituent une alternative en cas de contre-indication aux β_2 -mimétiques. Tant dans la BPCO que dans l'asthme, ils exercent un effet additif lorsqu'ils sont associés à des β_2 -mimétiques [97].

5.1.2. Les anti-inflammatoires de type corticostéroïdes

Comme pour les anti-cholinergiques, l'inhalation de corticostéroïdes (par ex. budésonide, fluticasone) permet d'obtenir un effet favorable tout en donnant lieu à beaucoup moins d'effets indésirables que l'administration systémique, et constitue la base du traitement de l'asthme à long terme. En cas d'asthme grave persistant et de crise aiguë, l'administration par voie générale peut s'avérer nécessaire [97].

Dans le traitement de la BPCO, la place des corticostéroïdes à inhaler n'est pas tout à fait claire. Il ressort des études réalisées que leur effet est plus limité que dans l'asthme et dépend de la gravité de la maladie ; au plus faible est le volume expiratoire maximal pendant la première seconde (VEMS), au plus grand sera l'effet sur les exacerbations. Les différentes recommandations préconisent un corticostéroïde à inhaler chez les patients atteints de BPCO sévère à très sévère (VEMS < 50 %) avec des exacerbations fréquentes [98, 99].

5.1.3. Les inhibiteurs de la libération de médiateurs

Ces substances agissent vraisemblablement par un effet stabilisant au niveau de la membrane des mastocytes. Le cromoglycate sodique peut être administré en aigu (± 20 minutes avant le stimulus) pour prévenir l'asthme d'effort, une bronchoconstriction induite par un allergène ou provoquée par de l'air froid [97].

5.1.4. Les mucolytiques

Les produits tels que la N-Acétylcystéine servent à liquéfier le mucus. Ils sont indiqués dans le traitement des maladies respiratoires chroniques accompagnées d'hypersécrétion telles que la mucoviscidose et la BPCO.

5.1.5. Les anti-infectieux

On retrouve des antibiotiques tels que la tobramycine, administrés dans le traitement des infections respiratoires dues à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose [100] ou encore des anti-protozoaires tels que la pentamidine, utilisées dans le traitement de la pneumonie à *Pneumocystis carinii* chez les patients atteints du SIDA [101].

5.2. Perspectives futures d'application des formes inhalées

5.2.1. Médicaments inhalés à action systémique

Depuis quelques années, l'utilisation de la voie inhalée en vue d'atteindre la circulation systémique est l'objet d'intenses travaux de recherche. Actuellement, les molécules actives en vogue sont les peptides et les protéines [7]. Compte tenu de la faible biodisponibilité orale de ces dérivés, l'inhalation constitue donc une bonne alternative à leur délivrance systémique par la voie parentérale [9].

La résorption pulmonaire des peptides est en relation avec leur coefficient de partage et leur poids moléculaire. Leur passage dans la circulation systémique peut se faire par transport à travers les jonctions serrées des cellules épithéliales ou par diffusion. Les jonctions intercellulaires présentent une ouverture de diamètre plus grand que la taille moléculaire de la plupart des principes actifs peptidiques. La vitesse du passage est donc indépendante de la taille, contrairement à la diffusion passive, où la résorption est d'autant plus lente que les molécules présentent un poids moléculaire important [9].

Parmi les dérivés peptidiques fréquemment étudiés, on peut citer l'insuline, la calcitonine et la α -1 antitrypsine [7]. L'efficacité du passage alvéolaire de ces substances est le plus souvent conditionnée par la présence au sein des formulations d'inhibiteurs des protéases et/ou de promoteurs d'absorption tels que des tensioactifs ou des agents chélatants qui altèrent les structures membranaires [102]. Cependant la frontière entre l'amélioration de l'absorption et la toxicité tissulaire est très étroite. Il est donc important que le promoteur exerce son action de manière réversible et ne présente pas de toxicité cumulative [103, 104]. Il est à noter que l'Exubera[®] (Pfizer), le premier traitement par insuline délivré par inhalation, vient d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et en Europe.

En outre, l'utilisation de la thérapie génique par la voie pulmonaire connaît également un intérêt croissant. Le concept de cette thérapie est basé sur la délivrance (à l'aide de vecteurs spécifiques) d'un gène chez les personnes pour lesquels la déficience, voire l'absence du gène en question cause des anomalies génétiques.

Deux maladies génétiques affectant le bon fonctionnement du poumon pourraient être traitées avec succès par cette approche : la mucoviscidose et la forme génétique de l'emphysème.

La mucoviscidose ou fibrose kystique résulte de la mutation du gène codant pour une protéine appelée CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator). Cette protéine a pour rôle essentiel de faire transiter le chlorure à travers les parois de certaines cellules du poumon, du pancréas, et de la vésicule biliaire. Selon les mutations présentes au sein du gène, la synthèse ou l'expression de la protéine sont perturbées, provoquant des anomalies des échanges ioniques, dont une des conséquences est l'augmentation de la viscosité du mucus qui tapisse les bronches et les canaux pancréatiques, favorisant l'infection et l'inflammation des tissus. L'emphysème génétique est dû à la déficience ou à l'absence du gène codant pour la α -1 antitrypsine. Cet inhibiteur de protéases est principalement synthétisé par les cellules hépatiques avant d'être transporté dans le tractus respiratoire inférieur. Il exerce une fonction majeure de défense contre les enzymes des cellules inflammatoires (essentiellement l'élastase sécrétée par les neutrophiles) responsables de la perte de l'élasticité du tissu pulmonaire [102, 105].

5.2.2. Formulations à libération prolongée

Nous avons vu que le poumon est un organe complexe doté de nombreux mécanismes de défense le protégeant de la pénétration de corps étrangers. Ainsi l'architecture typique de l'arbre trachéo-bronchique, le réflexe de la toux, le système enzymatique ou encore les clairances mucociliaire et alvéolaire participent activement à l'élimination des particules inhalées [106].

Généralement, l'administration de formulations « conventionnelles » via les différents types de dispositif d'inhalation entraîne une déposition limitée au sein du tractus respiratoire, ne dépassant guère les 40 % de la dose nominale dans le meilleur des cas. De plus, la durée d'action relativement courte contraint le patient à une administration répétée de la médication. Afin d'améliorer l'efficacité de la délivrance et la compliance du patient, la voie inhalée est l'objet de programmes de recherche intensifs visant, entre autre, le développement de formes pulmonaires à libération prolongée. Celles-ci sont particulièrement intéressantes dans le traitement des formes chroniques de certaines pathologies respiratoires [107].

Pour qu'un aérosol à libération prolongée soit efficace, les particules inhalées doivent être retenues dans le poumon pendant une période suffisante, permettant la libération et la résorption du PA. Généralement, les particules qui atteignent la zone respiratoire présentent la durée de séjour la plus élevée puisqu'elles évitent l'escalateur mucociliaire. Toutefois, au niveau alvéolaire, les macrophages constituent la principale ligne de défense et sont susceptibles de phagocyter ces « éléments étrangers ».

Plusieurs techniques, basées essentiellement sur la modification des caractéristiques de taille et de surface des particules actives, ont été développées dans le but de minimiser voire d'éviter la capture de ces particules par les macrophages alvéolaires. Ainsi, le traitement de la surface des particules par des substances tensioactives comme la dipalmitoylphosphatidylcholine [108] ou le Poloxamer 188 [109] a permis de réduire de manière significative leur phagocytose. Une seconde méthode repose sur l'altération du microenvironnement autour des particules déposées par la variation du pH ou l'augmentation de la viscosité. Néanmoins, cette pratique s'avère périlleuse chez les personnes souffrant d'insuffisance respiratoire. En outre, puisque ce processus d'élimination est taille-dépendant (la phagocytose étant la plus rapide pour les particules présentant un diamètre compris entre 2 et 3 µm [33]), un autre artifice consiste à administrer des particules de diamètre supérieur à 5 µm mais de faible densité (< à 0,4 g/cm³), conservant ainsi un d_{at} optimal pour atteindre la zone alvéolaire. A titre d'exemple, des tests de déposition in vitro ont montré que la dose particules (formation de particules poreuses de plus faible densité (0,1g/cm³ < 0,8 g/cm³) et de plus grande taille (8,5 µm > 3,5 µm) [110, 111].

Par ailleurs, il existe d'autres approches permettant, cette fois-ci, de réguler la libération du PA dans le tractus respiratoire. La modification des propriétés physicochimiques du PA peut agir aussi bien sur la cinétique de dissolution que sur la perméabilité vis-à-vis des membranes biologiques (sels de solubilité différente, coefficient de partage, poids moléculaires différents, etc.). En outre, l'encapsulation du principe actif, dans des structures particulières visant à contrôler et réguler sa cinétique de libération, constitue une des approches les plus récentes et le plus prometteuses [107]. On distingue différentes formes plus ou moins efficaces ; certaines sont encore au stade de la recherche expérimentale, d'autres sont au stade d'essais cliniques avancés.

5.2.2.1. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules constituées de bicouches lipidiques entourant des compartiments aqueux, et dans lesquels sont encapsulés les PA hydrophiles ou lipophiles. Les phospholipides les plus communément utilisés sont les phosphatidylcholines (PC) naturelles provenant du soja ou de l'œuf. Pour augmenter la rigidité des bicouches lipidiques ainsi que leur stabilité vis-à-vis de l'oxydation, des dérivés naturels ou synthétiques, à chaînes grasses saturées, sont également employés (la dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), la distéaroylphosphatidylcholine (DSPC), etc.). En plus de ces constituants, le cholestérol ainsi que d'autres dérivés gras peuvent participer à la formation de la bicouche lipidique [112]. Des liposomes de taille variable sont obtenus en fonction de la nature des phospholipides choisis et de la technique utilisée ; les vésicules peuvent se présenter sous forme :

- Multilamellaire (MLV, Multilamellar vesicles): leur diamètre varie entre 0,5 à 15 μm.
- Uni-lamellaire :
 - Les grandes vésicules unilamellaires (LUV, Large unilamellar vesicles), dont le diamètre varie de 100 à 500 nm.
 - Les petites vésicules unilamellaires (SUV, Small unilamellar vesicles), dont le diamètre varie de 30 à 100 nm.

Ces systèmes ont une très bonne tolérance pulmonaire car ils sont essentiellement constitués de lipides physiologiques identiques à ceux entrant dans la composition du surfactant pulmonaire. Les résultats de nombreuses études in vivo suggèrent que les liposomes se désagrègent dans les alvéoles et que les lipides qui les constituent entrent dans le pool du surfactant endogène (pulmonaire) sans pour autant affecter le processus normal de métabolisation. Ils ont donc l'avantage de présenter une toxicité minimale [113, 114]. Comparativement à l'administration de la substance à l'état pur, l'administration de formes liposomiales permet d'augmenter considérablement le temps de résidence pulmonaire des PA et de diminuer les effets secondaires indésirables. Le temps de demi-vie des médicaments encapsulés peut varier de 1,4 à 18 heures selon le type de liposome utilisé, sa taille, sa stabilité au niveau pulmonaire ainsi que les propriétés physico-chimiques du PA [107, 115]. Cependant, ces structures sont confrontées à un certain nombre de limitations. L'utilisation des liposomes (selon leur composition) est susceptible d'être moins efficace à cause de leur instabilité chimique et physique. L'instabilité chimique peut être due à l'hydrolyse des liens esters ou encore à l'oxydation des chaînes d'acides gras insaturés. L'agrégation et la fusion éventuelle des vésicules formant ainsi de larges amas ou encore la possibilité, lors d'un stockage prolongé, de diffusion du PA des vésicules vers le solvant, représentent quant à elles des formes d'instabilité physique. Certains problèmes de stabilité peuvent être résolus par la lyophilisation en présence d'un agent cryoprotecteur mais le produit reconstitué n'est pas toujours semblable au produit de départ [116, 117].

Par ailleurs, le taux d'encapsulation du PA est faible, notamment pour les substances hydrophiles se retrouvant dans les compartiments aqueux. De plus, celles-ci risquent d'être libérées prématurément lors de la nébulisation de dispersions de vésicules liposomiales larges. En effet, les gouttelettes d'aérosol générées présentent un diamètre très proche, voire inférieur à celui des MLV, ce qui peut provoquer la fragmentation de ces structures. Enfin la production à l'échelle industrielle est difficile, longue et coûteuse.

5.2.2.2. Les microsphères biodégradables

Il s'agit de particules constituées de polymères naturels ou synthétiques biocompatibles et biodégradables capables d'encapsuler aussi bien des substances lipophiles qu'hydrophiles. Leur vitesse de dégradation in vivo dépend du type de polymère utilisé, de la technique de préparation, ainsi que de leurs propriétés physiques (densité, taille, porosité, etc.) [107, 118]. Les composés les plus employés sont les copolymères des acides lactique et glycolique (polylactid-co-glycolid acid, PLGA). L'utilisation de polymères d'origine naturelle tel que le chitosan peut également être envisagée pour une administration par la voie inhalée [119].

Ces systèmes sont physiquement et chimiquement plus stables que les liposomes. De plus, ils permettent d'obtenir un taux d'encapsulation plus élevé et un meilleur contrôle de la libération de différents composés, incluant des dérivés peptidiques [107]. Néanmoins, la présence de ces éléments non physiologiques, à des tailles relativement fines, au sein du tractus respiratoire, est susceptible de provoquer des problèmes de tolérance. Armstrong et al. [120] ont pu montrer que l'administration de polymères d'acide lactique (PLA) entraînait des effets inflammatoires sévères et causait des hémorragies pulmonaires chez le lapin. De même, des effets cytostatiques ont été observés in vitro après la phagocytose de PLA et de PLGA par des macrophages humains [121]. Notons également que des quantités non négligeables de résidus issus de la préparation des polymères (des traces de solvant organique, des monomères, des produits de dégradation nocifs, etc.) pourraient contribuer à leur toxicité apparente [7, 122].

5.2.2.3. Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD) ont également été testées en tant que transporteur potentiel modulant la libération de PA par la voie pulmonaire. Elles proviennent de la dégradation enzymatique de l'amidon par la cyclodextrine-glycosyl-transférase (CGTase). Cet enzyme hydrolyse les liaisons glycosidiques de l'hélice d'amidon pour ensuite former des liens intramoléculaires sur les oligomères produits. Il en résulte la formation d'oligosaccharides cycliques [123]. Les CD naturelles les plus courantes sont l' α -, la β - et la γ -cyclodextrine, qui contiennent respectivement 6,7 et 8 unités de α -D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons α -1,4 [124].

Une des propriétés intéressantes de ces transporteurs est leur capacité à former des complexes d'inclusion avec une large variété de substances lipophiles, au sein de leurs cavités, en vue d'augmenter la biodisponibilité de ces molécules hôtes.

Compte tenu de leur faible résorption gastro-intestinale, les CD sont pratiquement atoxiques lorsqu'elles sont ingérées. Par conséquent, même si une large fraction est déposée dans la sphère oropharyngée après une administration par inhalation, ces complexes ne sont pas toxiques [7]. De plus, plusieurs études chez l'animal et sur cultures cellulaires [125-127] ont établi que les CD exercent un effet ciliostatique relativement modéré et réversible au niveau des voies aériennes centrales et périphériques. Cela permet donc de penser que les conséquences de l'administration des CD sur la physiologie pulmonaire sont limitées.

Actuellement, peu d'études concernant la pharmacocinétique des cyclodextrines administrées par voie pulmonaire ont été publiées. Une expérimentation, portant sur la délivrance de différentes CD par instillation intra-trachéale chez le lapin, a permis de montrer que le temps moyen d'absorption était de 22 minutes pour la dimethyl-β-CD, de 30 minutes pour la β-CD et de 113 minutes pour la 2-hydroxypropyl-β-CD. Cette dernière pourrait s'avérer être un véhicule prometteur pour une libération prolongée [128].

5.2.2.4. Les micro et nanoparticules lipidiques solides

L'utilisation de particules lipidiques solides (PLS) présente des perspectives d'applications très intéressantes pour la préparation de formes à libération prolongée destinées à être inhalées [107]. En effet, les PLS permettent de combiner les avantages des formes microencapsulées que sont les liposomes et les microsphères biodégradables, tout en présentant très peu d'inconvénients. Ils peuvent encapsuler des PA possédant des caractéristiques physico-chimiques très différentes et leur nature hydrophobe permet de réduire la tendance à l'agglomération et à l'adhésion des particules. De plus la stabilité ainsi que le taux d'encapsulation sont très élevés. Enfin, leur production industrielle, à des échelles variables, est aisée et peu coûteuse [109, 122].

Classiquement, ces composants lipidiques sont produits par atomisation ou par lyophilisation et sont mélangés à un transporteur de granulométrie grossière tel que le lactose de manière à pouvoir être administrés via des inhalateurs à poudre sèche [129].

6. Techniques de micronisation

Comme cela a été signalé, la taille des particules inhalées est probablement l'un des paramètres clés qui influencent le plus le profil de déposition pulmonaire et par conséquent l'activité pharmacologique d'un aérosol donné. Il est généralement admis que seules les particules possédant un diamètre aérodynamique compris entre 0,5 et 5 µm atteignent le poumon. Les particules de taille plus grande se déposent essentiellement au niveau des voies aériennes supérieures, tandis que les particules submicroniques sont susceptibles d'être exhalées [7, 18].

La micronisation des particules actives apparaît donc comme une étape critique et primordiale dans la formulation d'aérosols. Les procédés classiques permettant d'atteindre la taille particulaire requise sont le broyage, l'utilisation de fluides supercritiques et l'atomisation. Notons que ces techniques peuvent également s'appliquer aux excipients (cas du lactose micronisé « compétiteur », utilisé dans le but d'atténuer les forces d'adhésion PA-excipient porteur, et des microparticules lipidiques qui seront abordées dans la partie expérimentale).

6.1. Le broyage mécanique

Il existe différents types de broyeurs mécaniques permettant de réduire la taille de poudres de granulométrie grossière : le broyeur à marteaux, le granulateur oscillant, le broyeur à billes et le broyeur à jet ou à flux d'air [130]. Ce dernier demeure la technique la plus communément employée pour l'obtention de particules micronisées de taille « respirable ». Il consiste à faire circuler de l'air comprimé à une vitesse supersonique entraînant, par un effet venturi, les particules à microniser dans la chambre de broyage. Les collisions interparticulaires qui en découlent provoquent le fractionnement de la poudre et permettent d'atteindre une granulométrie de l'ordre de l à 20 µm [53, 130, 131].

Toutefois, ce procédé n'est pas dépourvu d'inconvénients génants voire rédhibitoires. En effet, les chocs interparticulaires sont susceptibles, en générant une énergie thermique importante, de provoquer la dégradation de substances actives thermosensibles. Ils peuvent également entraîner des modifications des propriétés physiques (passage d'un état cristallin à un état partiellement amorphe) [132]. Enfin, les particules obtenues ont tendance à être hautement chargées, ce qui affecte les propriétés d'écoulement et de dispersion [130, 131].

6.2. L'utilisation de fluides supercritiques

La technologie des fluides supercritiques constitue une alternative intéressante en regard du procédé précédent pour l'obtention de solides sous forme divisée présentant une distribution de taille particulaire et des propriétés morphologiques plus uniformes [132]. On appelle fluide supercritique (FSC) un fluide porté à une pression et une température audelà de celles de son point critique. Les FSC sont caractérisés par des densités, des viscosités, et d'autres propriétés intermédiaires entre celles de l'état gazeux et liquide, et qui peuvent être facilement et précisément ajustées par la pression. Le FSC le plus courant est le dioxyde de carbone (CO₂). Il présente l'avantage d'être non toxique, abondamment présent dans la nature, gazeux aux conditions atmosphériques, et d'avoir des coordonnées critiques peu élevées (31°C, 74 bar) permettant des températures opératoires modérées. Ses propriétés en font un fluide d'un très grand intérêt dans les domaines des applications industrielles, de la pharmacie, de l'agro-alimentaire, de l'élaboration des matériaux et de l'environnement [53, 130].

On distingue deux types de procédés selon que le FSC, généralement le CO₂, est utilisé comme solvant (RESS) ou comme anti-solvant (SAS) [133] :

6.2.1. Atomisation supercritique (RESS, pour Rapid Expansion of Supercritical Solutions)

Le principe repose sur l'utilisation des propriétés de solvatation du FSC pour un solide donné. Le pouvoir solvant d'un fluide dépend de sa densité que l'on peut faire varier dans de grandes proportions en modulant la température et la pression. Dans la région supercritique un fluide est à la fois dense et compressible, et peut, selon les conditions opératoires, se révéler un bon ou un piètre solvant.

Lorsque le mélange CO₂-soluté sous pression est détendu à travers un orifice de faible diamètre, la dépressurisation brutale conduit à une diminution considérable de la densité, et il s'ensuit une sursaturation importante et une cristallisation du soluté. Comme la nucléation et la croissance ont lieu pendant une durée très courte de l'ordre de 10 ms, les particules obtenues sont très petites, souvent submicroniques.

6.2.2. Procédé antisolvant (SAS, pour Supercritical Anti Solvent)

Quand le soluté est insuffisamment soluble dans le FSC, celui-ci peut être utilisé comme anti-solvant. Ce principe d'utilisation est particulièrement adapté pour des molécules telles que les sucres et les protéines connues pour leur très faible solubilité dans le CO₂ supercritique.

Outre le composé à microniser et le FSC, un troisième composé intervient. Il s'agit d'un solvant organique présentant au moins les trois propriétés suivantes :

- être un bon solvant du composé étudié,
- avoir une bonne compatibilité avec l'anti-solvant (idéalement, ils doivent même être complètement miscibles),
- persister le moins possible dans le solide cristallisé à la fin du procédé.

Lors de la mise en contact de la solution avec l'anti-solvant supercritique, celui-ci va se dissoudre dans la phase organique diminuant sa densité, son pouvoir solvant et donc la solubilité du soluté. Simultanément, le solvant va s'évaporer dans la phase supercritique, augmentant la concentration du soluté. C'est ce transfert de masse bidirectionnel qui explique la rapide sursaturation du soluté conduisant à sa nucléation.

Cependant, le coût élevé des installations est souvent présenté comme un frein au développement industriel de ces techniques.

6.3. Atomisation par « spray-drying »

La technique d'atomisation par la chaleur ou « spray-drying » est un procédé continu, permettant la transformation d'une solution ou d'une suspension en une poudre sèche en une étape unique. Une application typique consiste à pulvériser le liquide sous forme de gouttelettes qui entrent en contact avec un gaz inerte préchauffé. La surface de contact importante assure une évaporation rapide des gouttelettes et leur transformation en particules solides. Ces dernières sont séparées du gaz par filtration, précipitation électrostatique ou bien par séparation centrifuge (cyclone) [134, 135].

Il est à noter que la pulvérisation peut se faire selon différentes méthodes influençant considérablement la taille des gouttelettes formées. Il s'agit des pulvérisations centrifuge, pneumatique, à haute pression et ultrasonique [134].

L'atomisation se fait soit dans une configuration dite « ouverte », comme cela est représenté dans la Figure 22, soit dans une configuration « fermée ». Dans le premier cas, le gaz inerte, habituellement de l'air, n'est pas recyclé et est déchargé dans l'environnement externe après une ultime filtration qui retient les particules solides les plus fines. Alors que dans le second cas, l'utilisation de solvants organiques requiert, pour des raisons de sécurité évidentes, un milieu exempt d'oxygène ; l'azote est le gaz le plus souvent employé à cet égard, et la teneur en O_2 du milieu est strictement contrôlée pour ne jamais dépasser les 5 %.





Toute une série de paramètres peut être ajustée en vue d'une atomisation optimale ; les variables les plus critiques sont le débit, l'humidité et les températures d'entrée et de sortie du gaz, ainsi que le mode de pulvérisation (débit et pression de pulvérisation).

La flexibilité de cette technique (transposition d'échelle relativement aisée) en fait un procédé largement répandu au niveau industriel. L'application pharmaceutico-biochimique inclut la production de produits d'hémisynthèse et de synthèse (par exemple des antibiotiques tels que la pénicilline et la tétracycline), des excipients (lactose, gomme arabique), des protéines (des enzymes comme l'amylase, la glucose oxydase, etc.) ainsi que des vitamines (A, D, B, etc.)[136].

Concernant l'administration par inhalation, l'atomisation est particulièrement intéressante pour la production de poudres sèches délivrées via des IPS [137-139]. Son principal avantage est son aptitude, en faisant varier les paramètres opératoires mentionnés plus haut, à contrôler de manière rigoureuse les caractéristiques essentielles des particules pour ce mode de délivrance que sont la forme, la densité, la taille et la distribution granulométrique, ainsi que les propriétés d'écoulement et l'aptitude à la désagglomération. De plus, cette technique convient parfaitement à la manipulation de substances thermosensibles puisque l'effet « rafraîchissant » produit par l'évaporation quasi-instantanée des gouttelettes, d'une part, et le temps de résidence relativement court dans la chambre d'atomisation (allant de 100 millisecondes à quelques secondes) d'autre part, protègent ces molécules vis-à-vis de la chaleur ambiante [130, 134]. En outre, l'atomisation, dans sa configuration fermée en utilisant des solvants organiques, est facilement applicable aux substances peu solubles dans l'eau, évitant ainsi l'emploi de surfactants ou d'autres agents solubilisants susceptibles d'irriter le tractus respiratoire. Il faut, toutefois, veiller à réduire au minimum le taux de solvant résiduel [134, 135].

En présence de substances et excipients présentant une température de transition (Tc) et/ou une température de fusion suffisamment basses, c'est-à-dire une température qui n'excède pas de plus de 20°C la température de sortie de l'appareil, l'atomisation par spraydrying conduit à la formation d'un agrégat de particules ramollies. Pour pallier à cet inconvénient, ces produits (corps gras par exemple) sont généralement atomisés par « spray congealing ». A la différence de la technique précédente, le produit est tout d'abord fondu puis pulvérisé et les particules solides sont obtenues par solidification instantanée au contact d'un courant d'air froid.

OBJECTIF

III. Objectif du travail

Dans le traitement des maladies respiratoires, la délivrance par inhalation de la substance active, directement au niveau de son site d'action, permet d'obtenir un effet rapide tout en minimisant les effets indésirables. Toutefois, compte tenu de la présence de nombreux mécanismes de défense pulmonaires (structure spécifique de l'arbre trachéo-bronchique, système enzymatique, escalateur mucociliaire, clairance alvéolaire, etc.), le taux de déposition ainsi que la durée d'action de ladite substance sont généralement restreints, contraignant le patient à des prises répétées de la médication.

L'objectif de ce travail consiste à développer et à mettre au point des microparticules lipidiques solides (mPLS) destinées à être délivrées dans les voies respiratoires par un inhalateur à poudre sèche.

Ces mPLS sont composées d'un mélange de cholestérol et de phospholipides présentant des caractéristiques appréciables pour l'administration de substances médicamenteuses par la voie pulmonaire :

 Ce sont des lipides physiologiques biocompatibles et biodégradables, ayant une composition comparable aux liposomes, bien tolérés au sein de l'arbre trachéo-bronchique.

 Ils se présentent à l'état solide à température ordinaire et offrent de ce fait une meilleure stabilité que d'autres systèmes encapsulés tels que les liposomes par exemple.

 Il s'agit d'un mélange de constituants amphiphiles (phospholipides) et de composés hydrophobes (cholestérol) qui permettent l'incorporation de principes actifs (PA) tant hydrosolubles que liposolubles, avec une grande capacité d'encapsulation.

En tant qu'agent tensioactif, les phospholipides peuvent promouvoir la dispersion et la dissolution des particules inhalées dans les líquides aqueux physiologiques. En revanche, le cholestérol constitue une sorte de « barrière » vis-à-vis du milieu aqueux, réduisant de cette façon la vitesse de résorption de la substance active dans le corps. De ce fait, la cinétique de libération du PA pourrait être régulée différemment selon la proportion des excipients choisie. Ainsi, l'utilisation de phospholipides en excès par rapport au cholestérol pourrait promouvoir la libération et l'absorption du composé actif encapsulé, particulièrement dans le cas de PA présentant des caractéristiques de solubilité ou d'absorption limitées. Par contre, une formulation plus riche en cholestérol réduirait la mobilité du PA, provoquant ainsi une libération prolongée. L'administration d'une telle forme permettrait de diminuer le nombre de prises du médicament, améliorant la stabilité des taux sériques, et réduisant probablement les effets indésirables.

 Contrairement aux excipients hydrophiles généralement utilisés dans les IPS, leur nature hydrophobe permet également de réduire l'absorption de vapeur d'eau présente dans l'environnement humide du tractus respiratoire, et de limiter par conséquent l'agrégation des particules.

Deux types de formes ont été envisagés :

 Une forme à poudre sèche dite conventionnelle (mélange physique PA-excipient).
 Les particules cohésives de PA sont mélangées au transporteur lipidique en vue d'améliorer leurs propriétés d'écoulement et de favoriser leur redispersion lors de l'inhalation.
 A la différence des transporteurs classiques pour les IPS, l'excipient porteur choisi est lipidique et de granulométrie fine.

• Une forme matricielle permettant également d'améliorer les propriétés d'écoulement et de redispersion, mais qui à la différence de la forme précédente ne nécessite pas d'étape de mélange. Ceci est particulièrement avantageux dans la mesure où cette opération, qui conditionne d'emblée la qualité du produit fini, est difficile à réaliser lorsqu'il s'agit de poudres sèches pour inhalation. De plus, l'utilisation de tels excipients pourrait, de par leur nature, modifier les propriétés de dissolution du PA et donc contrôler sa vitesse de libération.

Nous avons commencé, dans un premier temps, par mettre au point les conditions opératoires de fabrication des mPLS. Nous avons ensuite évalué leurs caractéristiques physico-chimiques ainsi que leur comportement aérodynamique. Puis, nous avons abordé l'optimisation du processus de mélange (pour les formulations de type mélange physique PA-excipient). Enfin, nous avons terminé ce travail par l'évaluation in vivo de la déposition pulmonaire des mPLS.

Soulignons que ce travail a été axé sur l'étude de principes actifs non peptidiques exerçant un effet local pulmonaire. La recherche d'une action systémique par la voie inhalée n'a pas été envisagée.

PARTIE EXPERIMENTALE

IV. Partie expérimentale

1. Production de microparticules lipidiques solides (mPLS)

1.1. Sélection des lipides

Comme mentionné dans la partie introductive, les microparticules lipídiques solides (mPLS) constituent une bonne alternative aux formes liposomiales et présentent donc un intérêt certain dans la délivrance de médicaments par la voie inhalée.

Notre choix s'est porté sur l'utilisation de microparticules constituées d'un mélange de cholestérol et de phospholipides hydrogénés, des lipides physiologiques que l'on retrouve en abondance au niveau de la zone alvéolaire. En effet, le surfactant pulmonaire est un mélange complexe de corps gras et de protéines ; il contient plus de 90 % (m/m) de lipides dont 4 à 7 % sont du cholestérol et 70 à 75 % sont des phospholipides de type phosphatidylcholine (PC). Ces derniers sont en grande partie saturés ; la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) représente le composé le plus abondant (jusqu'à 40 % des phospholipides totaux) [14].

Ces mPLS sont des produits totalement biocompatibles, présentant ainsi une bonne tolérance au niveau du parenchyme pulmonaire. Il a été établi que les phospholipides, tout comme les autres composants présents dans des surfactants exogènes (divers lipides et protéines), s'associent rapidement avec les phospholipides alvéolaires lorsqu'ils sont administrés par la voie pulmonaire et intègrent le pool des lipides intracellulaires [14, 112]. A titre d'exemple, une quantité importante de DPPC, de tripalmítine et d'acide palmítique fut capturée puis recyclée (en vue d'une sécrétion ultérieure de surfactant pulmonaire) par les pneumocytes de type II après une instillation intratrachéale de Survanta[®], un surfactant exogène, chez l'agneau nouveau-né [140, 141]. Par ailleurs, en analysant les données cliniques obtenues de 1985 à 1990 dans 14 centres périnataux aux Etats-Unis, sur 5629 nouveau-nés pesant 500 g à 1500 g, Schwartz et al. ont pu mettre en exergue l'effet bénéfique de l'administration du Survanta[®] sur la morbidité et la mortalité des nouveau-nés atteints du syndrome de détresse respiratoire, tout en soulignant que le taux de complications chez ces nouveau-nés n'était pas significativement différent de celui du groupe « contrôle » et que surtout aucune de ces complications n'a été attribuée au traitement [142].
La structure chimique des phospholipides et du cholestérol est montrée dans la Figure 23.

PHOSPHOLIPIDS $\begin{array}{c}
0 \\
CH_2-O-C-R^1 \\
R^2-C-O-C-R^1 \\
R^2-C-O-C-R^1 \\
CH_2-O-C-R^1 \\
CH_2-O-C-R^1 \\
CH_2-O-C-R^1 \\
CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N-CH_3 \\
CH_3 \\
CH_3 \\
CH_2-O-P-O-X \\
CH_2-O-R^2 \\
CH_2-O-R^2 \\
CH_2-O-R^2 \\
CH_2-O-R^2 \\
CH_2-O-R^2 \\
CH_2-CH_2-CH_2 \\
CH_3 \\
CH_$

Figure 23 : Formule structurale des phospholipides (a) et du cholestérol (b).

L'objectif de ce travail étant de développer des poudres sèches pour inhalation par le procédé d'atomisation, nous avons opté pour des phospholipides totalement saturés caractérisés par une température de transition de phase relativement élevée (Phospholipon 90H[®], Tc ± 54°C). En tant que substances amphiphiles, ils peuvent promouvoir la dispersion et la dissolution des particules inhalées dans les liquides aqueux physiologiques. En revanche, le cholestérol constitue une sorte de « barrière » vis-à-vis du milieu aqueux, réduisant de cette façon la vitesse de résorption de la substance active dans le corps. Il est bien entendu important de choisir des phospholipides hautement purifiés et de composition parfaitement connue et reproductible. Le Phospholipon 90H[®] est obtenu à partir de la lécithine de soja [143]. La Figure 24 illustre le procédé breveté par Phares Pharmaceutical Holland B.V. (Patent No. 0158441) pour la production industrielle des phospholipides très purifiés sans extraction par l'acétone.



SOYA LECITHIN FRACTIONATION

Figure 24 : Procédé de purification des phospholipides à partir de la lécithine de soja [143].

71

De la lécithine contenant 75 à 85 % de PC (Phospholipon 80[®]) est obtenue par extraction dans l'éthanol suivie d'une première séparation par chromatographie d'adsorption en colonne sur gel de silice. Une séparation supplémentaire ainsi qu'une hydrogénation produisent des phospholipides davantage enrichis en PC (90 à 100%, Phospholipon 90[®] et Phospholipon 100[®]) et totalement saturés (Phospholipon 90H[®] et Phospholipon 100H[®]).

A noter que la teneur en lysophosphatidylcholine, résultant de l'hydrolyse de la fonction ester sur le carbone en position 1 ou 2 du glycérol, doit être la plus petite possible. Elle ne dépasse guère les 4 % dans le Phospholipon 90H[®].

1.2. Matériels et méthodes

1.2.1. Produits utilisés

Le cholestérol a été fourni par Bufa (Pays-Bas) et les phospholipides, Phospholipon 90H[®] (PL90H), ont été gracieusement offerts par Nattermann Phospholipid (Allemagne). La composition quantitative du PL90H est renseignée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Con	position quar	ntitative du P	hospholip	on 90H®
-----------------	---------------	----------------	-----------	---------

Phospholipides	Teneur en % (m/m)	
Phosphatidylcholine	mîn. 90 %	
Distéarylphosphatidylcholine (DSPC)	± 85 %	
Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)	± 15 %	
Lysophosphatidylcholine	max. 4 %	

Les réactifs employés sont de qualité analytique et les solvants de qualité HPLC ; l'éthanol et l'isopropanol proviennent respectivement des firmes Stella (Belgique) et Aldrich (Allemagne). Les certificats d'analyse des excipients lipidiques sont repris en annexe (annexes 1).

1.2.2. Equipement d'atomisation

L'équipement servant à la micronisation des particules lipidiques est un atomiseur de laboratoire de type Büchi mini spray dryer B-191a, monté en configuration ouverte (Büchi laboratory-Techniques, Suisse). Il se compose des éléments suivants [144, 145] :

- Une pompe d'alimentation péristaltique.
- Un système d'atomisation pneumatique.

Ce mode de pulvérisation consiste à faire passer le liquide dans une buse (Figure 25) au niveau de laquelle le contact avec un flux d'air provoque la pulvérisation sous forme de fines gouttelettes.

Une chambre de séchage.

Le fluide nébulisé est mis en contact avec le milieu gazeux préchauffé dans une chambre dite de séchage ou d'évaporation. La température d'entrée du gaz y est régulée à l'aide d'un système feedback.

Un système de collecte des particules.

Le dispositif est muni d'un séparateur centrifuge ou cyclone ; le gaz véhiculant les particules solides obtenues après évaporation, entre par un orifice latéral en forme de volute puis passe dans un tube cylindro-conique. Sous l'action de la force centrifuge, les particules en suspension sont projetées sur les parois, séparées de l'air de séchage et retombent dans un récipient de récupération.



Figure 25 : Principe de l'atomisation pneumatique [134].

L'atomisation nécessite l'adoption, d'une part, d'une température d'entrée élevée de façon à évaporer rapidement la totalité du solvant, et d'autre part, d'une température de sortie suffisamment basse pour éviter la fusion ou le ramollissement des matières grasses séchées. Or, dans les dispositifs d'atomisation conventionnels, ces deux paramètres ne sont pas contrôlés indépendamment ; une augmentation de la température d'entrée conduit systématiquement à une élévation de la température de sortie du gaz. C'est pourquoi, nous avons procédé à quelques modifications sur le Büchi mini spray dryer B-191a en vue d'optimiser la production des mPLS (Figure 26) :

- Le dispositif a été relié à un réchauffeur d'air pour chauffer l'air d'atomisation et augmenter davantage l'efficacité de la dessiccation qui s'en suit.
- Une prise d'air supplémentaire a été adaptée au niveau de la partie inférieure gauche de la chambre de séchage pour faire circuler de l'air froid de manière à abaisser au maximum la température de sortie du gaz et donc du produit atomisé. Un refroidisseur d'air fut installé à cet effet. Il est équipé d'un séchoir par adsorption permettant le séchage de l'air comprimé, d'un système de régulation de la température (allant jusqu'à -30°C) et d'un débitmètre au niveau de la vanne de sortie (Technifluid, Belgique).
- Enfin, un système de circulation d'eau froide (5°C) a permis de refroidir les parois du cyclone et de réduire ainsi l'adhésion des particules lipidiques (HAAKE K15 Water bath cooler, Allemagne).



Figure 26 : Modifications apportées au Büchi mini spray dryer B-191a.

Deux types de formulations ont été préparés par atomisation d'une solution contenant les composés lipidiques cités plus haut. Elles seront détaillées dans le chapitre suivant.

1.2.3. Analyse granulométrique

La taille d'une particule est un paramètre relativement complexe à exprimer de façon universelle. D'un point de vue théorique, le terme diamètre devrait être réservé à des particules sphériques, cependant rares sont les échantillons présentant de telles particules.

Il est donc courant d'utiliser la théorie de la « sphère équivalente » afin de déterminer les caractéristiques de taille. Il s'agit de considérer le « diamètre équivalent », c'est-à-dire le diamètre d'une sphère présentant le même comportement que la particule étudiée.

Signalons que l'expression de ce diamètre dépend de la technique analytique employée (microscopie, tamisage, analyse conductimétrique par coulter électronique, etc.) ; on parle, par exemple, de diamètre linéaire, de surface ou de volume selon que le paramètre pris en compte lors de l'analyse est la longueur, la surface ou le volume de la sphère équivalente. La Figure 27 reprend les diamètres équivalents fréquemment rencontrés pour la caractérisation des particules dans le domaine pharmaceutique [68, 146].



Figure 27 : Principaux diamètres équivalents employés pour caractériser une particule de forme irrégulière [146].

La qualité de la micronisation dans le cadre de ce travail a été appréciée en mesurant la taille et la distribution granulométrique des échantillons par diffraction laser. Le principe de cette technique repose sur la diffraction, dans toutes les directions, d'un faisceau lumineux par les particules à analyser. L'intensité de cette diffraction dépend de la taille des particules. Des particules de grande taille correspondent à une intensité importante avec un angle de diffraction faible. Une diminution graduelle de l'intensité du flux lumineux, lorsque l'on va vers des angles plus larges, caractérise des particules de petite taille [68, 69].

D'une manière générale, un échantillon représentatif, dispersé à une concentration adéquate soit dans un liquide soit dans un gaz approprié, traverse un faisceau de lumière monochromatique, habituellement produit par une source laser. La lumière diffusée par les particules sous différents angles est détectée au moyen d'un multidétecteur et le signal reçu est converti en données numériques. Ces dernières sont transformées, au moyen d'un modèle optique et d'un algorithme mathématique appropriés, en une distribution granulométrique en volume.

La Figure 28 illustre les différents éléments présents dans un appareil à diffraction laser. Notons que les deux principaux modèles optiques utilisés sont le *Fraunhofer* et le *Mie*. Ce dernier tient compte à la fois de l'indice de réfraction de la substance à analyser et de celui du milieu environnant.



Figure 28 : Principe de fonctionnement d'un appareil à diffraction laser [66].

Le système de diffraction comprend généralement :

- un rayon laser unipolarisé He-Ne (λ 633 nm),
- une source de lumière bleue (λ 450 nm),
- · un filtre spatial,
- · une lentille de Fourier,
- un détecteur constitué de couches de silicone photosensible réparties le long du banc optique ; le nombre optimal de photodiodes est de 16 à 32.

Deux configurations optiques peuvent être utilisées. Dans la géométrie classique, les particules rencontrent le faisceau parallèle avant la lentille, dans sa distance de travail (Figure $28 - \ll 9 \gg$: working distance). Dans la géométrie dite optique de Fourier inversée, l'exposition s'effectue après la lentille correctrice, donc dans un faisceau convergent. L'avantage de la seconde configuration est de permettre, par la détection d'angles de diffraction très grands, la mesure de particules de très petite taille. La limite de détection est de 0,1 µm pour les échantillons solides [68]

Les analyses ont été effectuées par voie sèche dans un appareillage de type Mastersizer 2000 (Malvern, Royaume-Uni) muni d'une unité de dispersion pour poudres sèches « Scirocco 2000 ». La diffraction laser « classique » (par voie sèche) ne permet pas de distinguer la diffusion due à des particules élémentaires de celle due à des agrégats de particules. C'est pourquoi, il est courant de procéder à la dispersion des amas avant leur passage devant la source lumineuse. Le système employé comprend à cet égard un panier vibrant garni de billes métalliques et opère selon une procédure standard (SOP, Standard Operating Procedure) optimisée pour des échantillons de poudre micronisée de petite taille (< à 100 mg) :

- Quantité d'échantillon : ± 50 mg.
- Temps d'analyse : 10 s.
- Pression du gaz : 4 bar.
- Vibration du plateau : 50%.
- Limites d'obscuration : 0,5 5 %.
- Indice de réfraction des particules lipidiques : 1,6.
- Indice d'absorption des particules lipidiques : 0,1.

Ce mode opératoire a permis de générer des particules individualisées au niveau de la cellule de mesure. Le broyage des particules suite aux conditions drastiques de dispersion utilisées est supposé être limité étant donné la faible granulométrie des échantillons.

Il est à noter que le système optique est configuré sur base de la géométrie de Fourier inversée. Par ailleurs, l'algorithme de calcul s'appuie sur la théorie de Mie car celle-ci induit en général un moindre biais sur la distribution de taille de particules inférieures à 50 µm que l'approximation de Fraunhofer [66, 147].

Les données de l'analyse granulométrique sont exprimées sous forme de distribution en volume. Trois paramètres ont été pris en considération :

- Le diamètre volumétrique moyen, D[4,3], calculé selon la formule suivante :

$$D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3}$$
(5)

- Le diamètre volumétrique médian, D(50), correspondant à la valeur de part et d'autre de laquelle se trouvent 50 % des particules en volume.
- La proportion de particules ayant un diamètre dans la « fourchette respirable », c'est-à-dire V<5µm.

Après avoir utilisé une procédure de qualification fournie par Malvern pour contrôler le bon fonctionnement de l'appareil de diffraction (utilisation de billes en verre de granulométrie connue), les mesures des échantillons lipidiques ont été répétées trois fois (n=3).

La pertinence et la validité des résultats ont été vérifiées par l'analyse du « Weighted Residual» et du « Fit ». Une valeur inférieure à 1 % du « Weighted Residual » est indicatrice d'une bonne corrélation entre les mesures effectivement enregistrées au niveau des détecteurs et l'estimation de la taille particulaire réalisée selon les propriétés optiques et le mode de calcul choisis.

1.2.4. Détermination de la teneur en solvant résiduel

La chromatographie gazeuse (CG) est une technique reconnue pour détecter et mesurer la teneur en solvants résiduels qui seraient contenus dans les préparations pharmaceutiques. La CG permet de séparer des mélanges gazeux complexes par une suite continue d'équilibres qui s'établissent entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire appropriée. Cette méthode ne s'adresse pas seulement à des molécules qui sont naturellement à l'état gazeux, mais également à tout composé qui peut être amené à l'état gazeux par élévation de la température [148].

Conditions expérimentales

- Appareil Carlos Erba Instrument « Auto/HRG/MS » MFC 500.
- Colonne capillaire CP-Sil 5CB de dimensions 25 m x 0,32 mm (Chromopack, Belgique).
- Gaz vecteur : He.
- Pression : 50 KPa.
- Température de l'injecteur : 200 °C.
- Température du détecteur : 240 °C.
- Température de la colonne : 40 °C pendant 10 min, puis augmentation de la température jusqu'à 200 °C à une vitesse de 30 °C/min et maintien de la température à 200 °C pendant 15 min.
- Temps d'acquisition : 25 min.
- Volume injecté : 1 µL.

Le logiciel AZUR version 2.0 a été utilisé pour le traitement des données.

Les échantillons ont été mis en solution dans la diméthylformamide (DMF) contenant de l'acétate d'éthyle comme standard interne, et une calibration a été réalisée au moyen de solutions étalons contenant des quantités croissantes des résidus recherchés (éthanol et isopropanol; de 250 à 10000 ppm).

1.2.5. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau des échantillons lipidiques a été déterminée au moyen de la méthode Karl Fischer coulométrique.

Principe de l'analyse Karl Fischer (KF)

L'analyse KF coulométrique est basée sur l'oxydation du dioxyde de soufre par l'iode, en présence d'eau (contenue dans l'échantillon), dans une solution de méthanol selon le schéma suivant [149-152] :

$$SO_{2} + MeOH + B \xrightarrow{} MeSO_{3^{-}} + HB^{+}$$

$$MeSO_{3^{-}} + H_{2}O + I_{2} + 2B \xrightarrow{} MeSO_{4}^{-} + 2HB^{+} + 2I^{-}$$

$$SO_{2} + MeOH + H_{2}O + I_{2} + 3B \xrightarrow{} 3HB^{+} + MeSO_{4}^{-} + 2I^{-}$$
(6)

Où B est une base, généralement de l'imidazole, servant à neutraliser l'acide généré au cours de la réaction.

On voit, d'après l'équation (6), que la réduction de l'iode est subordonnée à la consommation stechiométrique de l'eau présente dans l'échantillon.

Description et fonctionnement de l'appareillage KF coulométrique (Figure 29)





80

L'appareil (Metrohom « Kafi coulometric 756 KF ») comprend un compartiment cathodique -6-, séparé du compartiment anodique -7- par un fritté qui ne laisse passer que les ions -3-, une double électrode de travail -1,2-, composée d'une anode -4- et d'une cathode -5raccordées à un générateur à courant constant et une électrode double de platine indicatrice -8-Les compartiments anodique et cathodique sont remplis du réactif (Hydranal[®]) nécessaire à l'analyse. L'iodure et le dioxyde de soufre se retrouvent dans le compartiment anodique. L'iodure est oxydé en iode à l'anode par application d'un courant électrique. Les réactions d'électrode sont :

$$2I^{-} \rightarrow I_2 + 2 e^{-} (anode)$$
 (7)

$$2H^{\circ} + 2e^{-} \rightarrow H_2 \text{ (cathode)}$$
 (8)

En introduisant l'échantillon dans le compartiment anodique, l'iode généré, est instantanément consommé et réduit en iodure (6). Quand toute l'eau présente dans l'échantillon aura réagi, l'iode ne sera plus consommé.

Pendant la durée de l'analyse, un courant alternatif d'intensité constante est appliqué à l'électrode indicatrice; en présence d'une quantité infime d'iode libre la différence de potentiel entre les deux bornes de cette électrode décroît notablement. En effet, quand l'excès d'iode apparaît dans la solution, il est directement réduit (9) aux bornes de l'électrode indicatrice et la variation de potentiel qui en résulte marque la fin du titrage.

$$I_2 + 2 e^- \rightarrow 2\Gamma$$
 (9)

La quantité d'eau est déterminée par la mesure de la quantité d'électricité que l'oxydation électrolytique de l'iodure à l'anode nécessite. Selon la loi de l'électrolyse, la quantité d'électricité, Q = Lt, peut être reliée par la relation de Faraday au nombre de moles d'électrons utilisé : 1 mole d'e⁻ = 96500 C. Par mole d'e⁻ utilisée, nous avons ½ mole de I₂ produite (7) et autant de mole d'eau consommée (6).

1.3. Résultats et discussion

1.3.1. Optimisation des paramètres d'atomisation

Dans un premier temps, une étude de solubilité des différents ingrédients a été réalisée dans divers solvants organiques à différentes températures de façon à pouvoir choisir, dans la mesure du possible, un solvant de faible toxicité, d'inflammabilité límitée et de moindre coût. Le choix fut porté sur l'éthanol et les microparticules lipidiques ont été préparées à partir d'une solution éthanolique chauffée à 55°C, contenant 2,5 % (m/m) d'un mélange cholestérol et de phospholipides (ratio cholestérol / PL90H 70:30).

Les conditions optimales d'atomisation ont été déterminées par un plan factoriel, en faisant varier les températures d'entrée du gaz ($T_{entrée}$) et du réchauffeur d'air ($T_{pulvérisation}$), le diamètre de la buse, le flux d'air de pulvérisation (f_{ap}), et le flux d'air de séchage (f_{as}). Pour chaque combinaison de paramètres variables, la taille et la distribution de taille des particules ont été mesurées et le rendement de production a été évalué.

Ces conditions sont :

- T_{entrée} : 70°C.
- T_{sortie} : 35°C.
- Tpulvérisation : 55°C.
- Diamètre de la buse : 0,5 mm.
- Flux d'air de pulvérisation : 0,8 m³/h.
- Flux d'air de séchage : 35 m³/h, soit la puissance maximale d'aspiration du Büchi (100 %).
- Circulation d'eau à 5°C autour du cyclone.
- Tair refroidi : -20°C.
- Flux d'air refroidi 7 m³/h.
- Débit de la pompe : 2,5 g/min.

Nous avons voulu, dans un second temps, optimiser trois autres paramètres susceptibles d'influencer la qualité et le rendement de la micronisation : la température du refroidisseur, le flux d'air froid et le débit de pulvérisation.

La température du refroidisseur

En partant de la même solution éthanolique, nous avons procédé à une atomisation en faisant varier la température du refroidisseur, tout en conservant les autres paramètres cités plus haut. L'application d'une température de -5°C abaisse la T_{sortie} du gaz de 52° à 35°C et, de ce fait, améliore considérablement la micronisation. Nous observons la formation de particules lipidiques solides non ramollies qui n'adhèrent plus aux parois du cyclone.

Le diamètre volumétrique moyen (D[4/3]) varie 75 μ m à 6 μ m et le rendement est nettement amélioré (10 % \rightarrow 40 %).

Comme le montre la Figure 30, l'utilisation d'air plus froid n'entraîne pas de nettes variations ; les mesures granulométriques sont quasiment identiques entre -5° et -20° C mais présentent, néanmoins, une moins bonne reproductibilité. La proportion de particules ayant un diamètre compris dans la « fourchette respirable », c'est-à-dire V<5µm est, respectivement, de $64 \pm 1 \%$, $65 \pm 6 \%$ et $62 \pm 9 \%$ à -5° , -10° et -20° C. Ceci pourrait s'expliquer par la sollicitation trop importante de l'appareillage de refroidissement qui connaîtrait par moments une baisse de régime. En effet, nous avons constaté que la température mesurée manuellement à l'aide d'un thermomètre à l'entrée de la prise d'air froid (au niveau de la partie inférieure gauche de la chambre de séchage) ne correspondait pas à celle indiquée par le refroidisseur (différence due à la longueur du tuyau reliant les deux dispositifs), mais en plus, variait sensiblement en fonction de la durée de la manipulation.



Figure 30 : Influence de la température du refroidisseur sur la qualité de la micronisation (débit de la pompe péristaltique 2,5 g/min, flux d'air de séchage 35 m³/h, flux d'air de pulvérisation 0,8 m³/h, flux d'air froid 7 m³/h, T_{pulvérisation} 55°C, T_{entrée} 70°C, diamètre de la buse 0,5 mm, circulation d'eau à 5°C).

Le flux d'air froid

La température du refroidisseur a été fixée à -5°C et trois débits différents, 3, 7 et 10 m³/h, ont été testés. Nous constatons que plus le débit est élevé, plus la T_{sortie} du gaz est abaissée, et par conséquent, moins la poudre a tendance à s'agglomérer. La température de sortie passe ainsi de 45°C lors de l'atomisation à 3 m³/h, à 35°C à 7 m³/h, puis à 29°C à 10 m³/h.

La Figure 31 résume l'influence du flux d'air froid sur la taille et la distribution de taille des mPLS ; le D(50) diminue de $14 \pm 4 \ \mu\text{m}$ à 2,8 \pm 0,3 $\ \mu\text{m}$, et le V<5 $\ \mu\text{m}$ augmente de $18 \pm 6 \ \%$ à 87 $\pm 6 \ \%$ lorsque le débit est augmenté de 3 à 10 $\ \text{m}^3$ /h.



Figure 31 : Influence du flux d'air du refroidisseur sur la qualité de la micronisation (débit de la pompe péristaltique 2,5 g/min, flux d'air de séchage 35 m³/h, flux d'air de pulvérisation 0,8 m³/h, T_{pulvérisation} 55°C, T_{entrée} 70°C, T_{air refroidi} -5°C, diamètre de la buse 0,5 mm, circulation d'eau à 5°C).

Le débit de pulvérisation

Une augmentation du débit de la pompe péristaltique (d_p) entraîne, bien entendu, une accélération de la procédure de micronisation, mais provoque par la même occasion une atomisation moins efficace. En effet, la taille des gouttelettes émergeant de la buse du gicleur est étroitement dépendante du ratio débit du liquide de pulvérisation (d_p) / flux d'air de pulvérisation (f_{ap}) [153]. Une augmentation de ce ratio conduit à la formation de gouttelettes plus volumineuses requérant une énergie plus importante pour sécher les grandes quantités de solvant, or le temps de séjour relativement court dans la chambre d'évaporation ne permet pas une évaporation totale et les particules/gouttelettes tendent à coller aux parois du cyclone.

La Figure 32 reprend les résultats granulométriques obtenus pour des débits variant de 2,5 g/min à 11,7 g/min. Nous constatons que jusqu'à 5,0 g/min, la qualité de la micronisation n'est pas affectée par l'augmentation du débit, mais qu'au-delà, la proportion de particules ayant un diamètre dans la « fourchette respirable » est sensiblement diminuée.



Figure 32 : Influence du débit de la pompe d'alimentation sur la qualité de la micronisation (flux d'air de séchage 35 m³/h, flux d'air de pulvérisation 0,8 m³/h, flux d'air froid 7 m³/h, T_{pulvérisation} 55°C, T_{entrée} 70°C, T_{air refroidi} -5°C, diamètre de la buse 0,5 mm, circulation d'eau à 5°C).

En résumé, les paramètres optimums de l'atomisation d'une solution lipidique donnée, à l'aide du Büchi mini spray dryer B-191a, sont :

- T_{entrée} : 70°C.
- T_{sortie} : 29°C.
- Tpulverisation : 55°C.
- Diamètre de la buse : 0,5 mm.
- Flux d'air de pulvérisation : 0,8 m3/h.
- Flux d'air de séchage : 35 m3/h.
- Circulation d'eau à 5°C autour du cyclone.
- Tair refroidi : -5°C,
- Flux d'air refroidi 10 m³/h.
- Débit de la pompe : 2,5 g/min.

La reproductibilité du procédé dans ces conditions a été évaluée et s'est révélée très satisfaisante, avec des rendements de production avoisinant les 40 %. Les résultats de taille et de distributions de taille sont donnés dans la Figure 33 et le Tableau 5.



Figure 33 : Distributions de taille particulaire de trois lots par diffraction laser (Mastersizer 2000, Scirocco, Malvern) selon les conditions opératoires optimales pour une solution lipidique (2,5% m/m) dans l'éthanol (n=3).

Tableau 5 : Reproductibilité du procédé de micronisation sur trois lots selon les conditions opératoires optimales pour une solution lipidique (2,5% m/m) dans l'éthanol (n=3).

Numáro do lot	Diamètre des particules (µm)		N. V. Fum
rumero de lot	D(50)	D [4,3]	76 V ~ 5 µm
TB14K02	$2,6 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,3$	88 ± 2
TB15K02	$2,8 \pm 0,3$	3,2 ± 0,2	85 ± 2
TB18K02	$2,7 \pm 0,3$	3,1 ± 0,3	85 ± 4

Par la suite, les microparticules furent préparées à partir de solutions lipidiques dans l'isopropanol (10 % m/m). Ce solvant permet, en solubilisant de plus grandes quantités du constituant majoritaire, à savoir le cholestérol, d'accroître considérablement la productivité. Les résultats granulométriques sont comparables à ceux des mPLS produites à partir des solutions éthanoliques en utilisant les mêmes conditions opératoires.

1.3.2. Détermination de la teneur en solvant résiduel

Les solvants résiduels dans les produits à usage pharmaceutique sont définis comme des produits chimiques organiques volatils, utilisés ou produits lors de la fabrication de substances actives ou d'excipients, ou entrant dans la préparation de médicaments.

Le choix des solvants est considéré comme un élément critique du procédé de synthèse lorsque ceux-ci peuvent améliorer le rendement ou déterminer des paramètres tels que la forme cristalline, la pureté et la solubilité. Toutefois, ces solvants ne présentent aucun avantage thérapeutique et il convient dès lors de les éliminer autant que possible pour satisfaire aux exigences de qualité.

Ils se subdivisent en trois classes en fonction du risque qu'ils présentent pour la santé du patient [154] :

Classe 1 : Solvants à éviter

Carcinogènes humains connus ou fortement suspectés, dangereux pour l'environnement (par ex. benzène, tétrachlorure de carbone).

Classe 2 : Solvants dont l'utilisation est soumise à limitation

Carcinogènes animaux non-génotoxiques ou éventuels agents causals d'autres effets toxiques irréversibles tels que la neurotoxicité ou la tératogénicité.

Ce sont des solvants présumés être à l'origine d'autres effets toxiques importants mais réversibles (par ex. acétonitrile, chloroforme).

Classe 3 : Solvants à faible potentiel toxique

Il s'agit de solvants à faible potentiel toxique pour l'homme (par ex. éthanol, isopropanol).

Notre choix s'est porté sur deux solvants de la classe 3, à savoir l'éthanol et l'isopropanol. La limite admissible pour des solvants de cette classe est inférieure ou égale à 5000 ppm sans justification particulière [154].

Nous avons donc procédé à une détermination spécifique de ces solvants par une méthode chromatographique validée. L'examen des chromatogrammes (Figure 34) révèle la présence d'un très faible résidu d'éthanol, nettement inférieur à 250 ppm. Les conditions d'atomisation et de séchage au moment de la fabrication sont donc suffisantes pour éliminer ces solvants de manière efficace et il en résulte que les microparticules lipidiques produites répondent aux exigences de la Pharmacopée Européenne.

Il est à noter que les mPLS produites à partir d'une solution lipídique dans l'isopropanol présentent également un taux ne dépassant pas 250 ppm, et donc nettement inférieur à la limite admissible (Figure 35).

1.3.3. Détermination de la teneur en eau

Concernant la teneur en humidité résiduelle, les mPLS présentent des valeurs très faibles, de l'ordre de 0.9 ± 0.1 % (n=3). Ceci peut s'avérer fort intéressant dans la formulation de poudres pour IPS, y compris pour celles renfermant des PA hygroscopiques. En effet, comme cela a été décrit dans la partie introductive, l'humidité peut influencer la déposition particulaire dans le tractus respiratoire ; une prise d'eau est susceptible d'entraîner l'agglomération des particules en amas et de réduire, de ce fait, leur performance d'aérosolisation.





Figure 34 : Chromatogramme type de : (a) d'une solution étalon contenant de l'éthanol (250 ppm), (b) d'une solution contenant l'échantillon lipidique.



(b)



(a) d'une solution étalon contenant de l'isopropanol (250 ppm),

(b) d'une solution contenant l'échantillon lipidique.

1.4. Conclusion

La production de mPLS de taille adéquate, présentant un rendement convenable, nécessite un contrôle rigoureux de la température de sortie de l'air de séchage. En effet, une T_{sortie} trop basse conduirait à l'adhésion des particules sur les parois du cyclone par suite d'une évaporation incomplète du solvant. De même, une T_{sortie} trop élevée entraînerait certes une évaporation totale du liquide pulvérisé, mais le rendement obtenu serait faible à cause du ramollissement et/ou de la fusion des corps gras utilisés.

La température de sortie est donc un des paramètres les plus critiques à ajuster lors d'une atomisation par spray-drying. Elle est non seulement dépendante de la température d'entrée, mais également du débit de pulvérisation (d_p) , du flux d'air de pulvérisation (f_{ap}) et du flux d'air de séchage (f_{as}) [155].

On comprendra aisément que les variables f_{ap} et f_{as} ont été maintenues à leurs valeurs maximales et que le d_p a été fixé à 2,5 g/min en vue d'une évaporation efficiente des microgouttelettes les plus fines émergeant de la buse du gicleur. Par ailleurs, un système de refroidissement d'air et d'eau a permis d'abaisser la température de sortie et de ce fait, de réduire la fusion des particules lipidiques tout en maintenant les taux de solvant résiduel et d'humidité à des valeurs très basses.

2. Caractérisation des microparticules lipidiques solides (mPLS)

2.1. Introduction

Après avoir mis au point les conditions opératoires du procédé d'atomisation, nous avons produit deux types de formulations lipidiques susceptibles d'améliorer le profil de déposition et/ou d'augmenter le temps de résidence de la substance active dans les voies respiratoires :

 Des formulations de type matriciel (fM), qui consistent à incorporer le PA dans une matrice lipidique. Les produits ont été obtenus par la technique du spray-drying en recourant à l'atomisation de solutions éthanoliques chauffées à 55°C, contenant 2,5 % (m/m) d'un mélange de PA, cholestérol et phospholipides à différents ratios (Tableau 6).

 Des formulations à poudre sèche conventionnelles, au niveau desquelles le PA est mélangé physiquement à un excipient porteur (fMP). Ce dernier a été obtenu par atomisation d'une solution éthanolique chauffée à 55°C, contenant 2,5 % (m/m) d'un mélange de cholestérol et phospholipides à différents ratios (Tableau 6). Ensuite le mélange physique a été réalisé dans un mélangeur à cuve mobile de type Turbula 2C. Cette étape de mélange, déterminante pour l'obtention d'un produit final bien homogène, sera abordée dans un chapitre ultérieur.

Formulation	Cholestérol (% m/m)	Phospholipon 90H (% m/m)	Budésonide (% m/m)	
fM1	97.9	0.1	2,0	
fM2	90.0	8.0	2.0	
fMP1	99.9	0.1		
fMP2	95.0	5.0	+ 2.0	
fMP3	90.0	10.0	dans le mélangeur Turbula 2C	
fMP4	75.0	25.0		
fMP5	66.0	34.0		

Tableau 6 : Composition quantitative des formulations lipidiques.

Il est à signaler que notre volonté de préparer des microparticules peut s'expliquer aussi bien par des raisons de tolérance et de toxicité au niveau du tractus respiratoire que par des raisons pratiques :

- Ces mPLS contiennent des produits totalement biocompatibles. En pénétrant profondément dans le poumon, ils ne risqueront pas d'exercer des effets nocifs au niveau du parenchyme pulmonaire.
- Dans le cas des fMP, le procédé de mélange sera d'autant plus facile que les particules de PA et des excipients lipidiques sont de taille comparable.
- Dans le cas des fM, le PA est figé dans la matrice et la fraction pulmonaire ne pourra être augmentée que si la taille des particules est comprise dans la « fourchette respirable » (V<5 μm).

Par ailleurs, nous avons choisi de développer des formulations dont le constituant majoritaire est le cholestérol car cela permettra d'une part de limiter le phénomène de ramollissement et de collage de la matière lors de l'atomisation (dû à la présence des phospholipides), et d'autre part de viser une libération prolongée du PA, plus particulièrement dans le cas des fM.

L'objet du présent chapitre est l'étude de certaines caractéristiques physico-chimiques des mPLS et l'évaluation de leur comportement aérodynamique.

Nous commencerons, dans un premier temps, par déterminer les caractéristiques physiques essentielles. Nous évaluerons aussi bien la taille et la distribution de taille (analyse granulométrique par diffraction laser) que la forme (analyse par microscopie électronique à balayage) et la densité des particules produites (analyse par tassement). Suivront les examens de l'état physique (polymorphisme) et des propriétés thermiques par calorimétrie à balayage différentiel et par diffraction aux rayons X. Nous aborderons ensuite les performances d'aérosolisation (mesure des doses particulaires fines (DPF) sur l'impacteur en verre et l'impacteur liquide multi-étages). Enfin, une étude de stabilité, aussi bien physique que chimique (évaluation de la teneur en PA par HPLC, analyse granulométrique, mesure des DPF, etc.) viendra terminer cette partie consacrée au développement de formulations lipidiques destinées à être administrées via des inhalateurs à poudre sèche.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Produits utilisés

Le cholestérol a été fourni par Bufa (Pays-Bas) et les phospholipides, Phospholipon 90H[®] (PL90H), ont été gracieusement offerts par Nattermann Phospholipid (Allemagne). Deux corticostéroïdes, la budésonide (Chemo Iberica, Espagne) et le propionate de fluticasone (Cipla, Inde) ont été utilisés en tant que principes actifs modèles dans le cadre de ce travail. Leur structure chimique est montrée dans la Figure 36.

La budésonide est une poudre cristalline blanche à sensiblement blanche, micronisée (V< $5\mu m = 99$ %), pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans le chlorure de méthylène, et assez soluble dans l'alcool. Le propionate de fluticasone est une poudre blanche micronisée (V< $10\mu m = 99$ %), pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans le méthanol et très soluble dans la diméthylsulfoxide et la diméthylformamide.

Les certificats d'analyse des matières premières sont repris en annexe (annexes 1).



Figure 36 : Structure chimique (a) de la budésonide (épimères A et B) et (b) du propionate de fluticasone.

Les lactoses Pharmatose[®] 325M et Microfine[®] sont des α-lactose cristallins monohydratés qui proviennent, respectivement, de DMV International (Pays-Bas) et de Borculo (Pays-Bas). Les produits comparateurs, le Pulmicort[®] Turbohaler[®] 200 μg (AstraZeneca, Suède) et le Flixotide[®] Diskus[®] 250 μg (GSK, Royaume-Uni), ont été achetés en pharmacie. L'Aeroliser[®] a été équipé de gélules en HPMC de taille N°3 (Capsugel, France).

Les réactifs employés sont de qualité analytique et les solvants de qualité HPLC ; l'éthanol et l'isopropanol proviennent respectivement des firmes Stella (Belgique) et Aldrich (Allemagne).

2.2.2. Analyse granulométrique

La taille et la distribution granulométrique des échantillons ont été mesurées par diffraction laser. Les analyses ont été effectuées, dans un premier temps, par voie sèche dans un appareillage de type Mastersizer 2000 (Malvern, Royaume-Uni) muni d'une unité de dispersion pour poudres sèches « Scirocco 2000 ». Une quantité donnée de poudre, de l'ordre de 50 mg, fut placée sur un plateau vibrant et dispersée sous l'action d'air comprimé à une pression de 4 bar (cf. IV.1.2.3. Analyse granulométrique (SOP)).

Toutefois, cette technique ne tient compte ni du comportement aérodynamique des particules ni de la structure anatomique du tractus respiratoire humain [68]. C'est pourquoi, nous avons utilisé un appareil de diffraction laser particulièrement adapté à l'évaluation de formes pharmaceutiques destinées à la voie inhalée. A la différence des appareils de diffraction classique, le Spraytec (Malvern, Royaume-Uni) est directement couplé à un impacteur de sorte que les particules d'aérosol, qui sont désagglomérées et entraînées par un flux d'air déterminé (mimant l'inspiration du patient), soient traversées par le faisceau laser avant leur impaction sur les différents plateaux [71]. Parmi les autres avantages, nous citons :

L'acquisition rapide des données.

Une mesure en temps réel des aérosols à une fréquence pouvant atteindre 2500 Hz (une mesure toutes les 0,4 millisecondes) révèle les fluctuations temporelles et permet la mesure d'aérosols sur une courte durée.

Une capacité de mesure de hautes concentrations.

L'algorithme breveté de diffusion multiple PMSA (Patented Multiple Scattering Algorithm) permet le calcul des distributions de taille des particules d'aérosols à de hautes concentrations (brevet US n° 5,619,324). La limite maximale d'obscuration est de 95 %.

De multiples options de déclenchement.

Les mesures peuvent être déclenchées de plusieurs manières, ce qui facilite la synchronisation des mesures avec le déclenchement de la génération de l'aérosol. Le déclenchement peut être manuel ou automatique (divers réglages possibles : choix de la limite de transmission, du délai avant le déclenchement, etc.).

La Figure 37 illustre le principe de fonctionnement de cet appareil.



Figure 37 : Illustration du montage d'un appareil de diffraction laser couplé à un impacteur liquide multi-étages.

2.2.3. Analyse de la morphologie

L'analyse de la forme et de la microstructure des particules lipidiques a été effectuée par microscopie électronique à balayage (SEM, pour Scanning Electron Microscopy).

Sous l'impact d'un faisceau d'électrons accélérés, des électrons d'énergies différentes ainsi que des rayons X et de luminescence sont émis par l'échantillon à analyser. Les électrons rétrodiffusés et les électrons secondaires sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent un signal à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec le balayage de l'objet. Afin de rendre cet échantillon conducteur pour le flux d'électrons qui le balaye et d'optimaliser l'émission d'un nombre suffisant d'électrons, le produit est déposé sur un support en carbone, puis recouvert d'une fine couche de platine (300 Å) selon la procédure suivante (Figure 38) : dans une enceinte sous vide, une pression partielle d'argon est appliquée et une décharge luminescente est amorcée entre l'anode (platine porte-objet) et la cathode (« cible » en or ou en platine). Les ions de gaz à charge positive ainsi générés sont accélérés vers la cathode où ils déclenchent, en raison du choc de la collision, la formation d'un nuage d'atomes métalliques de la cible. Celui-ci vient se déposer sur toutes les surfaces environnantes. Une fine couche métallique d'épaisseur uniforme recouvre dès lors la surface de l'échantillon placé sur l'anode.

Le marquage métallique a été réalisé à l'aide du Balzers SCD 030 (Balzers Union Ltd., Liechtenstein). L'accélération des électrons était de 15 kV, et l'appareillage utilisé est un JSM-610 Scanning Electron Microscope (Jeol, Japon).



Figure 38 : Représentation schématique du marquage métallique de l'échantillon à analyser par SEM [156].

2.2.4. Evaluation des propriétés de tassement

Du point de vue rhéologique, les masses volumiques apparentes (brute et tassée) ont été déterminées par la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne 5 [157]. L'appareillage (Figure 39) est constitué d'un dispositif de tassement pouvant provoquer 250 ± 15 chutes par minute (Stampfvolumeter 2003, Jel, Allemagne) et d'un cylindre en verre gradué de 250 mL.

Dans ce cas-ci, pour des raisons évidentes de productivité, des prises d'essai de l'ordre de 500 à 1000 mg ont subi jusqu'à 1250 chutes dans une éprouvette graduée de 10 mL. L'écoulement des poudres a été estimé de manière indirecte en calculant l'indice de compressibilité (dit indice de Carr) selon le rapport suivant :

$$\mathbf{I}_{\mathbf{C}} = 100 \mathbf{x} \left(\mathbf{\rho}_{t} - \mathbf{\rho}_{b} \right) / \mathbf{\rho}_{t} \tag{10}$$

Où, pt : densité tassée,

Et pb; densité brute.

On considère que l'écoulement est bon lorsque cet indice est inférieur à 25.





2.2.5. Evaluation des propriétés cristallines

2.2.5.1. Analyse DSC

La méthode d'analyse par calorimétrie différentielle à balayage (DSC, pour Differential Scanning Calorimetry) est une technique à la fois qualitative et quantitative, qui peut être utilisée pour la mise en évidence d'une modification quelconque (changement de l'état physique, réactions chimiques, etc.) du comportement thermique d'un échantillon. Cette modification peut se produire au cours du temps (isotherme) et/ou suite à une variation de la température de l'échantillon analysé, et se traduit soit par une libération (réaction exothermique) soit par une absorption (réaction endothermique) de chaleur [158, 159].

L'analyse a été réalisée par un appareillage DSC-7 / TAC-7 thermal analysis controller de Perkin-Elmer (Perkin Elmer Corp., Etats-Unis), équipé d'un système de refroidissement (Intracooler-2), permettant d'effectuer des mesures à des températures subambiantes, et d'un logiciel informatique (Pyris) pour le traitement des données.

Le fonctionnement de ce dispositif est basé sur le principe de la compensation de puissance. Le dispositif est constitué d'un calorimètre équipé de deux systèmes de chauffage individuels, un pour le compartiment échantillon et l'autre pour le compartiment référence (Figure 40). Un échantillon de quelques milligrammes est pesé précisément (au centième de mg près) dans une cupule en aluminium qui est alors scellée et placée dans le compartiment ad hoc, tandis qu'une cupule en aluminium vide ou renfermant une substance de référence inerte est placée dans le compartiment de référence. La présence d'un double circuit de contrôle permet de choisir la programmation de la température désirée (chauffage, refroidissement, isotherme) au niveau des deux compartiments tout en effectuant une régulation continue et automatique de la puissance fournie par chaque système de chauffage de manière à maintenir une valeur de température identique au niveau des deux cellules (rétrocontrôle).

La technique DSC permet de déterminer l'enthalpie (ΔH en J/g) des modifications thermiques par la mesure quantitative de la différence de flux calorifique nécessaire au maintien en permanence du matériau étudié et de la substance de référence inerte à la même température. Le signal renseigné en ordonnée (en mW) est proportionnel au rapport dq/dt, correspondant à la différence de la quantité de chaleur (dq en J) fournie par les deux systèmes de chauffage au niveau des deux compartiments en fonction du temps (dt en s). A une température donnée, le flux de chaleur peut être exprimé par le rapport suivant :

Flux de chaleur (J/s) = Capacité de chaleur x Vitesse de chauffage

$$= Cp \cdot v$$

= dq/dT , dT/dt (11)
= dq/dt

Où :

Cp est la capacité de chaleur : dq/dT (J/°C),

et v, la vitesse de chauffage : dT/dt (°C/s).

Ce signal se traduit au niveau des courbes DSC obtenues par une modification de la ligne de base (pics, sauts, etc.) dont l'intensité et la direction sont dépendantes respectivement de l'intensité et de la nature exo- ou endothermique de la transition. L'enthalpie est donnée par la relation suivante :

Où : l'aire du pic correspond au produit :

Aire
$$(J.^{\circ}C/s) = Flux$$
 de chaleur x Température (13)



Figure 40 : Représentation simplifiée d'un calorimètre différentiel à balayage [160].

Parmi les facteurs ayant une influence primordiale sur la qualité des résultats obtenus lors de l'analyse DSC, nous retrouvons :

La calibration du dispositif

On utilise généralement des substances de référence, présentant une très grande pureté (> à 99,999 %), et dont les températures et les enthalpies de fusion sont stables et connues. Les substances employées dans le cadre de ce travail sont le cyclohexane (6,54 °C, 31,25 J/g) et l'indium (156,60 °C, 28,45 J/g).

La ligne de base

Une ligne de base doit être déterminée pour chaque type d'analyse et à chaque fois qu'une modification importante au niveau des conditions opératoires est effectuée (isotherme, ou balayage de température, vitesse de chauffe, utilisation du système de refroidissement...).

La préparation et la taille de l'échantillon

La surface de contact entre l'échantillon et la cupule en aluminium doit être la plus élevée possible de manière à réduire au maximum la résistance au transfert de chaleur au sein de l'échantillon. Une augmentation du poids de ce dernier provoque une augmentation de la sensibilité mais diminue la résolution de la mesure. Le poids est généralement compris entre 2 mg et 30 mg.

L'atmosphère environnante

Le choix s'est porté sur une atmosphère inerte et anhydre. Le gaz utilisé est de l'azote de très grande pureté (N₂ 99,998 %, teneurs en O₂ et H₂O résiduelle < à 5 ppm, Air Products, Belgique). La pression est de 20 psi.

La programmation de la température

La vitesse de chauffe peut être réglée dans des limites très larges comprises entre 0,1 et 200 °C/min. Une augmentation de cette vitesse provoque généralement un accroissement de la sensibilité mais réduit la résolution de la mesure. Les vitesses de chauffe usuelles sont généralement comprises entre 2 et 40 °C/min.

Les excipients lipidiques (cholestérol et Phospholipon 90H) et le principe actif (budésonide) ont été analysés sous forme pure, sans traitement préalable, par cette technique. Les échantillons ont subi un traitement thermique à une vitesse de balayage de 5 ou 10°C/min, dans un intervalle de température plus ou moins large autour de leur point de fusion théorique. Ils ont également subi le même balayage de température après refroidissement de l'échantillon. Dans certains cas, des études de vieillissement (conservation de l'échantillon une semaine à 60°C avant analyse) ont été réalisées, afin de détecter d'éventuels phénomènes de polymorphisme. De même, une analyse DSC a été effectuée sur les différentes formulations de microparticules lipidiques produites, entre 10 et 270°C à une vitesse de balayage de 5°C/min, de façon à voir si des modifications de structure ou des interactions ont eu lieu lors de l'atomisation.

2.2.5.2. Analyse DRX

Etant donné que l'état physique (état amorphe ou cristallin) est un facteur déterminant pour la stabilité et les propriétés de dissolution et par là même pour la biodisponibilité d'une substance active au sein d'une formulation donnée, il est nécessaire d'évaluer et de suivre au cours du temps les phases cristallines du produit fini.

La diffraction aux rayons X (DRX) est une technique couramment utilisée à cet égard dans le domaine pharmaceutique. C'est une méthode non destructive qui nécessite une faible quantité d'échantillon [164]. Les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques dont le spectre d'émission se situe entre l'ultraviolet et les rayons gamma (λ comprise entre 0,01 et 100 Å).

L'identification des phases cristallines par DRX est rendue possible grâce aux périodicités de l'arrangement atomique (structure) des cristaux qui sont uniques d'une phase à l'autre. Ces périodicités sont dues à un empilement de plans identiques dans un cristal et sont décrites par des longueurs correspondant aux distances entre les plans d'empilement. Cette distance entre les plans est nommée distance réticulaire ou d_{hkl}, où les indices hkl définissent la direction considérée dans le cristal.

La loi de Bragg exprime la condition permettant d'observer la diffraction par un réseau cristallin d'un rayonnement monochromatique et parallèle :

$$n \lambda = 2 d \sin \theta$$
 (14)

103

Ainsi, pour un type de plan donné, la diffraction du rayonnement n'aura lieu qu'à un certain angle θ déterminé par la longueur d'onde λ de rayonnement incident et par la distance d entre les plans réticulaires parallèles du cristal; **n** étant l'ordre de la réflexion (nombre entier, généralement égal à 1).

Prenons l'exemple d'un cristal représenté par un empilement de trois plans réticulaires, P1 ; P2 et P3 (Figure 41), la diffraction ne se produira que si les ondes diffractées par les différents plans sont en phase, c'est à dire que la différence de marche des rayons rencontrant ces plans est égale à un nombre entier.

La différence de marche (dm) entre deux plans consécutifs est égale à :

$$dm = FS+SG$$
 (15)

Où
$$FS+SG = 2 RS \sin \theta$$
 (16)

$$RS = d$$
 (17)

Comme dm doit être égale à un nombre entier, n, de longueur d'onde λ , on retrouve la formule de Bragg : $n \lambda = 2d \sin \theta$.



Figure 41: Schéma permettant l'interprétation de l'équation de Bragg [162].

Si l'on connaît la longueur d'onde λ du faisceau de rayons X, on peut mesurer à partir de l'angle θ l'équidistance d et ainsi identifier la nature du cristal.

Dans cette étude, les mPLS ont été analysées par la méthode dite des poudres ou de Debye-Scherrer (PXRD, Powder X-Ray Diffraction). Les échantillons ont été soumis à la raie K α de cuivre, de radiation monochromatique ($\lambda = 1,540$ Å). Le diffractomètre (Siemens D 5000,

Et

Allemagne) est équipé d'un montage en réflexion dit de Bragg-Brentano, relié au monochromateur et à une chaîne de programmes DiffracPlus. Les mesures furent déterminées à 40 Kv, 40mA, dans une plage angulaire 2 θ allant de 2° à 70°, à des pas de 0,02° en adoptant une vitesse de comptage de 1,2 s par pas et une vitesse de rotation de l'échantillon de 15 rpm.

2.2.6. Evaluation aérodynamique de l'aérosol

L'uniformité de la dose délivrée, la dose en particules fines (DPF) et la fraction pulmonaire (FP) ont été déterminées en utilisant les appareils suivants :

- Un dispositif de récupération de la dose pour IPS.
- Un impacteur en verre à deux étages.
- Un impacteur liquide multi-étages (MsLI).
- Une pompe à vide de type « heavy duty pump » (0-120 L/min).
- Un manomètre (0-10 kPa).
- Un débitmètre (0-200 L/min)
- Un régulateur de flux destiné à éliminer toute variation du flux durant la mesure.

L'ensemble des appareils provient de chez Copley Instruments (Royaume-Uni) et est conforme aux prescriptions de la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition.

Le calcul de la fraction respirable des différentes formulations testées a été réalisé à l'aide du logiciel C.I.T.D.A.S. version 1.2 (Copley Inhaler Testing Data Analysis Software).

Le test d'uniformité de la dose délivrée pour chaque formulation a été effectué comme suit (Figure 42) [163] : le dispositif pour inhalation est adapté à l'une des extrémités du récupérateur de poudre, tandis que la pompe est connectée à l'autre extrémité. Une fois l'IPS chargé, la pompe est mise en marche et le débit est réglé au moyen du régulateur de façon à appliquer à travers l'inhalateur une pression différentielle (lue sur le manomètre différentiel) de 4,0 kPa (40,8 cm H₂O). Lorsque l'aspiration est terminée, l'appareillage est démonté et le contenu en PA est récupéré par 100,0 mL d'un mélange eau : méthanol 60:40 (v/v) puis déterminé par une méthode analytique validée. L'opération a été répétée dix fois pour chaque formulation.



Figure 42 : Représentation schématique du montage permettant de mesurer l'uniformité de la dose délivrée par les inhalateurs à poudre sèche [163].

Le système analytique consiste en une chromatographie liquide haute performance (HPLC) :

Appareillage

HP 1100 series (Agilent Technologies, Etats-Unis) se composant de :

- Une pompe à haute pression à gradient de solvant ternaire.
- Un injecteur automatique (boucle de 100µL).
- Un échantillonneur.
- Un four thermostatisé.
- Un détecteur ultra-violet/visible.
- Une interface d'intégration pilotée par un logiciel d'acquisition de données (HP Chemstation Ver, A.06.03).

Conditions chromatographiques pour la budésonide

- Colonne chromatographique : Alltima C18 (5µm) 4,6 x 150 mm (Alltech, Belgique).
- Phase mobile : Acétonitrile tampon phosphate ajusté au pH 3.2, 32:68 (v/v).
- Débit : 1,5 mL/min.
- Température de travail : 40°C.
- Volume d'injection : 100 µL.
- Longueur d'onde de détection : 240 nm.
Droite d'étalonnage

Différentes dilutions ont été réalisées à partir d'une solution mère contenant 500 µg/mL de budésonide afin d'obtenir des concentrations allant de 0,4 µg/mL à 20 µg/mL (Tableau 7).

	Dil	Concentration	
Solution	Volume prélevé	Phase de dilution (eau : méthanol 60:40)	(µg/ml)
Stock	***	***	500.0
1	1.0 mL S.Stock	24.0 mL	20.0
2	1.0 mL S.Stock	49.0 mL	10.0
3	2.5 mL S.1	7.5 mL	5.0
4	1.0 mL S.1	9.0 mL	2.0
5	1.0 mL S.2	9.0 mL	1.0
6	1.0 mL S.2	24.0 mL	0.4

Tableau 7 : Préparation de la droite d'étalonnage

Le chromatogramme d'une solution à 10 μ g/mL de budésonide est repris dans la Figure 43 ; la surface de l'épimère A (second pic) représente 40,0 à 51,0 pour cent de la somme des surfaces des pics des deux épimères de la budésonide. Pour des raisons pratiques, la teneur en PA des échantillons à analyser a été calculée à partir de la somme des surfaces des pics des deux épimères.

Conditions chromatographiques pour le propionate de fluticasone

- Colonne chromatographique : Licrospher 100 RP 18 (5µm) 4 x 125 mm (Merck, Allemagne).
- Phase mobile : Acétonitrile tampon phosphate ajusté au pH 3.5 méthanol, 15:35:50 (v/v).
- Débit : 1,5 mL/min.
- Température de travail : 30°C.
- Volume d'injection : 100 µL.
- Longueur d'onde de détection : 240 nm.

Droite d'étalonnage

Différentes dilutions ont été réalisées à partir d'une solution mère contenant 500 μ g/mL de propionate de fluticasone afin d'obtenir des concentrations allant de 0,5 μ g/mL à 20 μ g/mL (Tableau 8).

Tableau	8	: Préparation	de	la	droite	ď	'étalonnage
---------	---	---------------	----	----	--------	---	-------------

	Dil	Concentration	
Solution	Volume prélevé	Phase de dilution (eau : méthanol 60:40)	(µg/ml)
Stock	***	***	500.0
1	1.0 mL S.Stock	24.0 mL	20.0
2	1.0 mL S.Stock	49.0 mL	10.0
3	2.5 mL S.1	7.5 mL	5.0
4	1.0 mL S.1	9.0 mL	2.0
5	1.0 mL S.2	9.0 mL	1.0
6	1.0 mL S.2	19.0 mL	0.5

Le chromatogramme d'une solution à 5 µg/mL de propionate de fluticasone est repris dans la Figure 44.



Figure 43 : Chromatogramme d'une solution à 10 µg/mL de budésonide



Figure 44 : Chromatogramme d'une solution à 5 µg/mL de propionate de fluticasone

La détermination de la DPF et de la FP a été réalisée au moyen de deux impacteurs décrits dans la Pharmacopée Européenne 5 [69] : l'impacteur en verre à deux étages et l'impacteur liquide multi-étages (MsLI) (cf. II.D.1.2. Les impacteurs).

Le premier appareil constitue un outil très utile dans les premières phases de développement étant donné sa simplicité d'utilisation et le peu de temps requis pour effectuer un test. Le flux d'air est réglé à 60 ± 5 L/min, indépendamment de la résistance spécifique de l'IPS employé. Après avoir placé le dispositif d'inhalation à l'extrémité de la « gorge » au moyen d'un adaptateur étanche, la pompe est activée et le test est effectué pendant 4 secondes (correspondant à une aspiration de 4 L d'air). Les quantités de PA déposées dans les chambres de dépôt inférieure et supérieure, ainsi que dans la «gorge » sont recueillies par 100,0 mL d'un mélange eau : méthanol 60:40 (v/v), puis dosées par la méthode HPLC décrite plus haut. Dans le MsLI, l'essai est effectué à un débit (correspondant à une pression de 4 kPa) et pendant une durée spécifiques à l'IPS sélectionné et permettant l'aspiration de 4 L d'air à travers l'appareil. Le PA déposé au niveau de la gorge ainsi que dans les différents compartiments de l'impacteur est récupéré dans 7 ballons jaugés à l'aide de 100,0 mL d'un mélange eau : méthanol 60:40 (v/v), puis dosé par HPLC.

Pour chaque formulation, le test a été réalisé à trois reprises sur les deux impacteurs.

2.2.7. Etudes de stabilité

La stabilité est l'habilité qu'a un produit pharmaceutique ou une substance active à ne pas subir d'altérations chimique, physique, microbiologique ou biopharmaceutique jusqu'à la fin de sa date de conservation. Le vieillissement du médicament commence dès la fabrication et se poursuit, à un rythme variable mais continu, en fonction de sa composition et de son environnement. C'est un phénomène d'ensemble auquel chacun des composants participe, conduisant à une dégradation progressive des propriétés physico-chimiques et pharmacodynamiques, d'où résulte globalement une dégradation des propriétés thérapeutiques.

Les problèmes de stabilité sont le plus souvent liés à des phénomènes d'oxydation, d'hydrolyse, d'incompatibilité physico-chimique ou d'évolution structurelle. Deux paramètres ont une influence prépondérante dans l'évolution de ces phénomènes en dehors du temps : la température, dont l'augmentation accélère pratiquement toutes les réactions physicochimiques, et l'humidité, favorisant les phénomènes d'hydrolyse.

Les recommandations en matière d'études de stabilité font l'objet d'une directive ICH [164]. Les tests sont notamment effectuées sur *la substance active* dans des conditions de stress afin de :

- Etablir les mécanismes responsables de la dégradation.
- Identifier les produits de dégradation.
- Estimer la puissance des techniques utilisées (dosage des différents produits, validation des méthodes).

Et dans des conditions dites "classiques" afin de :

- Démontrer que le principe actif reste dans les limites des spécifications dans les conditions de conservation.
- Fixer la période pendant laquelle le principe actif reste dans les limites de spécifications (re-test period).

Les tests (validés) doivent couvrir les caractéristiques susceptibles d'être modifiées en cours de conservation d'un point de vue chimique, physique et microbiologique, influençant dès lors la qualité, la sécurité, et/ou l'efficacité du produit. Les études de stabilité sont également effectuées sur *le produit fini* afin de définir les limites de conservation et de vérifier qu'il n'y ait pas de changement introduit dans la formulation pouvant affecter la qualité du produit.

La limite de conservation est fixée en tenant compte des études de stabilité et des modifications obtenues lors de la conservation.

La longueur des études et les conditions de conservation sont destinées à couvrir :

- Les conditions normales de conservation du produit fini.
- Les conditions de transport.
- L'usage futur du médicament (reconstitution d'une solution...).

Les conditions recommandées pour ces études sont:

- Etude de vieillissement en temps réel : 25 ± 2°C et 60 ± 5 % HR pendant plus de douze mois (période couvrant la durée de validité de la forme).
- Etude de vieillissement accéléré : 40 ± 2°C et 75 ± 5 % HR pendant plus de six mois.

D'autres conditions peuvent être adoptées si nécessaire pour autant qu'elles soient justifiées.

Au cours d'un vieillissement accéléré, si des modifications significatives se produisent (perte de 5 % en principe actif, dépassement des spécifications limites relatives aux produits de dégradation, modification des propriétés physiques...), il est nécessaire d'entreprendre également des études à $30 \pm 2^{\circ}$ C et 65 ± 5 % HR.

Là encore, les tests (validés) doivent couvrir les caractéristiques susceptibles d'être modifiées en cours de conservation d'un point de vue chimique, physique, organoleptique et microbiologique, influençant dès lors la qualité, la sécurité, et/ou l'efficacité du produit.

Dans le cas des poudres pour inhalation, en dehors des critères habituellement évalués, c'est essentiellement l'état d'agglomération de la poudre qui devra être réévalué par une analyse granulométrique et par des tests de déposition in vitro. En effet, il est communément accepté que l'humidité relative constitue le principal facteur affectant la stabilité des IPS. Elle peut être non seulement responsable de la formation d'agrégats au sein de la formulation, mais elle peut également être responsable des modifications des propriétés physico-chimiques de l'enveloppe de la gélule (cas des IPS unidoses), modifiant ainsi les performances d'aérosolisation [165].

2.2.8. Méthodes statistiques

Les tests utilisés pour l'analyse statistique de certains de nos résultats expérimentaux sont, selon la situation, l'analyse de la variance (ANOVA) lors de la comparaison de plusieurs moyennes, ou le test t de Student lors de la comparaison entre deux moyennes.

Le seuil de probabilité choisi (p) pour décider de la signification d'un test est de 0,05 ; la différence est donc considérée comme significative lorsque la probabilité calculée est inférieure à 5 %.

2.3. Résultats et discussion

2.3.1. Evaluation des propriétés physiques des mPLS

2.3.1.1. Analyse granulométrique

Les résultats de taille et de distribution de taille des mPLS « neutres » et « actives » (fM et fMP contenant de la budésonide), obtenues par spray-drying, et de la budésonide sont repris dans la Figure 45 et le Tableau 9.



Figure 45 : Distributions de taille particulaire de la budésonide, de la forme matricielle fM2, du mélange physique fMP3 ainsi que des mPLS « neutres » (ratio cholestérol / PL90H 90:10) déterminées par diffraction laser (Mastersizer 2000, Scirocco, Malvern).

P	Diamètre des		
Formulation	D(50)	D[4,3]	% V< 5 μm
Budésonide (matière première)	$0,85 \pm 0,03$	1,05 ± 0,03	99±1
fM1	$2,4 \pm 0,1$	$2,\!89\pm0,\!09$	88,7 ± 0,9
fM2	$2,38\pm0,06$	$2,\!82\pm0,\!06$	89 ± 1
mPLS neutres ratio chol. / PL90H 99.9:0.1	2,10 ± 0,06	2,63 ± 0,05	91,1 ± 0,7
fMP1	2,14 ± 0,03	$2,80 \pm 0,04$	90,5 ± 0,7
mPLS neutres ratio chol. / PL90H 95.0:5.0	2,07 ± 0,02	2,41 ± 0,05	92,4 ± 0,4
fMP2	$2,10 \pm 0,03$	2,50 ± 0,04	91,9±0,5
mPLS neutres ratio chol. / PL90H 90.0;10.0	1,66 ± 0,05	1,96 ± 0,06	98,2 ± 0,3
fMP3	1,70 ± 0,04	$2,00 \pm 0,06$	97,8 ± 0,6
mPLS neutres ratio chol. / PL90H 75.0:25.0	$1,88\pm0,04$	$2,\!19\pm0,\!04$	95,5±0,3
fMP4	1,92 ± 0,03	$2,25 \pm 0,02$	95,3±0,1
mPLS neutres ratio chol. / PL90H 66.0:34.0	3,1 ± 0,1	3,8 ± 0,5	79 ± 2
fMP5	3.1 ± 0.3	3.9 ± 0.9	79 + 3

Tableau 9 : Résultats des mesures granulométriques par le diffractomètre laser Mastersizer Scirocco (Malvern) (n=3).

Le processus de micronisation par atomisation a permis d'obtenir des formulations lipidiques dont les distributions de taille sont unimodales et étroites. Elles s'étendent de 0,2 à 10 µm, avec plus de 85 % des particules ayant un diamètre inférieur à 5 µm (excepté pour fMP5), ce qui correspond à la taille requise pour atteindre le poumon.

Les mPLS possèdent des diamètres volumétriques médian et moyen variant respectivement de 1,7 µm à 3,1 µm et de 2,0 µm à 3,9 µm. Ces valeurs sont légèrement plus élevées que celles de la substance active qui a été micronisée par jet milling (ou broyage à jet d'air). Notons que

les fMP se caractérisent par une distribution granulométrique comparable à celle des microsphères lipidiques « neutres » obtenues par atomisation. A titre d'exemple, les D[4,3] de la formulation fMP3 et des excipients porteurs correspondants (ratio cholestérol / PL90H 90:10) sont respectivement de $2,00 \pm 0,06 \mu m$ et $1,96 \pm 0,06 \mu m$. Le processus de mélange (PA micronisé + mPLS «neutres ») n'affecte pas la taille des particules car la proportion de PA est très faible (2% m/m) pour induire une dimínution de taille du mélange par rapport à celle de l'excipient atomisé.

Un examen attentif du Tableau 9 montre que la taille particulaire des mPLS est influencée par la composition lipidique des formulations. Ainsi, dans les mélanges physiques (fMP), le ratio cholestérol / PL90H 90:10 (fMP3) semble être le plus approprié pour la production des particules les plus fines. La quantité en agent tensioactif est suffisante pour abaisser la tension à l'interface air/liquide, ce qui entraîne une légère diminution de taille comparativement aux microparticules davantage enrichies en cholestérol (fMP1 et fMP2). Par ailleurs, une augmentation de la teneur en phospholipides de la solution éthanolique engendre la formation de particules plus grandes et/ou d'agglomérats de plus en plus grands. A titre d'exemple, le D[4,3] est pratiquement doublé lorsque le ratio cholestérol / PL90H passe de 90:10 à 66:34 (fMP3 : $2,00 \pm 0.06 \ \mu m \Longrightarrow$ fMP4 : $2,25 \pm 0.02 \ \mu m \Longrightarrow$ fMP5 : $3,9 \pm 0.9 \ \mu m$), et les produits issus de solutions plus concentrées tendent à coller fortement aux parois du cyclone. Ce phénomène peut être expliqué par l'état physique des phospholipides durant l'atomisation. En effet, comme cela a été souligné précédemment, le spray-drying nécessite une température d'entrée du gaz élevée afin d'évaporer rapidement la totalité du solvant. Or une augmentation de la température d'entrée conduit systématiquement à une élévation de la température de sortie. Nous avons apporté quelques modifications au dispositif de manière à réduire sensiblement ce dernier paramètre. Toutefois, en présence de corps gras se caractérisant par une température de transition de phase (Tc) proche de la température de sortie du gaz, le ramollissement de la matière est inévitable et entraîne l'adhésion de celle-ci sur les parois du cyclone. La Tc est par conséquent un élément clé à prendre en considération lors de l'atomisation de corps gras. Elle influence considérablement la granulométrie des poudres générées par ce processus; plus la Tc est grande, plus petit sera le diamètre particulaire [166].

À cet égard, PL90H fut préféré à d'autres phospholipides disponibles dans le commerce car il présente une Tc des plus élevées (autour de 54°C).

2.3.1.2. Détermination des propriétés de tassement

Par ailleurs, les propriétés rhéologiques des poudres ont été estimées de manière indirecte en calculant l'indice de Carr. Celui-ci a été déterminé à partir des valeurs de densités brute et tassée (Tableau 10).

Formulation	Densité	Indice de Corr	
Formulation	brute	tassée	(%)
Budésonide (matière première)	0,208	0,308	32,5
fM1	0,150	0,192	21,9
fM2	0,164	0,204	19,6
fMP1	0,158	0,216	26,9
fMP2	0,135	0,190	28,9
fMP3	0,153	0,214	28,5
fMP4	0,133	0,181	26,5
fMP5	0,173	0,246	29,7

Tableau 10 : Densités et Indice de Carr déterminés pour chacune des formulations lipidiques (n=3).

Il est généralement admis qu'un indice de Carr inférieur à 25 caractérise des produits qui s'écoulent bien. Les poudres dont l'indice est supérieur à 40 sont, elles, qualifiées de matériau à écoulement médiocre.

Les mPLS, et plus particulièrement les formulations matricielles (fM), présentent des densités relativement faibles avec des propriétés d'écoulement intéressantes. Les mélanges physiques (fMP) sont caractérisés par des propriétés d'écoulement intermédiaires entre celles des fM et celles de la budésonide non atomisée. Cependant, il est à noter que pour des raisons de productivité évidentes, les tests ont été réalisés sur des prises d'essai de l'ordre de 500 à 1000 mg dans une éprouvette graduée de 10 mL. Il serait dès lors souhaitable, lors d'une éventuelle transposition d'échelle, de confirmer les valeurs obtenues par l'évaluation de la rhéologie sur des échantillons de masse/volume adéquats selon des conditions opératoires standardisées (100,0 g ou une prise d'essai dont le volume apparent est compris entre 50 mL et 250 mL) [157, 167].

2.3.1.3. Analyse SEM

Du point de vue morphologique, les excipients, la substance active ainsi que les formulations lipidiques ont été analysés par microscopie électronique (SEM). L'examen des photos (Figure 46 et 47) permet d'observer les transformations qu'occasionne l'atomisation au niveau de la forme et des propriétés de surface des particules. En effet, dans sa forme initiale, le cholestérol apparaît sous forme de fines plaques, d'une longueur de 500 à 1000 µm (Figure 46 (a)). Une observation plus poussée de la surface (Figure 46 (b)) révèle l'existence d'irrégularités qui sont le signe d'une structure relativement rugueuse. Le PL90H et la budésonide se présentent, respectivement, en amas rappelant la forme de « galets » et en agrégats de particules micronisées de formes irrégulières (Figure 46 (c) et (d)).

Le traitement d'une solution éthanolique renfermant les excipients lipidiques par spray-drying a généré des particules présentant un aspect fondamentalement différent. Comme le montre la Figure 47 (a), les mPLS sont des particules sphériques de diamètre de l'ordre de 1 à 2 µm dont la surface apparaît comme parfaitement lisse et régulière. Par ailleurs, la solubilisation des différents ingrédients dans le solvant d'atomisation a donné naissance à des particules matricielles homogènes incluant le PA et les lipides. Il est à signaler que la solubilisation de la budésonide n'affecte en rien l'aspect physique et les caractéristiques granulométriques de ces mPLS. Ainsi, les fM sont des microsphères parfaitement lisses de taille comparable à celle des excipients atomisés (Figure 47 (b)). Enfin, dans les fMP, les microparticules de budésonide semblent être dispersées de manière homogène autour des microsphères lipidiques, en ayant probablement des interactions PA-excipient porteur plus lâches par rapport aux forces cohésives PA-PA caractérisant la matière première (Figure 47 (c) et (d)). L'intensité des forces d'adhésion PA-excipient porteur sera discutée plus loin (cf. IV.2.3.2.4. Paramètres influençant la fraction pulmonaire).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 46 : Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage avant atomisation :

(a) Cholestérol (grossissement 25 X)

(b) Cholestérol (grossissement 150 X)

(c) Phospholipon 90H (grossissement 10000 X)

(d) Budésonide (grossissement 3000 X)



(a)



(b)



(c)

(d)

- Figure 47 : Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage après atomisation :
 - (a) Excipients lipidiques (grossissement 4000 X)
 - (b) Forme matricielle fM2 (grossissement 4000 X)
 - (c) Mélange physique fMP3 (grossissement 2500 X)
 - (d) Mélange physique fMP3 (grossissement 10000 X)

2.3.1.4. Analyses DSC et DRX

Les propriétés thermiques et cristallines des produits atomisés ont été évaluées par analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC) et par diffraction aux rayons X (DRX) sur poudre. Cette évaluation constitue une étape primordiale des études de pré-formulation puisque ces deux techniques fournissent, en détectant un éventuel phénomène de polymorphisme et/ou les interactions susceptibles d'être rencontrées entre les différents ingrédients, une bonne indication sur la stabilité physique et chimique à long terme des formulations.

Les courbes de balayage de température par DSC de la budésonide (pure) et des deux types de formes lipidiques (fMP3 et fM2) sont représentées dans la Figure 48. Nous remarquons l'absence du pic endothermique de fusion caractérisant la molécule active aussi bien pour la forme matricielle que pour le mélange physique.





Compte tenu de la sensibilité limitée des techniques employées, nous ne pouvons pas mettre en évidence la forme physique des constituants présents en faible quantité dans les préparations. Toutefois, l'examen des spectres de diffraction aux rayons X d'un échantillon de budésonide pure, avant et après traitement par spray-drying, permet de constater que l'atomisation induit la transformation de la matière première en un produit amorphe (Figure 49). Tout porte à croire que les conditions opératoires sélectionnées ont permis l'évaporation très rapide des gouttelettes pulvérisées, générant ainsi des particules qui n'ont pas eu le temps de cristalliser [138, 168]. On peut dès lors supposer que dans la forme matricielle, contrairement au mélange physique, la budésonide ne conserve pas ses propriétés cristallines.

La comparaison des courbes DSC du cholestérol, du PL90H ainsi que de différents produits atomisés montre l'existence d'interactions entre les excipients lipidiques lors du processus d'atomisation (Figure 50) ; la présence d'un seul pic endotherme entre les plages de fusion des phospholipides (120°C) et du cholestérol (140°C) est révélatrice d'une structure homogène dont les caractéristiques de fusion sont dépendantes de la proportion entre ces deux substances. En diminuant le ratio cholestérol / PL90H, nous observons un déplacement de ce pic de fusion, qui se rapproche de plus en plus de celui du Phospholipon. A titre d'exemple, le pic de fusion de la formulation contenant la plus faible teneur en phospholipides (fMP1, ratio cholestérol / PL90H 99.9:0.1) est de 139°C. Il est déplacé à 132°C pour fMP4 (ratio cholestérol / PL90H 75:25) et à 130°C pour fMP5 (cholestérol / PL90H 66:34).

Ces deux dernières formulations se caractérisent, par ailleurs, par l'apparition d'un second pic endothermique aux environs de 50°C. Celui-ci suggère sans doute la transformation structurelle du Phospholipon 90H[®], lors de l'étape d'atomisation, en sa forme amorphe qui subit une transition de phase autour de 54°C.

La DRX s'est révélée fort utile pour confirmer les changements structurels qui ont eu lieu à la suite de l'atomisation. L'examen des spectres de diffraction aux rayons X du cholestérol (Figure 51 (b et c)) met en évidence la transformation du constituant majoritaire cristallin en un produit partiellement amorphe (% amorphe = 30 %). Après 10 jours de conservation à 60°C du cholestérol produit par spray-drying, nous observons une très légère augmentation de l'intensité des pics caractérisant ce composé (% amorphe = 26 %). Cela signifie que la partie amorphe aura tendance à cristalliser lentement, probablement si le produit est conservé dans des conditions de stockage drastiques.







Figure 50 : Tracés DSC obtenus à partir des excipients lipidiques et des différents mélanges physiques (fMP1 → fMP5).

Les pics DRX des mPLS (fM2 et fMP3) (Figure 52 (a)) correspondent à ceux du composé original (Figure 51 (b)), mais diffèrent en intensité. Le pourcentage de cholestérol amorphe est estimé à environ 28 %. Les phospholipides tendent également à être partiellement amorphes puisque l'observation du spectre de diffraction de fMP5 (c'est-à-dire le produit renfermant le plus de PL90H) (Figure 52 (b)) révèle la présence d'un pic à $2\theta \approx 21^{\circ}$ qui semble être un des principaux pics du composé initial cristallin (Figure 51 (a)). Toutefois, l'estimation du pourcentage en produit amorphe est plus difficile vu les faibles quantités utilisées.

La présence de produits thermodynamiquement instables dans nos formulations est à surveiller car ceux-ci ont tendance à modifier leurs propriétés physiques pendant le stockage [169]. C'est pourquoi nous avons décidé de suivre l'évolution des propriétés cristallínes au cours du temps pour le mélange physique fMP3, budésonide : excipients lipidiques (ratio cholestérol / PL90H 90:10).

La Figure 53 représente l'évolution du spectre de diffraction aux rayons X de la formulation fMP3, conservée pendant 12 mois à 25°C/60 %HR. Le pourcentage en cholestérol amorphe ne varie pas (toujours aux environs de 28 % à t = 12 mois), ce qui permet de supposer que des conditions de conservation plus « douces » garantissent la stabilité physique des produits pendant des durées prolongées.





Figure 51 : Spectre DRX des excipients lipidiques

- (a) Phospholipon 90H
- (b) Cholestérol
- (c) Cholestérol atomisé+ Cholestérol atomisé conservé pendant 10 jours à 60°C



(b)



124



Figure 53 : Spectres DRX de fMP3 (produite à partir de la solution lipidique dans l'isopropanol) conservée pendant 12 mois à 25°C/60% HR.

2.3.2. Evaluation des performances d'aérosolisation

2.3.2.1. Tests préliminaires sur les dispositifs d'inhalation

Bien avant d'évaluer le comportement aérodynamique de nos formulations, il a fallu choisir, parmi les dispositifs disponibles sur le marché, l'IPS qui conviendrait le mieux à l'administration des PA considérés. Ce choix majeur, qui conditionne les étapes suivantes du développement, est guidé par des critères d'efficacité et de reproductibilité mais aussi par des critères d'ordre réglementaire, économique, et commercial. Rappelons que, à la différence des aérosols doseurs pour lesquels l'énergie est fournie par l'expansion du gaz contenu dans le dispositif, dans les IPS, c'est le flux d'inhalation du patient qui est responsable de la sortie et de la redispersion de la poudre, et qui influence donc directement la fraction pulmonaire. Par conséquent, un des paramètres à prendre impérativement en considération est la résistance spécifique à l'air de l'IPS sélectionné, c'est-à-dire son aptitude à « absorber » une fraction du flux inspiratoire destinée à désagglomérer la poudre. Comme cela a été mentionné dans la partie introductive, les inhalateurs présentant une grande résistance sont généralement les plus

aptes à provoquer la redispersion des agglomérats de particules [39, 66]. Toutefois, leur utilisation peut s'avérer inadéquate, voire dangereuse pour les personnes présentant un débit inspiratoire initial faible, qui risquent ainsi de ne pas recevoir la dose thérapeutique escomptée. Il serait dès lors judicieux de choisir un IPS moyennement résistant.

Sur bases de précédentes expérimentations réalisées au sein de notre laboratoire [170], notre choix s'est porté sur l'Aeroliser[®]. Il s'agit d'un dispositif unidose moyennement résistant (0,055 cm $H_2O^{1/2}$ / L.min⁻¹) et facile d'utilisation, employé comme modèle d'IPS dans le cadre du développement des mPLS.

La gélule, placée dans une encoche de forme adéquate, est percée aux deux pôles au moyen de quatre fines aiguilles. Lors de l'inhalation, elle passe dans la chambre de rotation et se met à tourner grâce aux turbulences induites par l'aspiration. Ce mouvement de rotation provoque la sortie de la poudre par effet centrifuge, et la grille, placée au-dessus de la chambre de rotation, contribue fortement à l'éclatement et la redispersion des agglomérats sous forme de particules individualisées. Un schéma détaillé de l'Aeroliser[®] est donné dans la figure cidessous.



Figure 54 : Illustration schématique de l'Aeroliser®.

Notons que nos formulations à base de budésonide et de propionate de fluticasone ont été comparées à des formulations de référence, à savoir le Pulmicort[®] Turbohaler[®] et le Flixotide[®] Diskus[®], délivrées via deux inhalateurs relativement plus résistants (0,1 et 0,067 cm H₂O^{1/2} / L.min⁻¹), ainsi qu'à des formulations de poudre sèche classiques utilisant le même dispositif d'inhalation.

La Pharmacopée Européenne recommande pour la détermination de l'uniformité de la dose délivrée, tout comme pour la détermination de la fraction respirable, de mesurer le flux d'inhalation auquel le dispositif à poudre sèche choisi doit être testé in vitro. A cet égard, une pression constante de 4 kPa (mesurée à l'aide d'un manomètre, P1 sur la Figure 42) est appliquée au moyen d'une pompe à vide à travers l'embout de l'IPS. Une fois cette valeur atteinte, le manomètre est retiré et remplacé par un débitmètre. Le flux indiqué est ainsi le flux applicable pour les tests in vitro.

Les flux mesurés pour l'Aeroliser[®], le Diskus[®] et le Turbohaler[®] sont respectivement de 100, 80 et 60 L/min. Ces valeurs sont en corrélation avec les mesures de résistance spécifique et reflètent, dans une certaine mesure, la réalité puisque plus la résistance à l'air de l'IPS est élevée, plus le flux résultant d'un patient inhalant au travers de cet appareil sera faible. La durée de l'essai est de respectivement 2,4, 3 et 4 secondes pour correspondre au volume d'inspiration recommandé (4 litres) [163].

2.3.2.2. Détermination de la dose délivrée

La Pharmacopée Européenne n'édicte pas de normes relatives à la dose émise par rapport à la dose nominale, toutefois, il est nécessaire que les doses délivrées soient reproductibles.

9 décharges doivent être comprises entre 75 et 125 % de la moyenne obtenue après 10 décharges, et toutes les décharges doivent être comprises entre 65 et 135 % de la moyenne récupérée. Si 2 ou 3 valeurs se situent en dehors des limites de 75 à 125 %, le test est répété sur deux autres inhalateurs. La préparation satisfait à l'essai si au maximum 3 des 30 décharges se situent en dehors des limites de 75 à 125 % et si aucune ne se situe en dehors des limites de 65 à 135 % [163].

L'édiction de spécifications d'uniformité assez larges permet de se rendre compte de la difficulté de délivrer des doses reproductibles de particules actives micronisées via les différents dispositifs d'inhalation.

Les résultats du test d'uniformité de la dose délivrée pour deux formulations lipidiques, à savoir fM2 et fMP3, ainsi que pour le Pulmicort[®] Turbohaler[®] sont repris dans le Tableau 11.

-		Aerol	Turbohaler®			
Décharge	fN	12	ſM	IP3	Pulmicort 200	
	Dose récup. (µg)	% par rapport moyenne	Dose récup. (µg)	% par rapport moyenne	Dose récup. (µg)	% par rapport moyenne
1	157,63	95,3	171,45	107,4	100,90	81,7
2	162,11	98,0	148,30	92,9	110,06	89,2
3	157,35	95,1	144,87	90,7	148,65	120,4
4	153,20	92,6	159,51	99,9	127,25	103,1
5	175,33	106,0	152,36	95,4	138,10	111,9
6	164,66	99,5	174,00	109,0	134,68	109,1
7	173,44	104,8	166,64	104,0	102,46	83,0
8	178,21	107,7	163,51	102,4	143,02	115,9
9	180,03	108,8	145,68	91,2	104,59	84,7
10	152,52	92,2	170,73	106,9	124,58	100,9
Moyenne	165,5	100,0	159,7	100,0	123,4	100,0
C.V. (%)	6	5,4		7,1	1	4,4

Tableau 11 : Uniformité de la dose délivrée à partir de l'Aeroliser[®] (100 L/min, 2,4 s, 4L d'aspiration, fM2 et fMP3 et du Turbohaler[®] (60 L/min, 4 s, 4L d'aspiration); (dose nominale : 200 μg de budésonide).

Nous constatons que le Turbohaler[®] délivre une quantité moins importante de budésonide et présente une moins bonne reproductibilité que l'Aeroliser[®]. Les doses moyennes récupérées sont de 123 µg (décharges comprises entre 82-120 % de la valeur moyenne), 160 µg (91-109 %) et 166 µg (92-109 %), respectivement, pour le Pulmicort, fMP3 et fM2. Ces valeurs sont conformes aux exigences de la Pharmacopée Européenne pour les deux dispositifs.

2.3.2.3. Détermination de la fraction pulmonaire

Le test de déposition in vitro a été effectué dans un premier temps sur l'impacteur en verre à deux étages afin de se positionner par rapport à la formulation de référence. La Figure 55 représente les fractions de budésonide retenues dans la chambre inférieure de



l'appareil de déposition ($d_{ce} < a 6,4 \mu m$), exprimées en pour cent par rapport à la dose nominale.

Figure 55: Représentation des fractions de particules de budésonide recueillies dans la chambre inférieure de l'impacteur en verre (60 L/min, 4 s, 3 gélules/test, 200 μg/gélule, n=3).

Au vu de ces résultats, il apparaît que les formulations lipidiques présentent un comportement aérodynamique remarquable. La quantité de PA déposée dans la partie inférieure de l'impacteur est, selon les mPLS testées, 1,5 à 2 fois plus importante que celle du Pulmicort[®] (23 % << 32-47 %).

Ce premier test permet d'évaluer rapidement mais de manière approximative les performances d'aérosolisation puisque l'impacteur en verre, calibré uniquement à 60 L/min, ne tient pas compte de la résistance à l'air du dispositif d'inhalation et estime seulement la fraction de particules inférieures à 6,4 µm (diamètre de coupure de l'appareil (d_{ce})). Dès lors, il nous a paru plus approprié de réaliser un nouveau test sur l'impacteur liquide multi-étages (MsLI), couplé à l'appareillage de diffraction laser (Spraytec[®], Malvern), dans le but de comparer de manière plus rigoureuse le comportement aérodynamique des différentes formulations développées et de déterminer la taille des particules générées dans des conditions de dispersion simulant au mieux la situation in vivo. Le MsLI est un appareillage plus fiable capable de déterminer la dose particulaire fine (DPF), paramètre adopté par la Pharmacopée Européenne pour exprimer la dose de particules ayant un diamètre aérodynamique inférieur à 5 µm, censées atteindre les voies aériennes inférieures.

La DPF est obtenue par interpolation, en corrélant la masse cumulée de principe actif recueillie sur les différents étages de l'impacteur en fonction de la granulométrie seuil des étages correspondants (d_{ce}). Ces d_{ce} varient en fonction du flux d'aspiration ; ils sont calculés par la relation mathématique suivante [69] :

$$d_{ce(f)} = d_{ce(60)} \propto \sqrt{\frac{60}{f}}$$
(18)

Où : d_{ce (f)} représente le diamètre de coupure correspondant au flux f (L/min) auquel le test est réalisé.

Et : d_{ce (60)} représente le diamètre de coupure correspondant à un flux de 60 L/min.

A titre d'exemple, les diamètres de coupure des étages 1, 2, 3 et 4 du MsLI sont respectivement de 13,0 μm, 6,8 μm, 3,1 μm et 1,7 μm lorsque l'impacteur est calibré à 60 L/min. A 100 L/min, ils sont respectivement de 10,1 μm, 5,3 μm, 2,4 μm et 1,3 μm.

Les résultats des tests de déposition sont repris dans la Figure 56. Soulignons que pour qu'ils soient validés, la Pharmacopée Européenne exige que la masse de PA recueillie dans le MsLI ne soit pas inférieure à 75 % ni supérieure à 125 % de la valeur moyenne obtenue dans l'essai d'uniformité de la dose délivrée [69]. Cela a été vérifié pour les formulations lipidiques décrites plus haut (Tableau 12). Pour les autres formulations, un moyen plus pratique consistait à exprimer la fraction de PA déposée dans l'impacteur en pourcentage par rapport à la dose nominale. Le test était répété si la récupération n'était pas comprise entre 75 et 125 % de la dose nominale. Les taux de récupération obtenus pour l'ensemble des formulations testées sur le MsLI étaient acceptables ; ils se situaient entre 83 et 106 % par rapport à la dose nominale.

Les valeurs moyennes des DPF obtenues pour les différentes mPLS sont respectivement de $93 \pm 7 \mu g$ et $96 \pm 4 \mu g$ pour les formes matricielles fM1 et fM2, et de $105 \pm 3 \mu g$, $95 \pm 3 \mu g$, $113 \pm 5 \mu g$, $106 \pm 1 \mu g$ et $81 \pm 3 \mu g$ pour les mélanges physiques fMP1, fMP2, fMP3, fMP4 et fMP5. Ces résultats sont particulièrement élevés et prometteurs comparativement à la valeur de la DPF pour le Pulmicort[®] Turbohaler[®] (68 \pm 5 μg). La différence est considérée comme étant statistiquement significative (p = 0,0023, test ANOVA).

Formulation	Dose moyenne récup. MsLI (µg) (n=3)	Dose moyenne délivrée (µg) (n=10)	Pourcentage (%)
fM2	178,2	165,5	107,7
fMP3	168,6	159,7	105,6
Pulmicort	121,3	123,4	98,3

Tableau 12 : Conformité des essais sur le MsLI par rapport à la dose moyenne délivrée.

* Pourcentage par rapport à la valeur moyenne obtenue dans l'essai d'uniformité de la dose délivrée.





Par ailleurs, il est intéressant de souligner que les résultats de déposition (dose en particules fines exprimée en termes de fraction pulmonaire (FP), en pour cent par rapport à la dose nominale) sont en étroite corrélation avec les données granulométriques des particules mesurées à la sortie de l'inhalateur à l'aide du Spraytec (Tableau 13 et Figure 57); plus la taille moyenne des particules est petite, plus la dose en particules fines est importante.

Ces deux paramètres, étroitement liés, sont fortement influencés par la quantité de phospholipides incorporée dans les solutions lipidiques à atomiser. Le mélange physique fMP3, qui offre la meilleure déposition in vitro (FP = 57 %), présente les diamètres volumétriques médian et moyen les plus petits (D(50) = 3.4 ± 0.4 et D(4.3) = 6 ± 2); la proportion de particules ayant un diamètre compris dans la « fourchette respirable », c'està-dire V<5µm est de 67 %. Comme cela a été mentionné dans la partie relative à l'analyse granulométrique des mPLS (cf. IV.2.3.1.1), au-delà du ratio cholestérol / PL90H 90:10, les particules lipidiques ont tendance à augmenter de taille et se lient probablement de manière plus intense avec les particules de budésonide. Le V<5µm est, respectivement, de 45 % et 51 % pour fMP2 et fMP1, ce qui provoque une diminution la fraction pulmonaire (FP MP2 = 47 %; FP MP1 = 53 %). De même, une augmentation de la teneur en phospholipides (fMP3 >> fMP5) est à l'origine du ramollissement de la matière et donc, de la formation d'agglomérats de particules de plus en plus grands. Le V<5µm est, respectivement, de 55 % et 34 % pour fMP4 et fMP5, ce qui conduit là aussi à une diminution de la dose en particules fines (FP MP4 = 53 %; FP MP5 = 41 %) par rapport à la formulation contenant le ratio cholestérol / PL90H 90:10.

	Diamètre des p		TIP (GI)		
Formulation	D(50)	D[4,3]	v < 5 μm (%)	FP (%)	
fM1	6,0 ± 0,4	11 ± 3	41±5	46 ± 4	
fM2	5,9 ± 0,6	10 ± 2	47±2	48 ± 2	
fMP1	5,2 ± 0,7	9 ± 2	51±5	53 ± 2	
fMP2	5,9±0,9	10 ± 2	45±7	47 ± 2	
fMP3	3,4 ± 0,4	6 ± 2	67±3	57 ± 2	
fMP4	4,6±0,4	9±1	55±3	53,2±0,5	
fMP5	10±2	21±6	34 ± 6	41 ± 2	

Tableau	13 : Résultats des mesures granulométriques	(diffractomètre laser Spraytec) et de la
	fraction pulmonaire (MsLI, 100 L/min,	2,4 s, 3 gélules/test) obtenus pour les
	différentes formulations lipidiques (n=3).	



Figure 57: Corrélation entre la fraction pulmonaire (FP) mesurée par déposition in vitro (MsLI, 100 L/min, 2,4 s, 3 gélules/test) et la fraction de particules inférieures à 5 µm mesurée en parallèle par diffraction laser (Spraytec) pour les mélanges physiques (fMP1 → fMP5, n=3).

En comparant les résultats repris dans les Tableaux 9 et 13, relatifs aux mesures granulométriques obtenues à partir des deux appareils de diffraction laser employés, nous constatons que les résultats sont dans l'ensemble bien corrélés (excepté pour le mélange physique fMP2). Toutefois, le Spraytec, contrairement au Mastersizer 2000, au niveau duquel de l'air comprimé est appliqué à une pression élevée (4 bar) pour disperser et désagglomérer les particules d'aérosol, permet une meilleure discrimination entre les formulations en raison de l'utilisation d'un flux d'air mimant l'inspiration du patient.

La Figure 58 représente les profils de déposition des différentes formulations testées. En se basant sur les fractions de PA déposées dans les différents compartiments de l'impacteur (y compris la fraction retenue dans le dispositif d'inhalation), nous constatons que les mélanges physiques budésonide-transporteur lipidique présentent en général les meilleurs profils de déposition et offrent les plus grandes FP. Il se dépose ainsi entre 42 % et 58 % de la dose nominale dans les étages inférieurs de l'impacteur selon la fMP testée, contre environ 48 % pour les matrices (étage 3 \rightarrow filtre : 0,5 µm < d_{ce} < 5,3 µm) et 37 % pour le Pulmicort[®] (étage 3 \rightarrow filtre : 0,5 µm < d_{ce} < 6,8 µm).

En outre, selon la fMP analysée, entre 9 % et 23 % de la dose nominale sont retenus dans le dispositif d'inhalation. Les charges électrostatiques sont probablement à l'origine d'une rétention plus élevée dans l'inhalateur (notamment pour les formulations faiblement dosées en phospholipides). Pour les formulations à haute teneur en PL90H (fMP4 et fMP5), l'agrégation des microparticules en amas de plus en plus grands facilite « l'expulsion » de la poudre, ce qui expliquerait tout aussi bien la diminution de la proportion de PA retenue dans l'Aeroliser[®] que la diminution de la FP. A titre d'exemple, le mélange fMP5, se caractérisant par les diamètres volumétriques médian et moyen les plus grands (D(50) = $10 \pm 2 \mu m$ et D[4,3] = $21 \pm 6 \mu m$), présente la plus faible fraction de PA piégée dans l'inhalateur (9 ± 2 %) et la plus faible déposition pulmonaire (FP = $41 \pm 2\%$). La différence de rétention dans l'inhalateur est moins marquée entre les autres formulations lipidiques et le produit de référence (± 20 % pour les matrices contre 24 % pour le Pulmicort). Cependant, ce dernier présente une fraction déposée au niveau de la « gorge » nettement plus importante.

Par ailleurs, en comparant les performances d'aérosolisation de fM1 et de fMP1, c'est-à-dire deux formulations de composition fondamentalement identique mais qui se différencient par la méthode de préparation, il apparaît que la DPF est significativement plus élevée pour le mélange physique que pour la forme matricielle $(105 \pm 3 \ \mu\text{g} > 93 \pm 7 \ \mu\text{g}, p = 0,0404$ - test t de Student). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que dans la forme matricielle, la substance active est figée de manière homogène dans la matrice et ne peut donc être séparée des excipients lipidiques. En revanche, il est fort probable que dans le mélange physique, les faibles interactions PA/excipient porteur, couplées à la différence de taille et de densité entre les particules micronisées de budésonide et les particules lipidiques, facilitent la redispersion de la poudre lors de l'inhalation, et permettent ainsi la déposition en quantité plus importante de la substance active dans les étages inférieurs du MsLI.

2.3.2.4. Paramètres influençant la fraction pulmonaire

Comme cela a été mentionné dans la partie introductive, l'optimisation et le contrôle des propriétés d'écoulement et de redispersion de la formulation sont primordiaux lors du développement de poudres pour inhalation. Celles-ci sont particulièrement conditionnées par l'intensité des forces d'adhésion entre les particules.

Parmi les facteurs influençant ces forces d'adhésion, on retrouve différents paramètres physiques (tels que la densité, la taille et la distribution granulométrique, ainsi que les propriétés de surface des particules), le rapport pondéral PA/transporteur, l'addition d'un excipient compétiteur ou encore le taux de remplissage des gélules.



Figure 58 : Profils de déposition in vitro des différentes formulations (MsLI, n=3).

Influence de la nature du principe actif

Un second corticostéroïde, le propionate de fluticasone, fut choisi pour mettre en évidence l'influence que pourrait exercer les propriétés physiques du principe actif sur l'intensité des forces d'adhésion et par là même sur la déposition pulmonaire.

De nouvelles formulations ont été produites à partir de solutions lipidiques à 10 % m/m dans l'isopropanol selon la procédure décrite dans la partie IV.1 (Production de microparticules lipidiques solides).

Le Tableau 14 reprend les résultats de la déposition pulmonaire obtenue in vitro à partir des formes matricielles fM2_{fluti}, et de fM2_{budé}, et des mélanges physiques fMP3_{fluti}, et fMP3_{budé}, qui se distinguent au niveau de leur composition uniquement par la nature du principe actif (matrices et mélanges physiques comprenant 2 % en masse de PA et 98 % d'excipients lipidiques).

Tableau 14 : Comparaison de la fraction pulmonaire obtenue pour les mPLS contenant de la budésonide ou du propionate de fluticasone (MsLI, 100 L/min, 2,4 s, 3 gélules/test, n=3).

	Forme Matricielle		Mélange	Physique
	fM2 _{fluti}	fM2 _{budé+}	fMP3fluti.	fMP3hudé-
Fraction pulmonaire (%)	51,2 ± 1,8	$50,8 \pm 1,8$	33,1 ± 1,9	59,2 ± 2,1

Nous remarquons que la FP n'est pas significativement différente entre les deux formes matricielles (p = 0,7965). En revanche, le mélange physique budésonide - excipients lipidiques se distingue par une FP significativement supérieure à celle du mélange physique contenant la fluticasone (p < 0,001). Un examen attentif des profils de déposition (Figure 59) et des données relatives aux mesures granulométriques effectuées en parallèle sur le Spraytec (Tableau 15) permet de mieux se rendre compte de l'impact des propriétés physiques du PA sur la déposition pulmonaire.



Figure 59 : Profils de déposition in vitro des formulations lipidiques fM2 et fMP3 contenant de la budésonide ou du propionate de fluticasone (MsLI, 100 L/min, 2.4s, 3 gélules/test, n=3).

Tableau	15:	Résultats	des 1	mesur	es granulome	triques	obtenue	s pa	r le di	ffractomètr	e la	ser
		Spraytec	pour	les	formulations	lipidiqu	ies fM2	et	fMP3	contenant	de	la
		budésonie	te ou	du pro	opionate de fl	uticason	ie (n=3).					

Formulation	Diamètre des particules (µm			
Formulation	D(50)	D[4,3]		
Budésonide (matière première)	3,1 ± 0,1	3,9 ± 0,3		
Fluticasone (matière première)	$5,2 \pm 0,2$	$7,5 \pm 0,4$		
Excipients lipidiques (ratio chol. / PL90H 90:10)	3,5 ± 0,1	4,5 ± 0,4		
fM2 _{budé} .	$4,0 \pm 0,4$	$6,4 \pm 0,6$		
fM2 _{fluti.}	$4,1 \pm 0,4$	$6,5 \pm 0,7$		
fMP3 _{budé} .	$3,8 \pm 0,1$	5,2 ± 0,5		
fMP3 _{fluti.}	$8,2 \pm 0,4$	20 ± 1		

Bien que les particules de propionate de fluticasone et de budésonide soient micronisées par le même procédé (jet-milling), il apparaît que les premières citées possèdent une plus grande taille particulaire et interagissent de manière plus intense avec les excipients lipidiques. Le diamètre volumétrique moyen (D[4,3]) de fMP3_{fluti}, est pratiquement 4 fois plus grand que celui de fMP3_{budé}, (20 >>> 5,2 µm), ce dernier étant proche du D[4,3] des excipients porteurs correspondants (ratio cholestérol / PL90H 90:10) (4,5 µm). Nous pensons que le mélange physique budésonide - particules lipidiques offre une meilleure fraction pulmonaire car les forces de liaison sont faibles et très rapidement réversibles.

La comparaison des profils de déposition est particulièrement parlante. La fluticasone se concentre davantage au niveau du compartiment « gorge » et de l'étage 2 que la budésonide. Cette dernière se retrouve, par contre, en plus grande quantité au niveau des étages 4 et « filtre » ; plus de 62 % de la dose nominale de fMP3_{budé.} (contre 34 % pour fMP3_{fluti.}) se dépose dans les étages inférieurs de l'impacteur (étage 3 \rightarrow filtre : 0,5 µm < d_{ce} < 5,3 µm). Les courbes représentant la distribution moyenne de la taille particulaire au cours du temps (mesure en temps réel des aérosols à une fréquence de 2500 Hz, soit une mesure toutes les 0,4 millisecondes) du produit fini fMP3_{budé.} et des excipients lipidiques (gélule placebo) sont quasiment superposables, tandis que fMP3_{fluti.} se caractérise par une distribution granulométrique nettement plus large due à la formation d'agglomérats de particules (Figure 60a). Il n'empêche que la FP de cette dernière formulation est particulièrement élevée et prometteuse comparativement à la valeur de la FP du Flixotide[®] Diskus[®] (23 ± 1 %).

Concernant les formes matricielles, les dépositions pulmonaires sont comparables au niveau des différents étages du MsLI quel que soit le PA utilisé; aucune différence significative n'a pu être mise en évidence, y compris dans le compartiment « gorge » pour lequel on remarque une plus grande déposition pour $fM2_{hudé}$. ($12 \pm 3 \% > 8 \pm 1 \%$ mais p > 0,05). Les mPLS produites par atomisation des solutions lipidiques contenant la substance active présentent, en effet, une taille et une forme particulaires ainsi que des propriétés de surface similaires. Les D[4,3] de $fM2_{hudé}$ et de $fM2_{fluti}$ sont identiques ($6,4 \pm 0,6 \mu m$ et $6,5 \pm 0,7 \mu m$) et les courbes de distribution moyenne de la taille particulaire au cours du temps sont superposables (Figure 60b).

En quelque sorte, dans le cas des formulations matricielles, la dilution/distribution du PA dans les lipides permet d'obtenir des particules « actives » se comportant de la même manière que les microparticules lipidiques, et ce indépendamment des propriétés physiques du PA incorporé. En présence de PA, tel que le propionate de fluticasone, se caractérisant par des interactions particulaires intenses (PA-PA ou bien PA-excipient porteur), la formulation sous forme d'une matrice serait doublement avantageuse. En effet, celle-ci ne requiert pas d'étape de mélange qui, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, est difficile à réaliser pour les poudres sèches à inhaler. De plus, le choix de ce type de forme permet d'améliorer considérablement (dans ce cas-ci) la déposition pulmonaire.



Figure 60 : Distributions granulométriques mesurées par le diffractomètre laser Spraytec

- (a) mPLS « neutres » et mélanges physiques fMP3_{budé}, et fMP3_{fluti},
- (b) mPLS « neutres » et matrices fM2_{budé}, et fM2_{fluti}.

Influence de la nature de l'excipient

Dans le cadre de l'étude de l'impact de la nature de l'excipient sur l'intensité des forces d'adhésion, nous avons comparé les performances d'aérosolisation des excipients lipidiques, mélangés physiquement à la budésonide (fMP3), en termes de déposition in vitro avec deux types de lactose couramment utilisés dans les poudres pour inhalation :

• Le lactose 325 Mesh, α -lactose cristallin monohydraté de granulométrie grossière. La distribution de taille particulaire a été mesurée par diffraction laser (voie sèche, Mastersizer 2000, Malvern, Royaume-Uni) ; les D(50) et D[4,3] sont respectivement de 57,8 ± 0,6 µm et de 61,0 ± 0,9 µm (n=3).

• Le lactose Microfine, α -lactose cristallin monohydraté micronisé de granulométrie très fine (D(50) = 4,64 ± 0,05 µm; D[4,3] = 5,49 ± 0,05 µm).

Les résultats sont repris dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Résultats de déposition pulmonaire in vitro pour les trois mélanges physiques budésonide/excipients 2:98 (m/m) (MsLI, 100 L/min, 2,4 s, 3 gélules/test, dose nominale 200 μg, n=3).

Fraction pulmonaire (%)	Formulations		
	Lactose 325M	Lactose Microfine	fMP3
	30,9 ± 2,8	43,3 ± 2,2	59,2 ± 2,1

fMP3 offre la meilleure fraction pulmonaire, significativement supérieure à celle obtenue avec le lactose 325 M (p < 0,001) et à celle obtenue avec le Microfine (p < 0,001). Ceci peut s'expliquer par les différences de propriétés de surface, de forme et de taille des différents excipients testés. En effet, comme le montrent les photos obtenues par microscope électronique à balayage (Figure 61), les mPLS sont des particules sphériques de diamètre moyen de l'ordre de 1 à 2 µm dont la surface apparaît comme parfaitement lisse. Par contre, les lactose 325 M et le Microfine se présentent respectivement sous forme de grandes cristaux dont la surface est relativement rugueuse et sous forme d'agrégats de particules micronisées de formes irrégulières. Nous pensons que les forces de liaison existant entre les particules du lactose cristallin et les particules de budésonide sont plus intenses que celles entre les microsphères lipidiques et les particules de principe actif. Un certain nombre d'entre elles sont probablement irréversibles, ce qui empêche la déposition de la budésonide dans les parties inférieures de l'impacteur. D'autre part, la comparaison de la formulation lipidique avec celle du lactose micronisé permet, en éliminant autant que possible l'influence de la taille particulaire, de mieux se rendre compte de l'impact des propriétés de surface et de forme des particules d'excipients sur la déposition pulmonaire. Les microparticules de forme irrégulière du lactose Microfine interagissent probablement de manière plus intense avec les particules de budésonide (comparativement aux microparticules lipidiques de forme sphérique), ce qui provoque également une diminution de la fraction pulmonaire. Toutefois, cette fraction est supérieure à celle de la formulation contenant le lactose grossier. En effet, dans le cas de mélanges de particules micronisées (de taille comparable), les particules de PA et de lactose ont tendance à former des liens interparticulaires lâches, qui seront relativement plus faciles à disperser lors de l'inhalation que les liens à haute affinité caractérisant le mélange PA : excipient porteur de granulométrie grossière.

Influence du rapport pondéral PA/excipient

En se basant sur la théorie de Staniforth selon laquelle la surface des particules d'excipient présente des sites possédant des affinités différentes pour les particules actives, nous pouvons aisément comprendre que le rapport pondéral entre le PA et l'excipient peut avoir un impact capital sur la déposition pulmonaire de formules conventionnelles à poudre sèche (mélanges physiques). Un rapport trop faible provoquera la diminution de la fraction pulmonaire car le PA sera fixé préférentiellement aux sites à haute affinité et risquera de ne s'en séparer que partiellement lors de l'inhalation. Un rapport pondéral trop élevé, par contre, entraînera une déshomogénéisation du mélange suite à l'agglomération des particules de PA en excès par rapport au nombre de sites disponibles et conduira à une variabilité inter-doses élevée.

Les excipients lipidiques furent préparés à partir du ratio cholestérol / Phospholipon 90H 90:10, puis mélangés à des quantités croissantes de budésonide. Les résultats de tests de déposition in vitro pour quatre rapports pondéraux PA/excipients lipidiques variant de 2:98 à 20:80 sont repris dans le Tableau 17.



Figure 61 : Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage : (a) Excipients lipidiques (grossissement 10000 X)

- (b) Lactose 325 Mesh (grossissement 2000X)
- (c) Lactose Microfine (grossissement 1000 X)
| | Rapport pondéral Budésonide / lipides (m/m) | | | | | |
|----------------------------|---|------------|------------|------------|--|--|
| | 2:98 | 5:95 | 10:90 | 20:80 | | |
| Fraction pulmonaire
(%) | 59,2 ± 2,1 | 56,4 ± 2,4 | 52,3 ± 1,9 | 46,0 ± 1,8 | | |

Tableau 17 : Influence du rapport Budésonide/excipients lipidiques sur la fraction pulmonaire (MsLI, 100 L/min, 2,4 s, 3 gélules/test, n=3).

Nous notons que le rapport 2:98 offre la meilleure FP et que cette dernière diminue graduellement lorsque le rapport pondéral augmente. La théorie de Staniforth est surtout valable pour les particules de transporteurs de granulométrie grossière qui se présentent sous forme de cristaux irréguliers (lactoses cristallins) comprenant des parties planes et des surfaces rugueuses ou poreuses pouvant lier les particules de PA. De ce fait, l'hypothèse de l'existence de zones à haute affinité et faible affinité ne s'applique probablement pas aux microparticules lipidiques car elles présentent une forme régulière (sphères) et une surface lisse. Les mélanges peuvent incorporer des quantités élevées de PA sans observer de phénomène de démélange car les granulométries du PA et des excipients sont comparables. Cependant, les FP les plus élevées sont obtenues pour les rapports les plus faibles car les particules de PA sont réparties de manière plus homogène à l'état désaggloméré (particules individuelles). Au fur et à mesure que le rapport pondéral augmente, la probabilité de trouver des particules de PA à l'état aggloméré augmente, avec pour conséquence une diminution de la déposition pulmonaire car les interactions PA-PA sont plus intenses que les interactions PA-mPLS. Il est à signaler que le test t de Student ne révèle pas de différence significative entre la formulation à 2 et à 5 % en PA (p = 0.2060). Nous avons choisi le rapport 2:98 (fMP3) et un poids unitaire final de 10,0 mg pour des raisons purement pratiques (cf. IV.4.Etude de déposition pulmonaire des mPLS sur volontaires sains) afin d'obtenir une dose nominale de 200 µg en budésonide, identique à la dose unitaire de la formulation de référence.

Influence du taux de remplissage des gélules

Nous terminons cette partie consacrée à l'influence de divers paramètres sur la déposition pulmonaire par l'optimisation de la masse de poudre dans la gélule. Une série de gélules fut remplie de 10, 20 et 30 mg du mélange physique fMP3 puis testées sur l'impacteur liquide multi-étages couplé au Spraytec.

Comme le montrent les résultats de l'analyse granulométrique (Tableau 18), les diamètres volumétriques médian et moyen passent respectivement de 3,8 à 4,6 μ m et de 5,6 à 7,2 μ m lorsque le taux de remplissage est augmenté. Il en résulte une diminution sensible de la déposition pulmonaire. L'analyse statistique menée sur les FP révèle une différence significative entre les 3 valeurs obtenues (p = 0.0018).

Tableau 18: Influence du taux de remplissage en poudre: Résultats des mesures granulométriques (diffractomètre laser Spraytec) et de la fraction pulmonaire (MsLI, 100 L/min, 2,4 s, 3 gélules/test) obtenus pour fMP3 (10, 20 et 30 mg dans une gélule, n=3).

Masse de fMP3 (mg)	Diamètre des	particules (µm)	Vetum	ED (8/)	
	D(50)	D[4,3]	(%)	FP (70)	
10	$3,8 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,5$	70 ± 2	60 ± 2	
20	4,3±0,1	$6,5 \pm 0,2$	58 ± 1	50 ± 3	
30	4,6±0,2	$7,2 \pm 0,3$	56 ± 2	47 ± 4	

Le volume occupé par fMP3 semble donc jouer un rôle primordial dans la redispersion de la poudre en particules individualisées. Le mécanisme de désagrégation de l'Aeroliser[®] repose sur la rotation de la gélule suite aux turbulences induites par l'inspiration et sur la libération de la poudre à travers les quatre orifices situés aux deux pôles de la gélule. Il est donc évident qu'au plus l'espace occupé dans la gélule est petit, au plus l'expansion de la poudre est grande et favorise cette redispersion. Ajoutons à cela qu'une diminution du degré de remplissage peut aussi réduire les risques de tassement de la poudre, susceptible d'entraver la désagglomération des amas de particules.

Nous nous attendions à une réduction encore plus marquée de la FP, notamment en remplissant pratiquement les trois-quarts de la gélule (30 mg), mais tout porte à croire que les forces d'interaction PA/excipients lipidiques sont facilement réversibles et/ou que la grille placée au-dessus de « la chambre de rotation » contribue fortement à la restitution de la poudre sous forme de particules individualisées.

2.3.3. Etudes de stabilité

Nous avons remarqué lors de l'étude portant sur l'évaluation des propriétés thermiques et cristallines des mPLS (cf. chapitre IV.2. Caractérisation des microparticules lipidiques solides) que les différents ingrédients ont subi des modifications de leur état physique durant le processus d'atomisation. Ainsi, le traitement par spray-drying d'une solution de budésonide a induit la transformation de la matière première en un produit amorphe thermodynamiquement instable, tandis que le traitement des solutions lipidiques, dans les mêmes conditions opératoires, a généré des microparticules partiellement amorphes.

Partant de ce constat, il est fort probable que les substances actives figées dans les matrices lipidiques soient, contrairement aux particules actives cristallines mélangées physiquement aux excipients porteurs, à l'état amorphe. Nous pouvons dès lors nous attendre à des évolutions physiques (transformation cristalline et modifications des propriétés de dissolution) et chimiques (dégradation des PA thermolabiles) lors du stockage.

C'est pourquoi trois des formulations lipidiques produites par atomisation, à savoir le mélange physique fMP3_{budé}, et les deux matrices fM2_{fluti}, et fM2_{budé}, ont été préconditionnées dans des gélules et emballées dans des blisters aluminium / aluminium dans le but d'évaluer leur stabilité au cours du temps.

Les conditions de stabilité ont été les suivantes :

- 25°C/60% HR (temps réel).
- 30°C/65% HR (condition intermédiaire).
- 40°C/75% HR (vieillissement accéléré).

Les paramètres pris en compte sont la fraction pulmonaire, déterminée à l'aide du MsLI, la taille particulaire, mesurée par le Spraytec, et la teneur en PA, déterminée par HPLC. Les résultats sont repris dans le Tableau 19 et la Figure 62.

Il est important de souligner que la stabilité des excipients n'a pu être évaluée par manque de sensibilité de la technique analytique employée (détection U.V). Elle devra faire l'objet d'une étude approfondie (analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance associée à un Détecteur de Diffusion de Lumière Evaporatif (DDLE)). Tableau 19 : Résultats de stabilité des mPLS conditionnées en blisters ALU/ALU.

(a) fMP3hudé.

Par	Paramètre testé		Conditions de stockage			
r di			25°C/60% HR	30°C/65% HR	40°C/75%HR	
D#		0	59 ± 2	59 ± 2	59 ± 2	
E	FP (%)	1	60 ± 3	59 ± 3	59 ± 1	
P		3	60.1 ± 0.8	59 ± 2	53 ± 4	
s		6	60 ± 2	58 ± 2	54 ± 3"	
IT		0	89 ± 5	89 ± 5	89±5	
I	Taux de	1	103 ± 2	104 ± 6	90 ± 2	
0	(%)	3	98±2	103 ± 2	90 ± 3	
N	(14)	6	91 ± 2	91 ± 7	93 ± 5	
Т ##		0	3.8 ± 0.5	3.8 ± 0.5	3.8 ± 0.5	
A	D(50)	1	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2	
I	(um)	3	3.8 ± 0.2	3.9 ± 0.2	4.3 ± 0.4	
L	(Juni)	6	3.7 ± 0.3	4.1 ± 0.3	5.1 ± 0.4**	
P		0	5±1	5 ± 1	5±1	
A	D[4,3]	1	4.9 ± 0.4	5.2 ± 0.6	6.4 ± 0.7	
R	(um)	3	4.9 ± 0.3	5.2 ± 0.2	7±1	
I	(Jan)	6	5.0 ± 0.4	5.6 ± 0.8	8 ± 2	
UL		0	68 ± 1	68 ± 1	68 ± 1	
A	V < 5	1	71 ± 3	67±3	66 ± 4	
I	(um)	3	69 ± 2	66 ± 3	$58 \pm 4^{*}$	
E	E (µm)	6	68 ± 2	65 ± 4	56 ± 3"	
т ###		0	99±2	99 ± 2	99±2	
E	Budésonide	1	97 + 2	100 ± 2	97±5	
N	(%)	3	97 + 5	100 ± 2 101 ± 4	98 + 3	
U		5	00 ± 4	08 + 6	00+4	
R		0	99 ± 4	30 ± 0	79 ± 4	

(b) fM2hudé.

Paramètre testé		Temps	Conditions de stockage			
		(mois)	25°C/60% HR	30°C/65% HR	40°C/75%HP	
	0	51 ± 2	51 ± 2	51 ± 2		
D"	FP (%)	1	52 ± 2	52 ± 2	45 ± 1	
P	11 (70)	3	52 ± 2	53 ± 3	31 ± 1***	
o s		6	50 ± 2	50 ± 2	$35\pm4^{***}$	
I T		0	90 ± 2	90 ± 2	90 ± 2	
I	Taux de	1	94±2	91 ± 5	91 ± 2	
0 N	(%)	3	94±5	93 ± 3	85±3	
		6	94 ± 4	90 ± 4	75 ± 2	
T ##		0	4.0 ± 0.4	4.0 ± 0.4	4.0 ± 0.4	
A	D(50)	1	3.8 ± 0.3	3.9 ± 0.3	4.4 ± 0.3	
L	(µm)	3	4.0 ± 0.4	3.9 ± 0.3	$5.9 \pm 0.3^{*}$	
L E	L E	6	4.0 ± 0.5	3.9 ± 0.6	$5.0\pm0.4^{\ast}$	
Р		0	7 ± 2	7±2	7±2	
A	D[4,3]	1	5.5 ± 0.8	6.0 ± 0.8	8 ± 1	
T	(µm)	3	6 ± 1	5.5 ± 0.7	$10 \pm 2^{*}$	
I C		6	7 ± 2	6 ± 1	$10 \pm 1^{*}$	
U L		0	64 ± 6	64 ± 6	64 ± 6	
A	V < 5	1	65 ± 3	65 ± 3	56 ± 3	
R	(µm)	3	64 ± 5	64 ± 4	$44 \pm 2^{**}$	
E	E	6	62 ± 8	62 ± 6	51 ± 3**	
T ###		0	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	
E	Budésonide	1	99±1	100 ± 1	98 ± 1	
E	(%)	3	101 ± 1	99 ± 1	$94 \pm 2^{*}$	
U R		6	99 ± 2	98 ± 2	$88 \pm 1^{**}$	

(c) fM2fluti.

Paramàtra tastá		Temps	Conditions de stockage			
Para	ametre teste	(mois)	25°C/60% HR	30°C/65% HR	40°C/75%HR	
		0	51 ± 2	51 ± 2	51 ± 2	
D"	ED (8/)	1	49 ± 2	50 ± 1	46 ± 2	
P	FP (70)	3	51 ± 2	50 ± 1	33 ± 1***	
o s		6	49 ± 3	48 ± 2	$35 \pm 5^{**}$	
I		0	92 ± 4	92 ± 4	92±4	
i	Taux de	1	91 ± 2	90 ± 4	92 ± 3	
0	(%)	3	94 ± 1	93±5	90 ± 2	
N	(,,,	6	89 ± 4	93 ± 6	89 ± 4	
т ##		0	4.5 ± 0.6	4.5 ± 0.6	4.5±0.6	
A	D(50)	1	4.6 ± 0.7	4.3 ± 0.7	5.0 ± 0.3	
L	(µm)	3	4.2 ± 0.4	4.2 ± 0.3	$7.1 \pm 0.6^{*}$	
E		6	4.6 ± 0.2	4.5 ± 0.8	$\boldsymbol{6.7\pm0.5}^{*}$	
P		0	6 ± 1	6±1	6±1	
A	D[4,3]	1	7 ± 1	7.1 ± 0.8	9±2	
R	(µm)	3	7 ± 1	7 ± 1	$14 \pm 2^{*}$	
I		6	8 ± 2	8 ± 2	13 ± 1*	
		0	56 ± 7	56 ± 7	56 ± 7	
A	V < 5	1	54±7	57 ± 2	51 ± 2	
I P	(µm)	3	59 ± 4	57 ± 3	$39 \pm 2^{**}$	
E	4	6	56 ± 2	53 ± 9	41 ± 3**	
т ###		0	100 ± 2	100 ± 2	100 ± 2	
E	Propionate	1	101 ± 1	101 ± 1	100 ± 1	
N	de	3	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	
U R	(%)	6	101 ± 1	100 ± 1	100 ± 2	

"MsLI 100 L/min, 2,4 s, 3 gélules/test, n=3. "Spraytec Diffr. laser, n=9. "HPLC, n=3. "p < 0,05 "p < 0,01 "p < 0,001



Figure 62 : Evolution de la fraction pulmonaire (△) et de la teneur en PA (▲) au cours du temps pour les 3 produits testés aux différentes conditions de stockage.

Au vu des résultats, il apparaît que les trois formulations gardent leurs caractéristiques initiales après 6 mois de conservation à 25°C/60% HR et 30°C/65°HR dans des blisters aluminium / aluminium. En effet, aucun changement significatif (p > 0.05) n'a eu lieu tant au niveau du comportement aérodynamique et de la taille particulaire, qu'au niveau de la teneur en PA. Par contre, des modifications se sont produites lors du stockage à 40°C/75% HR. Comme cela a été maintes fois répété, les particules lipidiques ont tendance à se ramollir et fusionner entre elles avec l'élévation de la température ambiante. A titre d'exemple, le diamètre volumétrique moyen de fM2fluti, fM2badé, et fMP3badé, varie, respectivement de 6 à 14 µm, de 7 à 10 µm et de 5 à 7 µm après 3 mois de stockage dans les conditions accélérées. La diminution de la fraction pulmonaire qui en résulte est particulièrement plus marquée pour la forme matricielle que pour le mélange physique. Ainsi, les FP des formulations fM2fuzi, et fM2badé, diminuent de plus de 35 % (FPfM2bal, = 33 %, FPfM2bad, = 31 %) après 3 mois de conservation alors que celle de fMP3budé, ne diminue que de 10 % (FPfMP3budé, = 53 %) par rapport aux valeurs initiales (FP1M2neti, = 51 %, FP1M2hedt, = 51 % et FP1MP3hedt, = 59 %). Dans le premier cas, les substances actives sont figées de manière homogène dans la matrice et ne peuvent donc être séparées des excipients lipidiques. Par contre, dans le mélange physique, les particules de PA interagissent de manière moins intense avec les excipients lipidiques et il est fort probable que l'énergie fournie lors de l'aspiration permette encore, et ce malgré l'agglomération des particules lipidiques, la redispersion de la majeure partie de la substance active sous forme de particules individualisées.

Nous aurions également pu penser que l'humidité relative participe activement à l'agglomération des particules et affecte de ce fait la déposition pulmonaire des mPLS. Néanmoins, la teneur en eau des échantillons lipidiques, déterminée par la méthode KF coulométrique, est faible (1,0 %) et stable au cours du temps, quelles que soient les conditions de conservation. Le type de conditionnement sélectionné (blisters aluminium / aluminium), combiné à la nature hydrophobe des excipients lipidiques, s'est donc révélé efficace dans la protection des formulations vis-à-vis de l'humidité relative.

Par ailleurs, il est important de signaler l'instabilité chimique de la budésonide lorsque celle-ci est présente dans la matrice stockée à 40°C/75% HR. La teneur en PA diminue graduellement au cours du temps ; elle est de 93,7 % après 3 mois et de 88,3 % après 6 mois. Nous pensons que la conservation des mPLS (contenant cette molécule thermosensible, à l'état métastable) dans des conditions «drastiques» conduit à la dégradation du produit fini. En revanche, le propionate de fluticasone, bien qu'étant également dans un état énergétique élevé dans la matrice, semble plus stable que la budésonide (la teneur en PA est toujours de 100 % après 6 mois de conservation).

2.4. Conclusion

Le procédé de micronisation par spray-drying a permis d'obtenir des mPLS de forme sphérique caractérisées par des densités relativement faibles et de bonnes propriétés d'écoulement. La solubilisation des différents ingrédients dans le solvant d'atomisation a donné naissance à des particules matricielles homogènes et parfaitement lisses, incluant les lípides et le PA. Ce dernier, figé dans la matrice, est sous forme amorphe (état thermodynamiquement instable). En revanche, dans les mélanges physiques, les particules actives cristallines sont dispersées de manière homogène autour des microsphères lipidiques, et forment des interactions PA-excipient porteur plus lâches par rapport aux forces cohésives PA-PA caractérisant la matière première.

L'évaluation des performances d'aérosolisation a révélé que les formulations lipidiques présentent un comportement aérodynamique remarquable; les fractions pulmonaires sont significativement supérieures à celles des produits de référence (Pulmicort[®] Turbohaler[®] 200 µg et Flixotide[®] Diskus[®] 250 µg), ainsi qu'à celles d'autres formulations conventionnelles délivrées via le même dispositif d'inhalation (Aeroliser[®]).

Néanmoins, les deux formes étudiées révèlent des profils de déposition différents. Les mPLS produites par atomisation de solutions lipidiques contenant la substance active présentent une taille et une forme particulaires ainsi que des propriétés de surface et d'aérosolisation similaires quel que soit le PA utilisé. Par contre, la redispersion du PA, mélangé physiquement aux excipients lipidiques, est particulièrement conditionnée par l'intensité des forces d'adhésion interparticulaires. Celles-ci diffèrent selon différents facteurs tels que les propriétés physiques du PA utilisé, le rapport pondéral PA/transporteur et le volume de remplissage de la gélule. En présence de PA se caractérisant par des interactions particulaires intenses (PA-PA ou bien PA-excipients porteurs), la forme matricielle permet d'améliorer considérablement la déposition.

Le mélange physique fMP3 et la matrice fM2 apparaissent comme les formulations lipidiques offrant la meilleure déposition in vitro. A la différence des formulations IPS classiques (mélange physique PA-lactose), leur nature hydrophobe les protège de l'humidité relative. Ils sont sensibles à une élévation marquée de la température mais conservent tout de même leurs caractéristiques initiales, tant au niveau du comportement aérodynamique qu'au niveau de la teneur en PA, après 6 mois de conservation à 25°C/60% HR et à 30°C/65% HR dans des blisters aluminium / aluminium. Une vigilance particulière doit cependant être portée aux formes matricielles, thermodynamiquement instables car elles auront tendance à subir des modifications chimiques et physiques à long terme.

3. Optimisation des mélanges de poudres pour inhalation

3.1. Introduction

Le mélange solide – solide peut être défini comme une opération consistant à disperser dans une masse généralement inerte et dans des proportions déterminées un ou plusieurs principes actifs dans le but d'obtenir une homogénéité de répartition compatible avec l'activité thérapeutique. De plus, cette homogénéité de répartition devrait être conservée tout au long des opérations physiques successives [171]. Cette finalité revêt deux aspects essentiels:

- Un aspect technologique, où il s'agit d'aboutir à un mélange homogène quelles que soient les caractéristiques des constituants.
- Un aspect thérapeutique, où il s'agit de s'assurer que chaque unité de prise obtenue par la suite contient effectivement la quantité de PA définie.

L'obtention d'un mélange homogène de poudres pharmaceutiques est donc une étape importante qui conditionne d'emblée la qualité du produit fini. Cette étape dépend des propriétés physiques des poudres à mélanger, tout comme des caractéristiques propres au mélangeur et des conditions opératoires du processus. Elle est d'autant plus difficile lorsqu'il s'agit de poudres sèches pour inhalation dont les particules actives micronisées ont une tendance marquée à l'agglomération. Dans ce cas-ci, le processus de mélange doit permettre la formation de liaisons PA-excipient porteur suffisamment intenses pour assurer une bonne homogénéité. Paradoxalement, ces mêmes interactions doivent être facilement réversibles lors de l'inhalation dans le but de garantir la redispersion sous forme de particules individualisées, et de ce fait, une délivrance optimale du médicament.

Le présent chapitre est consacré à l'optimisation du processus de mélange de poudres à PA cohésif et faiblement dosé destinées à une inhalation par voie sèche.

Nous étudierons l'influence sur l'homogénéité du mode d'action et des caractéristiques de trois appareils fréquemment employés pour effectuer des mélanges solides pulvérulents, à savoir un mélangeur à cuve mobile de type Turbula[®], un mélangeur planétaire (Colette MP-20[®]) et un mélangeur-granulateur à haute vitesse (Mi-Pro[®]). Compte tenu de la quantité importante de poudre requise pour l'ensemble des expérimentations (± 6 kg), l'étude portera sur l'évaluation de l'homogénéité d'une formulation développée par les laboratoires SMB

153

(mélange ternaire propionate de fluticasone : (Lactoses DCL21/Microfine) 1:499 (m/m)), pour laquelle des phénomènes de démélange ont été observés à l'échelle industrielle.

Par la suite, nous mettrons au point les conditions de mélange dans le Turbula 2C pour la formulation lipidique fMP3, contenant 2 % en masse de budésonide et 98 % d'excipients lipidiques (ratio cholestérol / Phospholipon 90H 90:10).

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Produits utilisés

Deux types de lactose ont été utilisés :

- Le Pharmatose DCL 21 (DMV International, Pays-Bas).
- Le Microfine (Borculo Domo, Pays-Bas).

Le premier est un lactose cristallin anhydre caractérisé par de très bonnes propriétés d'écoulement. La distribution de taille particulaire a été mesurée par diffraction laser (voie sèche, Mastersizer 2000, Malvern, Royaume-Uni) ; les D(50) et D[4,3] sont respectivement de $146 \pm 1 \mu m$ et de $151 \pm 2 \mu m$ (n=3).

Le second est un lactose cristallin monohydraté micronisé, employé pour atténuer les interactions propionate de fluticasone (Cipla, Inde) : lactose DCL 21, et par conséquent, améliorer la dispersion des particules cohésives lors de l'inhalation. Il se caractérise par une granulométrie très fine : les D(50) et D[4,3] sont respectivement de 4,64 \pm 0,05 μ m et de 5,49 \pm 0,05 μ m (n=3).

L'inhalateur a été fourni par les laboratoires SMB (Belgique). Il s'agit du Miathaler[®] (Miat, Italie), un dispositif moyennement résistant dont le mécanisme de fonctionnement est identique à celui de l'Aeroliser[®]. Les gélules utilisées sont en HPMC de taille N°3 (Capsugel, France) et les solvants employés sont de qualité HPLC.

3.2.2. Préparation des différents ratios de lactose

Pour mieux comprendre le phénomène de démélange qui caractérise la formulation de référence (appelons la SMB_{fluti50} = mélange fluticasone : lactoses DCL21/Microfine 80/20 (1:499)), nous allons déterminer les ratios de lactose les plus favorables en termes d'homogénéité du mélange. Cinq ratios de lactose DCL21/Microfine furent préparés : 100/0, 99/1, 90/10, 80/20 et 0/100 (m/m).

Les lactoses ont été préalablement mélangés en utilisant un mélangeur de type « High-Shear » d'une capacité de 5 L (Tri-Chop MGR-5, Lleal, Espagne). Après tamisage sur un tamis de 1 mm d'ouverture, des quantités de 1,5 - 2 Kg sont mélangées durant cinq minutes en adoptant des vitesses de 20 rpm pour l'impeller et de 600 rpm pour le choper.

3.2.3. Préparation des mélanges fluticasone/lactose

Les mélanges PA/différents ratios de lactose furent préparés dans trois mélangeurs se distinguant par leur mode d'action, à savoir un mélangeur à cuve mobile (Turbula 2C[®], Bachofen, Suisse), un mélangeur planétaire (Colette MP-20[®], Belgique), et un mélangeurgranulateur à grande vitesse (High- Shear) (Mi-Pro[®], Pro-C-ept, Belgique).

Il est à noter que le processus de mélange n'est possible que lorsqu'il existe une possibilité de mouvement relatif entre particules. Comme cela est illustré dans la Figure 63, ce phénomène ne peut s'observer que lorsque deux conditions préliminaires ont été remplies : l'expansion préalable du lit de poudre, suivi de son cisaillement ; en aucun cas, il n'y aura de mouvement spontané de particules dans un lit de poudre en équilibre [172, 173].

Pratiquement, cette exigence signifie qu'il faut ménager un espace résiduel suffisant dans un mélangeur pour permettre une dilatation maximale de la poudre et que des forces suffisantes doivent être appliquées dans les trois plans de l'espace [173, 174].



Figure 63 : Conditions préliminaires d'un processus de mélange [172].

3.2.3.1. Le mélangeur Turbula

Il s'agit d'un dispositif à agitation tridimensionnelle destiné à recevoir un récipient cylindrique (d'une capacité maximale de 2 L), dont le contenu est soumis à un mouvement alternatif et pulsatoire (Figure 64). La cinétique du système implique une rotation alternativement accélérée puis ralentie de l'un des axes de commande, les rapports en ce qui concerne l'autre axe étant inversés, de sorte que l'une des moitiés du récipient subit un effet d'accélération et l'autre une action de freinage. Il en résulte deux tourbillons qui s'interpénètrent et provoquent le phénomène de mélange. Un système de poulies à étages permet de choisir parmi les vitesses d'agitation suivantes : 21,5, 30,0, 46,2, 62,0 et 96,2 rotations par minute (rpm).

Suite à une précédente étude réalisée au sein des Laboratoires SMB qui portait uniquement sur l'évaluation du comportement aérodynamique des poudres, il a été établi que le ratio lactose DCL21/Microfine 80/20 donnait la meilleure déposition in vitro. Par conséquent, nos premiers essais ont été effectués pour ce ratio.

Du fait du cisaillement modéré provoqué par ce type de mélangeur, il a été décidé de réaliser d'abord un pré-mélange propionate de fluticasone : lactoses ratio 80/20 (1:99). Ont suivi le mélange final pour ce ratio (dilution PA : lactoses (1:499) ainsi que l'évaluation des autres ratios de lactose.



Figure 64 : Représentation schématique du mélangeur Turbula [174].

156

Mode opératoire

40 g de poudres correspondant approximativement à un remplissage en volume de 50%, ont été mélangés dans un récipient en polyéthylène d'une capacité de 150 mL.

Trois vitesses de mélange ont été testées : la vitesse de rotation la plus faible (21,5 rpm), une vitesse intermédiaire (46,2 rpm) et la vitesse maximale (96,2 rpm). Les temps de prélèvement des échantillons ont été fixés à t = 5, 10, 15, 20, 30, 45 et 60 min.

Un quart du mélange des lactoses 80/20 est ajouté dans le récipient en plastique et mélangé à la vitesse choisie pendant deux minutes dans le but de saturer les parois du récipient en substances non actives. Puis, la fluticasone est ajoutée en deux temps aux excipients selon le mode « double sandwich » (¼ lactoses, ½ fluticasone, ½ lactoses, ½ fluticasone, ¼ lactoses), et la formulation est mélangée pendant 60 minutes.

3.2.3.2. Le mélangeur planétaire

C'est un dispositif dans lequel l'homogénéité est réalisée par le mouvement planétaire des pales du mélangeur (Figure 65) ; le cisaillement provoqué par le mobile d'agitation induit une circulation intense de la poudre, ainsi qu'une destruction des agglomérats de poudre cohésive.

Nous avons travaillé avec le mélangeur Collette MP-20 (petite cuve) dont la capacité maximale est d'environ 3.5 L et les vitesses appliquées sont de 20, 34, 57 et 97 rpm.





Mode opératoire

L'appareil étant caractérisé par des forces de cisaillement plus intenses que le mélangeur Turbula, il a été décidé d'effectuer les essais d'homogénéité directement sur le mélange final propionate de fluticasone : ratio lactose DCL21/Microfine 80/20 (1:499).

1,5 Kg de poudres, occupant un volume de remplissage d'environ 50 %, ont été mélangés dans la cuve en métal d'une capacité de 3,5 L. L'homogénéité du mélange a été évaluée à trois vitesses de mélange (20, 34 et 57 rpm) et les échantillons ont été prélevés aux temps 5, 10, 15, 20, 30, 45 et 60 min.

La moitié du mélange de lactoses (80/20) est ajoutée dans la cuve en métal et mélangée à la vitesse choisie pendant deux minutes dans le but de saturer le récipient et la surface du bras de mélange en substances non actives. Puis, la fluticasone est ajoutée aux excipients selon le mode « sandwich » (½ lactoses, fluticasone, ½ lactoses), et la formulation est mélangée pendant 60 minutes.

3.2.3.3. Le mélangeur High-Shear

Le Mi-Pro est un appareil de laboratoire spécialement conçu pour des processus de mélange et/ou de granulation impliquant de petites quantités de poudre ou de liquide. L'impeller est constitué d'un bras de mélange cylindrique, terminé par quatre lames inclinées, tournant autour d'un axe central. Le chopper est une sorte de couteau servant à casser les agglomérats formés lors du mélange (Figure 66). Les vitesses de l'impeller et du chopper varient, respectivement, de 0 à 1800 rpm et de 0 à 4000 rpm.





158

Mode opératoire

L'appareil étant, lui aussi, caractérisé par de puissantes forces de cisaillement, il a été convenu de faire les tests directement sur le mélange final propionate de fluticasone : ratio lactoses DCL21/Microfine 80/20 (1:499).

200 g de poudres, correspondant approximativement à un remplissage en volume de 40 %, ont été mélangés dans la cuve en verre.

A la suite d'un test préliminaire, nous avons décidé de fixer la vitesse du chopper à 1000 rpm et de nous focaliser sur l'optimisation de la vitesse de l'impeller. Le test a été réalisé en appliquant des vitesses de rotation de 100, 200 et 500 rpm et en prélevant les échantillons après 2, 5, 10, 15, 20 et 30 min.

La moitié du lactose est ajoutée dans la cuve en verre et mélangée à la vitesse choisie pendant 2 minutes dans le but de saturer le récipient et les bras d'agitation du mélangeur en substances non actives. Puis, la fluticasone est ajouté aux excipients selon le mode « sandwich », et la formulation est mélangée pendant 30 minutes.

3.2.4. Détermination de l'homogénéité

3.2.4.1. Echantillonnage

Toute étude d'homogénéité de mélange doit spécifier [177] :

- La méthode de prélèvement des échantillons.
- La méthode de localisation des prélèvements.
- Le nombre et la taille de prélèvements.

Méthode de prélèvement

L'idéal aurait été de prélever les échantillons à l'aide d'une sonde à prélèvement terminal spécialement conçue pour les poudres cohésives. Malheureusement, nous ne possédons pas ce genre de sonde, et les prélèvements ont été effectués à l'aide d'une spatule en inox tout en veillant à perturber au minimum le lit de poudre.

Méthode de localisation des prélèvements

La cuve a été subdivisée en zones de prélèvement à la surface du lit de poudre ainsi qu'en profondeur comme illustré sur la Figure 67.





Nombre et taille de prélèvements

Nous avons convenu de prélever pour chaque temps de mélange 10 échantillons de taille correspondant à la prise unitaire de chaque formulation testée afin de fournir une estimation suffisante de l'homogénéité du mélange.

Environ 25 mg de poudre ont été prélevées puis pesées au dixième de mg près en vue d'être évalués pour leur contenu en fluticasone.

3.2.4.2. Détermination de la teneur en PA

La teneur en fluticasone au niveau de chaque prélèvement a été déterminée par HPLC (HP 1100 series (Agilent Technologies, Etats-Unis)) selon une méthode validée :

- Colonne chromatographique : Licrospher 100 RP 18 (5µm) 4 x 125 mm (Merck, Allemagne).
- Phase mobile : Acétonitrile tampon phosphate ajusté au pH 3.5 méthanol, 15:35:50 (v/v).
- Débit : 1,5 mL/min.
- Température de travail : 30°C.
- Volume d'injection : 100 µL.
- Longueur d'onde de détection : 240 nm.

Pour chaque temps de mélange, la teneur moyenne en fluticasone, la déviation standard et le coefficient de variation (CV %) ont été calculés à partir des valeurs de dosage obtenues pour les dix prélèvements. Les résultats du pourcentage moyen en PA et du CV % sont représentés graphiquement en fonction du temps de mélange.

3.2.5. Evaluation des performances d'aérosolisation

La dose des particules fines (DPF) et la distribution de la taille particulaire ont été déterminées par la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne 5 [69], en utilisant l'appareil C – Impacteur liquide multi-étages (MsLI).

Des gélules HPMC N°3 contenant 25,0 mg (250 µg de propionate de fluticasone) de poudre ont été utilisées via le Miathaler[®]. Le débit d'aspiration de la pompe a été réglé à 100 L/min pendant 2,4 secondes de façon à appliquer à travers l'inhalateur une pression différentielle de 4,0 kPa correspondant au passage de 4 litres d'air. Trois séries de tests ont été effectuées et les solutions de récupération ont été dosées par la méthode HPLC décrite plus haut. En fonction de la granulométrie seuil des différents étages de l'impacteur, la masse de PA possédant un diamètre aérodynamique inférieur à 5 µm a été calculée par interpolation. Cette masse représente la dose en particules fines (DPF).

3.2.6. Evaluation des propriétés rhéologiques

Une poudre peut être considérée comme un empilement de particules, c'est-à-dire un système dans lequel chaque particule est supportée par contact direct avec d'autres particules ou avec la paroi du récipient. L'évaluation des propriétés de tassement constitue une méthode indirecte d'appréciation de la friction interparticulaire et par là même de la fluidité d'une poudre. En effet, pendant le tassement, les particules sont séparées les unes des autres pendant un temps très court sous l'action des vibrations. Elles peuvent s'empiler de façon plus compacte, plus ou moins rapidement en fonction de la nature et de l'intensité des liens interparticulaires, en conférant une densité apparente plus élevée à la poudre. Les masses volumiques apparentes (brute et tassée) ont ainsi été déterminées par la méthode décrite la Pharmacopée Européenne 5 [157]. L'appareillage est constitué par un dispositif de tassement pouvant provoquer 250 ± 15 chutes par minute (Stampfvolumeter, STAV 2003, Jel, Allemagne) et d'un cylindre en verre gradué.

Des prises d'essai de l'ordre de 50,0 grammes ont subi jusqu'à 1250 chutes, et l'écoulement des poudres a été estimé de manière indirecte en calculant l'indice de compressibilité (dit indice de Carr, I_C) ainsi que l'aptitude au tassement (A_T) selon les formules suivantes :

$$I_{C} = 100 x (\rho_{t} - \rho_{b}) / \rho_{t}$$
(10)

Où : pt est la densité tassée (après 1250 chutes)

pb la densité brute.

Et

$$A_{T} = V_{10} - V_{500}$$
(19)

Où : V10 représente le volume de poudre en mL après 10 chutes,

V500 représente le volume de poudre en mL après 500 chutes.

Au plus la fluidité du matériau est grande, au plus la vitesse d'empilement est élevée (les particules s'organisent rapidement pour former un empilement compact), et donc au plus l'aptitude au tassement et l'indice de Carr sont petits. On considère que l'écoulement est bon lorsque cet indice est inférieur à 25.

3.2.7. Analyse par microscopie électronique à balayage

Enfin, les formulations ont été analysées par microscopie électronique à balayage, couplée à la diffraction aux rayons X (JSM-610 microscope (EDAX CDV "LEAP" detector, Jeol, Japon), afin de localiser les particules de propionate de fluticasone dans les mélanges et de visualiser les interactions particulaires.

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Optimisation du mélange Fluticasone : LactoseDCL21/Microfine

3.3.1.1. Mélangeur Turbula 2C

a) Réalisation de pré-mélanges

Les résultats d'homogénéité des pré-mélanges propionate de fluticasone : lactoses ratio 80/20 (1:99) dans le mélangeur Turbula 2C aux différentes vitesses d'agitation sont représentés dans les Figures 68 et 69.

Nous constatons une très grande variabilité au niveau de la répartition du PA aux trois vitesses d'agitation. Curieusement, l'homogénéité de répartition est meilleure pour les durées de mélange les plus courtes, mais se détériore nettement ensuite et de manière aléatoire en fonction de la durée de mélange. Ces résultats montrent d'une part, la capacité du mélangeur Turbula à former plus ou moins rapidement des mélanges homogènes PA/transporteur, et d'autre part, la stabilité précaire des mélanges ternaires. Les sites à haute affinité (hA) du lactose DCL21 sont saturés par le lactose Microfine et l'intensité des interactions au niveau des sites à faible affinité (fA) semble inférieure à celle des interactions PA-PA, d'où la séparation des particules de fluticasone sous forme d'agglomérats.

Lors de cet essai, nous avons en effet remarqué la formation (très rapidement, après 5 à 10 minutes de mélange) de nombreux agglomérats, traduisant très probablement le regroupement des particules du PA cohésif et par conséquent le démélange de la formulation. L'analyse des résultats d'homogénéité (Figure 68) et l'évolution du coefficient de variation au cours du temps (Figure 69) confirment cette hypothèse. En effet, jusqu'à la dixième minute, seul le mélange à grande vitesse possède un CV acceptable, puis ce coefficient devient supérieur à 10 %, quelle que soit la vitesse choisie.

Cela nous a amené à réaliser un nouveau pré-mélange PA : transporteur (1:99) ne contenant que des particules grossières de transporteur (lactose DCL21, lactoses ratio 100/0) pour évaluer le comportement de la fluticasone avec l'excipient majoritaire (possibilités d'interactions PA-lactose et PA-PA). Ceci permet de garder libre les sites à hA du transporteur et de favoriser la formation de liens plus stables PA/transporteur.



Figure 68 : Influence de la vitesse d'agitation sur l'homogénéisation du pré-mélange propionate de fluticasone : lactoses ratio 80/20 (1:99) dans le mélangeur Turbula.



Figure 69 : Evolution du coefficient de variation lors du pré-mélange propionate de fluticasone : lactoses ratio 80/20 (1:99) dans le mélangeur Turbula aux différentes vitesses d'agitation.

Les résultats d'homogénéité de répartition du PA (Figures 70 et 71) sont nettement meilleurs que ceux obtenus pour la formulation de référence utilisant le rapport lactoses 80:20. Dans ce cas-ci, il semblerait qu'un pré-mélange de 60 minutes soit optimal, quelle que soit la vitesse choisie. Les moyennes et écart-types des valeurs de la teneur en propionate de fluticasone obtenus après 60 minutes de mélange, sont respectivement de $95 \pm 2 \%$, $99 \pm 3 \%$ et 100 $\pm 4 \%$ aux vitesses de 21,5 rpm, 46,2 rpm et 96,2 rpm. Néanmoins, comme le montre la Figure 71, le coefficient de variation atteint des valeurs très faibles et se stabilise après 15 minutes de mélange à 21,5 rpm, tandis que ces valeurs varient en dents de scie pour les deux autres vitesses.

Ces résultats montrent que l'adoption de vitesses de mélange élevées peut être à l'origine du phénomène de ségrégation particulaire suite aux mouvements tourbillonnaires créés au sein de la cuve et entraînant la formation et la cassure des agglomérats de particules de PA. Par conséquent, nous avons choisi de réaliser le mélange final à partir du pré-mélange à 21,5 rpm, suivi de l'incorporation, après 30 minutes de mélange, du restant des deux lactoses pour atteindre un ratio final DCL21/Microfine 80/20.

b) Réalisation du mélange final

La formulation fluticasone : DCL21 (1:99) a été mélangée à 21,5 rpm pendant 30 minutes, puis nous avons incorporé la quantité adéquate des lactoses DCL21 et Microfine afin d'atteindre un mélange final PA : ratio lactoses 80/20 de 1:499.

Celui-ci a été mélangé à 21,5 rpm et des prélèvements ont été réalisés après des durées de mélange de 5, 10, 15, 20, 30, 45 et 60 min (Figures 72 et 73).

Les résultats obtenus pour le mélange final confirment la difficulté d'obtenir des mélanges homogènes pour la formulation de référence contenant le ratio lactoses 80/20. En effet, à partir de 5 minutes de mélange, de nombreux petits agglomérats, plus ou moins sphériques, apparaissent dans le mélange. De nouveau, l'évolution croissante du CV en fonction de la durée de mélange (Figure 73) confirme le démélange de la formulation.

Ces résultats montrent que les particules de PA présentent une faible affinité pour les particules de lactose grossier. Les liens PA-excipient porteur sont réversibles et la fluticasone est progressivement « remplacée » par le lactose Microfine (qui est majoritaire par rapport au au PA). Ceci provoque la formation d'agglomérats de particules de PA ou éventuellement d'agrégats de particules cohésives (PA + lactose fin en excès) (cf. IV.3.3.1.4. Analyse SEM).



Figure 70 : Influence de la vitesse d'agitation sur l'homogénéisation du pré-mélange propionate de fluticasone : lactoses ratio 100/0 (1:99) dans le mélangeur Turbula.



Figure 71 : Evolution du coefficient de variation lors du pré-mélange propionate de fluticasone : lactoses ratio 100/0 (1:99) dans le mélangeur Turbula aux différentes vitesses d'agitation.



Figure 72 : Mélange final propionate de fluticasone : lactoses ratio 80/20 (1:499) dans le mélangeur Turbula (21 rpm).



Figure 73 : Evolution du coefficient de variation lors du mélange final propionate de fluticasone : lactoses ratio 80/20 (1:499) dans le mélangeur Turbula (21 rpm).

c) Essais d'homogénéité en présence de billes

Un dernier essai d'homogénéité avec le mélangeur Turbula (à 21,5 rpm) a été effectué pour la formulation de référence en présence de billes en verre de manière à augmenter les forces de cisaillement au sein de la masse de poudre, et de casser ainsi les agglomérats formés lors du mélange.

Les résultats de l'essai d'homogénéité du pré-mélange fluticasone : ratio lactoses 80/20 (1:99) en présence de petites billes en verre (± 5 % en volume du récipient) sont représentés dans les Figures 74 et 75.

L'observation macroscopique de la poudre aux différents temps a permis de constater que la présence des billes provoque, au contraire, un accroissement considérable de la taille des agrégats. Le prélèvement et le dosage de fragments de gros amas de poudre ont confirmé la tendance à l'agglomération des particules de fluticasone. A titre d'exemple, la teneur en PA est respectivement de 130,5 %, 142,8 % et 227,5 % lors des prélèvements n°4 à 30 minutes, n°3 à 45 minutes et n°2 à 60 minutes. De plus, comme le montre la Figure 75, le coefficient de variation ne cesse d'augmenter en fonction du temps ; il atteint plus de 40 % après 60 minutes de mélange. Par conséquent l'ajout de billes, pour ce type de mélange, n'améliore pas l'homogénéité de répartition du PA. Au contraire, cela favorise davantage la tendance au démélange des particules micronisées de fluticasone. Dés lors, la réalisation d'un mélange final en présence de billes n'a pas été envisagée.

d) Essais d'optimisation des ratios lactoses DCL21/Microfine

Les difficultés rencontrées lors de l'opération de mélange de la formulation de référence SMB_{fluti50}, utilisant le ratio lactoses 80/20, nous ont amené à évaluer l'uniformité de teneur de mélanges constitués d'autres ratios en lactoses.

Si on se réfère aux différents études publiées dans la littérature sur l'opération de mélange des poudres d'une part, et la formulation de poudres pour inhalation faisant appel à l'utilisation de mélanges ternaires basés sur la combinaison d'un transporteur grossier et de particules micronisées de lactose d'autre part, il apparaît qu'une limitation de la teneur en lactose micronisé au niveau des formulations permettrait de faciliter l'opération de mélange tout en maintenant les propriétés rhéologiques les plus favorables [60].



Figure 74 : Pré-mélange propionate de fluticasone : lactoses ratio 80/20 (1:99) en présence de billes en verres dans le mélangeur Turbula (21 rpm).



Figure 75 : Evolution du coefficient de variation lors du pré-mélange propionate de fluticasone : ratio lactoses 80/20 (1:99) en présence de billes en verre dans le mélangeur Turbula (21 rpm).

Dès lors, avant d'envisager l'optimisation du mélange sur d'autres types de mélangeurs, nous avons décidé d'évaluer l'homogénéité des pré-mélanges propionate de fluticasone avec d'autres ratios de lactose DCL21 / lactose Microfine à 21,5 rpm. Parallèlement, des essais de déposition in vitro (MsLI) et une évaluation des propriétés rhéologiques ont été réalisés de manière à trouver les formulations qui permettent d'obtenir le meilleur compromis en fonction de ces différents paramètres critiques pour ce type de forme.

Les ratios lactoses DCL21 / Microfine évalués sont le 100/0, 99/1, 90/10, 80/20 et 0/100 ; l'étude portant sur les ratios 100/0 et 80/20 a été décrite précédemment (Figures 68-71).

En partant du ratio 100/0 qui correspond au mélange présentant les propriétés d'écoulement les plus favorables, l'incorporation de quantités croissantes de lactose micronisé permet d'estimer l'effet bénéfique de ce dernier sur l'amélioration de la dispersion du PA lors de l'inhalation, tout en ayant des effets négatifs sur l'homogénéité des mélanges et sur leurs propriétés rhéologiques. Le ratio 0/100 représente le cas extrême qui consiste à mélanger deux poudres micronisées (tailles particulaires comparables) caractérisées par la présence des forces cohésives les plus marquées. Il est à noter que pour chaque ratio étudié, les tests de déposition in vitro ont été effectués sur les pré-mélanges les plus homogènes. Ainsi, en accord avec les résultats des études d'homogénéité, les formulations dont les ratios de lactoses sont 0/100, 80/20, 90/10 et 99/1 ont été testées après un temps de mélange de 60, 5, 15 et 45 minutes, respectivement.

Les résultats d'homogénéisation des pré-mélanges fluticasone : lactoses (1:99) contenant les ratios lactoses 0/100, 90/10 et 99/1 sont repris dans les Fígures 76 et 77. Nous constatons que l'homogénéisation des mélanges est d'autant plus difficile que la proportion de lactose micronisé augmente (exception faite pour le ratio 0/100). En effet, l'uniformité de teneur en PA de la formulation fluticasone : lactoses 90/10, qui est relativement acceptable durant les 30 premières minutes, se détériore nettement ensuite et de manière graduelle en fonction de la durée du mélange. Les résultats d'homogénéité sont encore plus mauvais pour la formulation fluticasone : lactoses 80/20 pour laquelle la formation d'agglomérats de particules micronisées est observée après des temps de mélange très courts (< 5 minutes). Par contre, l'homogénéité de la formulation contenant une faible proportion de lactose micronisé (99/1) est très bonne et comparable à celle de la formulation ne contenant que du lactose grossier (100/0). Enfin, l'opération de mélange semble également plus facile pour le pré-mélange fluticasone : lactose Microfine car les propriétés granulométriques de cet excipient sont proches de celles du PA, ce qui a pour effet de réduire le phénomène de ségrégation particulaire.

170







Figure 77 : Evolution du coefficient de variation pour les pré-mélanges propionate de fluticasone : lactoses (1:99), contenant différents ratios DCL21/Microfine dans le mélangeur Turbula (21 rpm).

Dans le pré-mélange PA/ratio lactoses 0/100, la poudre a tendance à se « pelletiser » très rapidement, avec la formation de petits agglomérats sphériques dont la composition semble relativement uniforme à partir de 15 minutes de mélange ; les valeurs de la teneur en PA et de CV étant tout à fait acceptables (Figures 76 et 77). Ceci permet de supposer que les particules micronisées de PA et de lactose ont tendance à participer à la formation de ces agrégats (pellets) en établissant des liens interparticulaires lâches. Un mécanisme continu de cassure-reformation des agglomérats au cours du temps permet d'expliquer l'homogénéisation de ce type de mélange. Du point de vue de la déposition in vitro, la DPF est de 76 ± 1 µg, ce qui est proche de la formulation de référence 87 ± 2 (Tableau 20). Néanmoins, les propriétés rhéologiques de cette poudre sont les plus médiocres (par rapport aux autres mélanges) ; l'aptitude au tassement, définie comme la différence entre le volume après 10 chutes et celui après 500 chutes, est de 29 mL et l'indice de compressibilité est égal à 29 % (Tableau 21).

D'autre part, le pré-mélange fluticasone : ratio 90/10 se comporte relativement bien pendant les trente premières minutes puis de petits agglomérats riches en PA se forment et le CV passe de 4,66 % à 48,56 % (Figure 77). A titre d'exemple, le dosage de deux amas, prélevés à t=45 min et t=60 min, révélait des teneurs respectives de 121,4 % et 282,0 %. La DPF, déterminée sur le pré-mélange obtenu à t=15min (% PA = 100 ± 5), est de 73 ± 1 µg et l'écoulement est bon (Tableaux 20 et 21).

Enfin, le pré-mélange fluticasone : ratio lactoses 99/1 présente de très bons résultats (en termes d'homogénéité) quel que soit le temps de prélèvement (Figure 76) ; la teneur en PA avoisine les 100 % et le CV reste dans les limites raisonnables (2-5%). Les résultats d'écoulement sont les meilleurs en comparaison aux autres formulations testées, cependant la DPF est trop faible ($34 \pm 1 \mu g$). Cela est probablement dû au fait que la quantité de lactose fin n'est pas suffisante pour saturer la majorité des sites à haute affinité du lactose grossier et atténuer ainsi les interactions PA/excipient porteur. Les résultats de déposition auraient probablement été encore plus faibles pour le ratio lactoses 100/0.

Tableau 20 : Résultats des tests de déposition in vitro pour les formulations fluticasone : lactoses (1:99), contenant différents ratios de lactoses DCL21/Microfine (99/1, 90/10, 80/20 et 0/100) (MsLI, 100L/mi, 2,4 s, 5 gélules/test, n=3).

	ratio 99/1 t = 45min *		ratio 90/10 t = 15min *		ratio 80/20 t = 5min *		ratio 0/100	
	PA (µg)	écart-type	PA (µg)	écart-type	PA (µg)	écart-type	PA (µg)	écart-type
Inhalateur	209	14	209	13	181	18	249	8
Gorge	67	4	147	7	148	9	77	2
Étage 1	585	9	234	11	247	10	252	18
Etage 2 <10,1µm	5.3	6	129	9	153	3	189	0.6
Etage 3 -3,3um	98	4	229	8	289	9	237	2
Etage 4 <2,4µm	61	2	118.4	0.2	149	7	123	5
Filtre <1.3µm	18	1	33	7	17	3	31	4
Récupération (%) **	87.3	0.8	88	1	95	2	93	0.5
DPF (rg)	34	1	73	1	87	2	76	1

* temps de mélange optimal

** Dose nominale de PA : 250 µg/gélule

Tableau 21 : Evaluation des propriétés d'écoulement des formulations de fluticasone : lactoses (1:99), contenant différents ratios de lactoses DCL21/Microfine (99/1, 90/10, 80/20 et 0/100) (n=3).

	ratio 99/1	ratio 90/10	ratio 80/20	ratio 0/100	
Densité brute (g/cm ³)	0.651	0.618	0.585		
Densité tassée (g/cm ³)	0.730	0.763	0,786	0.421	
Indice de Carr (%)	11	19	26	29	
Aptitude au tassement (mL) Volume avant tassement (mL)	4 77	7 81	15 86	29 167	

En conclusion, il est clair que le comportement de la formulation de référence propionate de fluticasone : ratio lactoses DCL21/Microfine 80/20 est le meilleur en termes de déposition pulmonaire. La quantité ajoutée de lactose micronisé semble optimale ; elle atténue les interactions PA/excipient porteur, et de ce fait, permet une meilleure dispersion de la substance active lors de l'inhalation. Néanmoins, les difficultés rencontrées lors de l'opération de mélange avec le mélangeur Turbula (instabilité des liaisons PA-excipients et ségrégation particulaire suite aux mouvements tourbillonnaires créés au sein de la cuve) nous incitent à craindre certaines complications lors des opérations de mélange et de mise en gélules de lots industriels.

Pour remédier à ce phénomène de démélange progressif, d'autres types de mélangeurs présentant un brassage plus important de la masse de poudre ont été employés.

3.3.1.2. Colette MP-20

Les résultats d'homogénéité obtenus avec le mélangeur planétaire (Figures 78 et 79) permettent de constater que cet appareil est nettement plus efficace que le Turbula pour l'homogénéisation des mélanges contenant une forte proportion en particules micronisées. Aucun phénomène de démélange n'a été observé avec le mélangeur planétaire, même après 60 minutes de mélange.

Dans ce cas-ci, il semblerait qu'un mélange de 20 minutes soit optimal, quelle que soit la vitesse choisie. Les moyennes et écart-types des valeurs de la teneur en propionate de fluticasone obtenus après 20 minutes de mélange sont, respectivement, de $95,9 \pm 0,7 \%$, $98 \pm 4 \%$ et $95 \pm 4 \%$ aux vitesses de 20, 34 et 57 rpm. Cependant la vitesse optimale semble être 20 rpm. Le coefficient de variation atteint déjà une valeur minimale après 15 minutes de mélange à cette vitesse, à la différence des vitesses supérieures pour lesquelles le CV ne tend à se stabiliser qu'après une heure de mélange (les valeurs restant tout de même dans des limites acceptables (2-5%)). De plus, l'adoption de faibles vitesses de mélange permet également de limiter la génération de poussières (pertes potentielles en PA qui pourrait se déposer au niveau des parois du mélangeur).



Figure 78 : Influence de la vitesse d'agitation sur l'homogénéisation du mélange propionate de fluticasone : lactoses ratio 80/20 (1:499) dans le mélangeur Collette MP-20.



Figure 79 : Evolution du coefficient de variation lors du mélange propionate de fluticasone : lactoses ratio 80/20 (1:499) dans le mélangeur Colette MP-20 aux différentes vitesses d'agitation.

3.3.1.3. Mi-Pro

Ce mélangeur de type High-shear, de par ses forces de cisaillement intenses, est également nettement plus efficace que le Turbula. Aucune tendance à l'agglomération des particules cohésives n'a pu être constatée, même après 60 minutes de mélange. Les résultats du pourcentage moyen en PA et du CV sont représentés graphiquement en fonction du temps de mélange dans les Figures 80 et 81.

Notons qu'il faut modérer la vitesse d'agitation du bras principal de mélange (impeller) afin d'éviter le phénomène de démélange et la génération de poussières, mais également pour éviter la tendance à la granulation particulaire.

Nous estimons que la vitesse de 100 rpm est trop faible pour assurer un mélange homogène au cours du temps. En effet, le coefficient de variation, une fois stabilisé, est supérieur aux valeurs obtenues pour les autres vitesses de mélanges (Figure 80). La formulation semble bien se comporter à 200 rpm. En revanche la poudre a tendance à se comprimer en plaques à 500 rpm à cause des conditions de mélange trop intenses ; une partie de la poudre reste au niveau supérieur du récipient et ne participe plus de manière régulière au mouvement provoqué par les lames. L'évolution du coefficient de variation au cours du temps confirme cela ; les valeurs du CV à 200 rpm sont les plus faibles et tendent à se stabiliser à 2% après 20 minutes de mélange. Par conséquent, les meilleurs résultats d'homogénéisation seront obtenus en appliquant une vitesse de 200 rpm au niveau de l'impeller et de 1000 rpm au niveau du chopper pendant 20 à 30 minutes.

3.3.1.4. Analyse SEM

Pour clôturer cette étude, les différents constituants du mélange ainsi que le produit fini ont été observés par microscopie électronique à balayage (SEM).

Du point de vue morphologique, le propionate de fluticasone et le lactose Microfine se présentent sous forme d'agglomérats de particules micronisées et de formes irrégulières (Figure 82 (a) et (b)), alors que le lactose DCL21 se compose de grandes particules (~150 µm) cristallines dont la surface est relativement rugueuse (Figure 82 (c)).



Figure 80 : Influence de la vitesse d'agitation sur l'homogénéisation du mélange propionate de fluticasone : lactoses ratio 80/20 (1:499) dans le mélangeur Mi- Pro.



Figure 81 : Evolution du coefficient de variation lors du mélange propionate de fluticasone : lactoses ratio 80/20 (1:499) dans le mélangeur Mi-Pro aux différentes vitesses d'agitation.



Figure 82 : Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage : (a) Propionate de fluticasone (grossissement 1000 X)
(b) Lactose Microfine (grossissement 150 X)

- (c) Lactose DCL 21 (grossissement 150 X)


Figure 83 : Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage :

(a) mélange final dans le Mi-Pro (impeller 200 rpm) (grossissement 150 X)

- (b) mélange final dans le Turbula (grossissement 50 X)
- (c) mélange final dans le Turbula (grossissement 250 X)

L'interprétation des résultats d'homogénéité obtenus pour le mélange final SMB_{fluti50}, dans les trois types de mélangeur peut s'appuyer sur les observations faites au microscope électronique. Ainsi, dans le mélange effectué dans le Mi-Pro ou dans le Colette MP-20 (Figure 83 (a), les fines particules de PA et de lactose compétiteur se fixent et se répartissent de manière homogène sur les grains du lactose porteur. Par contre, il semblerait que les forces de cisaillement induites par le Turbula ne soient pas suffisamment intenses pour casser la totalité des agglomérats de particules cohésives (PA et/ou PA-Microfine) qui apparaissent au cours du temps et qui sont responsables du démélange de la formulation (Figure 83 (b) et (c)).

3.3.2. Optimisation du mélange Budésonide / excipients lipidiques

Le développement des formulations lipidiques de type mélange physique « fMP » requiert, à la différence des formulations de type matriciel « fM », l'optimisation du processus de mélange. A cet égard, le mélangeur à cuve mobile Turbula 2C fut choisi car il s'agit d'un dispositif adapté aux mélanges de lots de poudre de petite taille (la capacité de la cuve étant variable, allant de quelques dizaines de mL à 2 L). De plus, l'opération de mélange y semble plus facile pour des poudres de tailles particulaires comparables (cf. mélange de poudres micronisées propionate de fluticasone : lactose Microfine).

Les résultats d'homogénéité du mélange budésonide : ratio cholestérol / Phospholipon 90H 90:10 (2:98) dans le mélangeur Turbula 2C aux différentes vitesses d'agitation sont repris dans les Figures 84 et 85.

L'observation macroscopique de la poudre a permis de constater que celle-ci a tendance à se « pelletiser », formant de petits pellets dont la composition semble relativement uniforme à partir de 30-45 minutes de mélange, quelle que soit la vitesse choisie. Tout comme dans le cas du mélange propionate de fluticasone : lactose Microfine, les particules micronisées de PA et d'excipients lipidiques participent à la formation de ces agrégats (pellets) en établissant des liens interparticulaires lâches. Un mécanisme continu de cassure – reformation des agglomérats au cours du temps permettrait d'expliquer l'homogénéité de ce type de mélange.



Figure 84 : Influence de la vitesse d'agitation sur l'homogénéisation du mélange budésonide : cholestérol / Phospholipon 90H ratio 90:10 (2:98) dans le mélangeur Turbula.



Figure 85 : Evolution du coefficient de variation lors du mélange budésonide : cholestérol / Phospholipon 90H ratio 90:10 (2:98) dans le mélangeur Turbula aux différentes vitesses d'agitation.

Les moyennes et écart-types des valeurs de la teneur en budésonide obtenus après 45 minutes de mélange, sont respectivement de 99 \pm 4 %, 98 \pm 2 % et 102 \pm 2 % aux vitesses de 21,5, 46,2 et 96,2 rpm. Cependant, la vitesse optimale semble être 96,2 rpm. Comme le montre la Figure 85, les valeurs du coefficient de variation obtenues après 30 minutes de mélange à cette vitesse sont faibles et stables, à la différence des vitesses inférieures, pour lesquelles le CV ne tend pas à se stabiliser. Comparativement au mélange propionate de fluticasone : lactose Microfine, ce mélange apparaît relativement moins homogène à 21,5 rpm, probablement à cause de la différence de stabilité des liaisons PA/transporteur.

Les particules lipidiques étant sphériques, l'intensité des interactions est inférieure à celle des interactions PA-PA, et cela conduit à une tendance plus marquée à la séparation des particules de budésonide sous forme d'agglomérats. Par ailleurs, contrairement aux mélanges contenant un excipient porteur de granulométrie grossière tel que le DCL21, pour lesquels nous avons observé une ségrégation des particules en fonction de leur taille lorsque les forces centrifuges appliquées dans le Turbula étaient de plus en plus grandes, le mélange physique lipidique semble insensible à ce phénomène. Dès lors, l'augmentation de la vitesse de mélange ne peut qu'être bénéfique pour assurer un brassage optimal de la poudre.

3.4. Conclusion

Il est particulièrement difficile de définir des conditions de mélange standard pour des mélanges solides pulvérulents. Cependant, il est possible d'établir des critères généraux de choix, en se basant sur les propriétés physico-chimiques des constituants du mélange, ainsi que sur le mode d'action et les caractéristiques propres du mélangeur utilisé.

Les formulations conventionnelles pour inhalateurs à poudre sèche présentent un aspect paradoxal : si l'adhésion des particules de PA au niveau des sites de liaison de l'excipient porteur est une condition sine qua non pour assurer la bonne homogénéité du mélange, la redispersion sous forme individualisée de ces mêmes particules lors de l'inhalation est une condition tout aussi indispensable pour que le PA se dépose dans le tractus respiratoire inférieur. C'est pourquoi il est courant d'inclure dans ce type de formulations un second excipient de granulométrie plus fine, capable de modifier les forces d'adhésion du système binaire. Néanmoins, les résultats d'homogénéité obtenus pour les différentes formulations propionate de fluticasone : Lactose DCL21/Microfine montrent clairement qu'il est d'autant plus difficile d'obtenir des mélanges homogènes que la proportion d'excipient micronisé est augmentée (proportions supérieures à 1 %). Il est évident que pour ces formulations, les phénomènes de démélange sont favorisés, non seulement durant l'étape de mélange en fonction du type de mélangeur utilisé et des conditions opératoires adoptées, mais également à l'occasion de toutes les opérations de transfert et de remplissage que pourrait subir la masse de poudre à l'échelle industrielle.

A la suite de ce travail, il a été démontré que l'obtention d'un mélange homogène, à partir d'une formulation contenant un principe actif cohésif et faiblement dosé et deux types de transporteurs dont l'excipient majoritaire est de taille grossière, implique l'usage de mélangeurs capables de provoquer des cisaillements importants qui favorisent une « circulation intense » de la poudre et une destruction des agglomérats de particules cohésives. Les conditions d'agitation doivent cependant être modérées pour éviter le phénomène de démélange et la génération de poussières.

Il est donc recommandé, dans le cadre de ce mélange bien spécifique et à l'échelle laboratoire, de travailler avec un mélangeur planétaire de type Collette MP-20, à la vitesse de 20 rpm ou bien avec un mélangeur Hìgh-Shear de type Mi-Pro, aux vitesses de 200 rpm (impeller) et de 1000 rpm (chopper) pendant 20 à 30 minutes. Il est important de souligner que ces conditions opératoires ont été mises au point pour un volume de remplissage des cuves avoisinant les 50 %, et que l'addition du principe actif doit s'effectuer en adoptant la méthode dite en « sandwich », après une courte période de pré-mélange des excipients afin de saturer les cuves et les bras des mélangeurs en substances non actives.

Par ailleurs, contrairement aux mélanges conventionnels, il a été démontré que le mélange physique budésonide : excipient lipidique (2:98 m/m), dont les particules sont de tailles comparables, pouvait s'effectuer de façon efficace dans un mélangeur à cuve mobile de type Turbula 2C sans pour autant subir un phénomène de ségrégation en fonction de la taille des particules. Le mélange optimal a été réalisé en adoptant une vitesse de rotation de 96,2 rpm pendant 45 minutes. Soulignons que ces conditions opératoires ont été mises au point pour un volume de remplissage du récipient en plastique avoisinant les 50 %, et que l'addition du principe actif doit s'effectuer en adoptant le mode « sandwich », après une courte période de pré-mélange des excipients afin de saturer le récipient en substances non actives.

Il est évident que l'étape suivante consistera à réaliser une transposition d'échelle pour adapter ces conditions de mélange à des mélangeurs présentant des capacités plus importantes, tout en respectant les caractéristiques géométriques (cuve et organes de mélange) des mélangeurs à faible capacité utilisés lors de cette étude. De plus, il est également impératif de procéder à une validation de la stabilité des mélanges (simulation de transfert et/ou de remplissage de gélules) de manière à pouvoir mettre en évidence tout phénomène de démélange qui pourrait se produire.

4. Evaluation de la déposition pulmonaire des mPLS sur volontaires sains

4.1. Introduction

Suite aux résultats encourageants obtenus à partir des tests de déposition sur l'impacteur en verre et sur l'impacteur liquide multi-étages d'une part, et en l'absence de tests de dissolution in vitro suffisamment fiables pour mettre en évidence une libération prolongée à partir de formes pulmonaires d'autre part, nous nous sommes intéressés, dans le cadre de cette dernière partie expérimentale, à l'étude de la déposition pulmonaire des mPLS in vivo.

Deux formulations lipidiques de budésonide, une forme matricielle et un mélange physique sélectionnés sur base de leur performance d'aérosolisation, ainsi que le produit de référence, Pulmicort[®] Turbohaler[®], ont été testés sur des volontaires sains.

Comme cela a été mentionné dans la partie introductive, il existe différentes techniques permettant d'évaluer la déposition pulmonaire de formes inhalées [87, 178]. Parmí celles-ci, l'imagerie radioactive (la scintigraphie gamma, la SPECT et la PET) constitue le mode d'évaluation in vivo le plus fiable et le plus répandu [79]. Nous avons opté pour une étude pharmaco-scintigraphique : l'examen scintigraphique permet d'évaluer la dose de médicament atteignant effectivement le poumon, ainsi que sa répartition au sein de ce tissu, tandis que l'étude pharmacocinétique vise à quantifier la fraction du médicament qui est résorbée puis éliminée après inhalation. Cette dernière approche pourra ainsi mettre en évidence une éventuelle libération prolongée du principe actif à partir de la forme matricielle.

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Produits utilisés

Les formulations fM2 et fMP3, dont la composition quantitative est renseignée dans le Tableau 6, ont été produites à partir de solutions lipidiques à 10 % m/m dans l'isopropanol selon la procédure décrite dans la partie IV.A (Production de microparticules lipidiques solides). Le Pulmicort[®] Turbohaler[®] 200 µg (AstraZeneca, Suède) a été acheté en pharmacie. L'Aeroliser[®] (Novartis, Suisse) a été équipé de gélules en HPMC de taille N°3 (Capsugel, France). Les réactifs employés sont de qualité analytique et les solvants de qualité HPLC.

4.2.2. Procédé de marquage

Le marquage des trois formulations a été effectué en adaptant une méthode décrite dans la littérature [93]:

En ce qui concerne le mélange physique fMP3, le technétium 99 métastable (^{99m}Tc) a été extrait dans une ampoule à décanter de la phase aqueuse initiale (générateur de ^{99m}Tc « Nycomed Amersham », Royaume-Uni) dans la méthyléthylcétone (MEC). Puis la MEC a été évaporée au bain-marie sous un courant d'air. Le marqueur fut alors remis en solution dans 1 ml d'eau et mélangé minutieusement à la quantité désirée de budésonide jusqu'à ce que toute la poudre ait été humidifiée. Ensuite, la solution fut lyophilisée, et la poudre obtenue tamisée (315 μm) et mélangée manuellement dans un mortier (à l'aide d'une spatule, sans broyage) avec les excipients lipidiques selon un rapport 2/98. Finalement, 10,00 mg de ce mélange ont été introduits dans des gélules HPMC de taille N°3.

 Pour des raisons techniques (impossibilité de transporter le spray-dryer et son système de refroidissement à l'hôpital Erasme), le procédé de marquage pour la forme matricielle fM2 consistait à adsorber le ^{99m}Tc non pas à la surface des particules de budésonide mais bien à la surface des microsphères lipidiques (produit fini).

Le marqueur, remis en solution dans 1 ml d'eau, a été mélangé minutieusement à la quantité désirée du produit fini jusqu'à ce que toute la poudre ait été humidifiée. Ensuite la solution fut lyophilisée et la poudre obtenue tamisée (315 µm). Finalement, 10,00 mg de ce produit ont été introduits dans des gélules HPMC de taille N°3.

 Pour le produit de référence, les particules de budésonide, se présentant sous forme d'agglomérats lâches de forme sphérique, ont été retirées du dispositif Turbohaler[®] et placées dans un bécher. Le ^{99m}Tc a été extrait dans une ampoule à décanter de la phase aqueuse initiale dans la méthyléthylcétone (MEC). Puis la MEC a été évaporée au bain-marie sous un courant d'air. Le marqueur fut alors remis en solution dans 1 ml d'eau et mélangé minutieusement à une partie des particules de PA en cassant les amas sphériques jusqu'à ce que toute la poudre ait été humidifiée. Ensuite la solution fut lyophilisée et la poudre obtenue mélangée aux particules sphéronisées non marquées. Finalement, le dispositif précédemment vidé a été rempli et amorcé en éliminant les dix premières décharges.

4.2.3. Validation du procédé de marquage

Avant d'entreprendre l'étude scintigraphique, il est essentiel de s'assurer que le procédé de marquage ne modifie pas les caractéristiques granulométriques et aérodynamiques des produits à tester. Les profils de déposition in vitro du médicament marqué et non marqué d'une part, et les profils de déposition in vitro du médicament marqué et du radio-isotope adsorbé à sa surface d'autre part, doivent être similaires afin de considérer le radioélément comme un marqueur fiable.

Pour chaque formulation, nous avons comparé le profil de déposition obtenu sur l'impacteur liquide multi-étages (MsLI) du produit non marqué, du produit marqué et du ^{99m}Tc adsorbé à sa surface. Les essais ont été effectués à 100 L/min pendant 2,4 secondes et à 60 L/min pendant 4 secondes, respectivement, pour l'Aeroliser[®] et le Pulmicort[®] Turbohaler[®] (n=3). La budésonide a été dosée selon la méthode analytique décrite dans la partie IV.2.2.6 (Evaluation aérodynamique de l'aérosol) et le ^{99m}Tc a été quantifié à l'aide d'un compteur gamma (Cobra, Packard Bioscience, Royaume-Uni).

Les masses de principe actif et la « dose » de radioélément possédant un diamètre aérodynamique inférieur à 5 μ m (DPF) ont été obtenues par interpolation, en corrélant les masses/doses cumulées de PA/^{99m}Tc recueillies sur les différents étages de l'impacteur en fonction de la granulométrie seuil des étages correspondants (d_{ce}), et exprimées en termes de fraction pulmonaire (FP).

4.2.4. Protocole expérimental

L'étude a été effectuée de manière randomisée, en simple aveugle, en cross-over chez six volontaires sains. Elle s'est déroulée en trois sessions espacées d'une période de « wash out » de six jours.

Les volontaires ont été répartis en trois groupes de deux, assignés de manière aléatoire à chacune des trois séquences possibles de traitement :

		-										
		J1-2 Période I		J2 à J7		J8-9 Période II		19 à J14		J15-16 Période III		J17
	71	Traitement I	ы		71	Traitement 3	ĸ		71	Traitement 2	ы	
												Examen Médical
Screening	+	Traitement 2	+	Wash-out	+	Traitement I	+	Wash-out	+	Traitement 3	>	
												Fin de l'étude
	Ы	Traitement 3	7		Ы	Traitement 2	7		ы	Traitement 1	71	

Tableau 22 : Design of	de l'étude in vivo
------------------------	--------------------

Sujets	Période I	Période II	Période III	Séquence
1,6	Traitement 1: Pulmicort Turbohaler®	Traitement 3: fM2	Traitement 2: fMP3	I
2,5	Traitement 2: fMP3	Traitement 1: Pulmicort Turbohaler	Traitement 3: fM2	п
3,4	Traitement 3: fM2	Traitement 2: fMP3	Traitement 1: Pulmicort Turbohaler	ш

A chacune des sessions, tous les sujets ont reçu 400 µg de budésonide sous forme de deux gélules administrées à l'aide de l'Aeroliser[®] (pour fM2 et fMP3) ou sous forme de deux bouffées du Turbohaler[®]. La quantité de ^{99m}Tc a été ajustée de telle façon que le niveau maximal de radiation auquel étaient exposés les volontaires durant chacune des périodes n'excède pas 10 MBq. De plus, 1g/5mL de perchlorate de sodium (Hôpital Erasme, Belgique)

a été délivré per os, environ 30 minutes avant l'inhalation, pour inhiber la captation de l'élément radioactif par la thyroïde.

En vue d'empêcher la résorption gastro-intestinale et le passage dans la circulation systémique de la fraction de PA se déposant dans la sphère oropharyngée, 50 g de charbon actif (Carbomix, Norit, Pays-Bas) a été administrée, par voie orale, 5 minutes avant et dans les 10 minutes qui suivirent la prise de la médication [78, 179].

Par ailleurs, avant d'entamer l'étude, les sujets disposaient de gélules et de dispositifs placebo pour s'entraîner à la technique d'inhalation sous la conduite de l'investigateur principal. Il leur a été demandé d'exhaler confortablement et d'inhaler ensuite d'une façon appropriée afin de soutenir l'inhalation pendant quelques secondes. Un masque facial a été placé de manière à recueillir la poudre susceptible d'être exhalée. La Figure 86 illustre les instructions d'utilisation des deux inhalateurs employés.

4.2.5. Volontaires

Les six volontaires sains furent recrutés sur base de critères d'inclusion et d'exclusion, et d'un examen médical. Tous présentaient des valeurs de volume expiratoire forcé en l seconde (VEF₁) et de capacité vitale (CVit) respectives de 102 % (87-119 %) et de 92 % (81-103 %) de la valeur prédite [180]. Les critères d'inclusion et d'exclusion étaient les suivants :

Critères d'inclusion

- A. Sexe: Mâle.
- B. Groupe ethnique: Caucasoïde.
- C. Age: entre 18 et 55 ans.
- D. IMC: entre 19 et 30 kg/m2.
- E. Bon état physique, médical et mental estimé sur base des antécédents médicaux et d'un examen clinique général.
- F. Disponibilité durant la durée de l'étude.
- G. Non fumeurs (ou fumeurs occasionnels).
- H. Signature du formulaire de consentement (participation volontaire à l'étude).

Critères d'exclusion

- A. Dépendance à la drogue et/ou à l'alcool (prise quotidienne supérieure à l'équivalent de 25 g d'alcool pur).
- B. Fumeurs réguliers.
- C. VEF1 < à 50 % de la valeur prédite selon leur âge, sexe, taille et groupe ethnique.
- D. Historique de sensibilité ou de réaction allergique à la budésonide et autres dérivés de la cortisone.
- E. Tout traitement concomitant par d'autres médicaments.
- F. Participation à d'autres études faisant intervenir des radio-isotopes durant les 6 derniers mois.
- G. Participations aux dons de sang durant les 2 derniers mois.

Les données démographiques sont indiquées dans le Tableau 23.

Nº volontaire	Age (années)	Genre	Taille (cm)	Poids (kg)
1	20	м	180	65
2	28	М	180	70
3	53	М	175	79
4	21	М	183	77
5	29	М	188	100
6	22	M	171	69

Tableau 23 : Données démographiques des volontaires sélectionnés.

Tous les volontaires ont préalablement lu attentivement et signé le formulaire de consentement et la « charte » du patient, et l'expérimentation a été conduite à l'Hôpital Erasme (de février à avril 2005), sous la responsabilité du Docteur Alain Michils (Service de Pneumologie), dans le respect de la déclaration d'Helsinki. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'hôpital (réf. : P2004/202) et par le Ministère des Affaires Sociales et de la Santé Publique (réf. : EudraCT n° 2004-004658-14). Les principaux documents requis pour mener cette étude expérimentale non commerciale sont repris en annexe (annexes 2).

Notons que l'étude scintigraphique a été réalisée par le Service des Radio-Isotopes sous la conduite du Pharmacien Bernard Van Gansbeke.



(a)



1. Remove the protective cap from the Cyclofiakar.



2. Hold the Cyclohaler upright /with the mouthpiece pointing up). Open the Cyclohaler by rotating the mouthpiece in the direction of the arrow, helding the capsule chamber still at the same time.



 The inhalation capsules (Cyclocaps) are packa-gad hygierically and protected from moisture. Take one Cyclocaps out of the strip just before use. Ideally, use the flat part of the thumb. The Cyclocaps are made of gelatin.



4. Insart the Cyclocaps into the capsulo chamber. & Check that the Cyclocaps is properly placed in the capsule chamber.

4. Close the Cyclohaler by returning the mouthpiece to the closed position.



7. Hold the Cyclohaler upright (with the mouth-piece pointing up). Take the push buttons between your thumb and index finger. Press briefly and firmly once on the blue button. The Cyclocaps in the capsule chamber is now eventy perforated.



8. Breathe out before you inhale (not through the Cyclobaler(). Tilt your head back slightly. Insert the Cyclobaler mouthpiece into your mouth as far asthe capsule chamber.



the tongue. Close your lips firmly around the mouthpiece and breathe in as strongly and deeply as you can. The Cyclohaler then makes a ratiting sound as the Cyclocaps rotates in the rotation chamber.



10. Take the Cycliobalier out of your mouth. Hold your breath for 5-10 seconds and then breathe out.



11. After inhaling, rinse your mouth with water (do not swallow). Open the Cyclohaler and check that the Cyclocaps is empty. If there is still powder in the Cyclocaps, repeat the process from step ii. 12. Replace the protective cap on the Cyclohaler.

Figure 86 : (a) Instructions d'utilisation de l'Aeroliser®.



Suite Figure 86 : (b) Instructions d'utilisation du Pulmicort® Turbohaler®.

192

æ

4.2.6. Evaluation de la déposition in vivo

Immédiatement après l'inhalation, le sujet a été couché sur le dos entre deux gammacaméras (DHD-SMV, Sopha Medical, France) et l'activité fut enregistrée pendant trois minutes dans les poumons, au niveau de l'oropharynx, de l'œsophage et de l'estomac. Puis un champ d'émission radioactive (« flat flood source »), chargé de 20 mCi, a été interposé entre le détecteur dorsal et la face dorsale du tronc pour délimiter le contour des poumons.

Une fois la « flat flod source » retirée, une seringue contenant approximativement 20 % de l'activité unitaire (le standard) fut placée sur le tronc et son activité enregistrée pendant trois minutes.

Parallèlement, la radioactivité a été mesurée dans le dispositif d'inhalation (gélules et Aeroliser[®] pour les formulations lipidiques / embout buccal pour le Turbohaler[®]) et dans l'air exhalé par le patient (masque facial).

La dose de radiation mesurée chez le sujet doit, pour être exacte, être corrigée en tenant compte des facteurs suivants [181] :

La radiation de base (background) :

Un comptage de blanc a été enregistré pour chaque caméra et soustrait de la radioactivité totale.

· La décroissance radioactive du marqueur :

La décroissance du ^{99m}Tc administré aux sujets a été estimée en tenant compte de celle d'une quantité connue du radioélément contenu dans une seringue et préparé en même temps que les produits à inhaler (le standard).

L'atténuation tissulaire :

L'absorption par les tissus corporels a été prise en compte en faisant la moyenne géométrique entre les comptages de la caméra antérieure et de la caméra postérieure. En plaçant le standard sur le tronc, à hauteur du poumon (face antérieure), et en mesurant la radioactivité résultante à l'aide de chacune des deux caméras, nous pouvons déterminer la fraction de la radiation absorbée par les tissus.

La quantité de radioactivité dans les différents organes est exprimée en pourcentage de la somme des radiations déposées dans le corps, ainsi que celles présentes dans le dispositif d'inhalation et dans le filtre facial. Le comptage total correspondait pratiquement à la dose radioactive nominale. A noter évidemment que la fraction de radio-isotope se déposant dans la zone oropharyngée inclut également l'activité détectée au niveau de l'estomac, des intestins, et dans l'air exhalé.

Par ailleurs, dans le but de quantifier la répartition du PA au sein du tissu pulmonaire, le poumon a été subdivisé en trois régions d'intérêt (RI) : les régions centrale, intermédiaire et périphérique, correspondant approximativement aux différents calibres (respectivement larges, moyens et petits) des conduits des voies aériennes inférieures [182-185]. L'indice de pénétration pulmonaire a été évalué par la détermination du rapport entre la fraction d'activité (et donc de PA) déposée dans la zone périphérique et celle déposée dans la zone centrale des poumons (rapport P/C). Plus la valeur de ce rapport est grande, plus la pénétration du médicament dans les alvéoles pulmonaires est importante [183, 184].

A noter qu'il existe différentes façons de diviser le poumon en ses trois RI ; nous avons choisi la méthode la plus largement répandue, à savoir la technique dite du « quadrillage 5 X 8 » : le poumon gauche tout comme le poumon droit sont assimilés à deux quadrillages constitués de 5 X 8 carrés (Figure 87). Les RI sont alors dessinés sous forme de rectangles imbriqués, de taille variable, centrés autour du hile. La région périphérique correspond à un rectangle 5 X 8 dans lequel est emboîtée la zone intermédiaire (3 X 5), qui à son tour recouvre la zone centrale (2 X 3).

4.2.7. Monitoring des fonctions respiratoires

Lors de chacune des périodes de l'étude clinique, les principaux paramètres fonctionnels respiratoires ont été monitorés à l'aide d'un spiromètre portable (Alpha III, Vitalograph Ltd, Royaume-Uni) avant l'inhalation et 30 minutes plus tard.

Les sujets sélectionnés présentaient tous un volume expiratoire maximum seconde ou volume expiratoire forcé en 1 seconde (VEF₁) supérieur à 50 % de la valeur prédite selon leur âge, sexe, taille et groupe ethnique. En cas de bronchospasme, c'est-à-dire si la VEF_{1post-inhalation} diminuait de plus de 15 % par rapport à la valeur initiale (pré-inhalation), l'investigateur principal se devait de prendre les mesures d'urgence nécessaires et de retirer le sujet de l'étude le cas échéant.



Figure 87 : Délimitation des régions d'intérêt pulmonaires selon la méthode 5 X 8 [185]

4.2.8. Détermination des paramètres pharmacocinétiques

Par volontaire, 21 échantillons sanguins (7ml) ont été prélevés, essentiellement à l'aide d'un cathéter, aux temps suivants : avant l'inhalation puis à t = 10, 20, 30, 40, 50 minutes, 1h, 1h30, 2h, 2h30, 3h, 3h30, 4h, 4h30, 5h, 6h, 7h, 8h, 10h, 12h et 24 heures afin de mesurer les concentrations plasmatiques en budésonide.

Après centrifugation, le plasma a été décanté et placé dans deux tubes étiquetés (aliquote 1 et 2 – N° du patient, N° de la séquence, N° de la période, N° du traitement) et rapidement stocké à -80°C. Le dosage a été réalisé par les laboratoires SMB / Galéphar M.F. par spectrométrie de masse en tandem couplée en amont à une HPLC : LC-MS/MS. Le système analytique comprend :

ASPEC XL et XL4 (Gilson, Etats-Unis).

Automatisation de la préparation des échantillons (purification automatisée par extraction en phase solide)

 HPLC HP 1100 series (Agilent Technologies, Etats-Unis) se composant de : Une pompe à haute pression à gradient de solvant ternaire. Un injecteur automatique (boucle de 500µL).

Un échantillonneur.

Un four thermostatisé.

Un détecteur ultra-violet/visible,

Une interface d'intégration pilotée par un logiciel d'acquisition de données (HP Chemstation Ver. A.06,03).

- Colonne chromatographique: Luna C18 (2); 50mm x 4,6 mm (Phenomenex, USA).
- Pré-colonne: Purospher RP-18e 4 x 4 mm (Merck, Allemagne).
- Spectromètre de masse API3000 triple quadrupole (MDS Sciex, Concord, Canada).

Les paramètres pharmacocinétiques calculés étaient :

- L'AUC, l'aire sous la courbe de la concentration plasmatique du médicament en fonction du temps suivant son administration (en h.pg/mL).
- Le C_{max}, correspondant au pic maximal (en pg/mL).
- Le T_{max}, correspondant au temps requis pour atteindre le pic maximal (en h).

Le Tableau 24 reprend le protocole de l'étude par session.

4.2.9. Méthodes statistiques

Les tests utilisés pour l'analyse statistique des résultats expérimentaux sont, selon la situation, l'analyse de la variance (ANOVA) lors de la comparaison de plusieurs moyennes, ou le test t de Student lors de la comparaison entre deux moyennes.

Durant l'analyse des données PK, la procédure « T », permettant de justifier l'élimination de valeurs aberrantes, a été utilisée lorsqu'une valeur nous paraissait « suspecte » [186]. Le seuil de probabilité choisi (p) pour décider de la signification d'un test est de 0,05 ; la différence est donc considérée comme significative lorsque la probabilité calculée est inférieure à 5 %.

Prélèvement N°	Jour	Heure (h:min)	Temps (h:min)	Remarques	Volume sanguir
PO	1,8,15	07:25	-00:35		7 ml
		07:30	-00:30	Spiromètrie	
		07:55	-00:05	25 g de Norit- carbomix® + 20 cl d'eau	
		08:00	00:00	Inhalation de 2 gélules / 2 bouffées	
				Scintigraphie	
				Rinçage de la bouche avec 3 x 5 el d'eau. 25 g de Norit- carbomix [®] + 20 el d'eau	
P1		08:10	00:10		7 ml
P2		08:20	00:20		7 ml
P3		08:30	00:30		7 ml
		08:30	00:30	Spiromètrie	
P4		08:40	00:40		7 ml
P5		08:50	00:50		7 ml
P6		09:00	01:00		7 ml
P7		09:30	0130		7 ml
P8		10:00	02:00		7 ml
P9		10:30	02:30		7 ml
P10		11:00	03:00		7 ml
P 11		11:30	03:30		7 ml
P12		12:00	04:00		7 ml
		12:05	04:05	Repas standardisé + 20 cl d'eau	
P13		12:30	04:30		7 ml
P14		13:00	05:00		7 ml
P15		14:00	06:00		7 ml
P16		15:00	07:00		7 ml
P17		16:00	08:00		7 ml
-		16:05	08:05	Snack + 20 cl d'eau	-
P18		18:00	10:00		7 ml
-		19:00	11:00	Repas standardisé + 20 cl d'eau	-
P19		20:00	12:00		7 ml
P20	2,9,16	08:00	24:00		7 ml

Tableau 24 : Protocole de l'étude clinique

4.3. Résultats et discussion

4.3.1. Validation du procédé de marquage

Avant de valider le procédé de marquage pour le mélange physique fMP3, et compte tenu de l'impossibilité d'utiliser le mélangeur Turbula dans les conditions définies dans le chapitre relatif à l'optimisation des mélanges de poudre pour inhalation (marquage de lots de l g de poudre), il a fallu tout d'abord s'assurer de l'homogénéité de répartition du PA pour le mélange manuel.

Pour chaque temps de mélange, la teneur moyenne en budésonide, la déviation standard et le coefficient de variation (CV %) ont été calculés à partir des valeurs de dosage obtenues pour dix prélèvements. Les résultats du pourcentage moyen en PA et du CV % sont représentés graphiquement en fonction du temps de mélange (Figure 88 et 89).

Nous constatons que l'homogénéité de répartition du PA s'améliore nettement et de manière graduelle en fonction de la durée de mélange. La moyenne et l'écart-type des valeurs de la teneur en budésonide sont de 99 ± 5 % après 40 minutes de mélange manuel.

Ces valeurs sont tout à fait satisfaisantes et ces conditions de mélange ont donc été choisies pour la réalisation du mélange physique à marquer.

Les profils de déposition obtenus sur le MsLI pour le mélange physique fMP3 non marqué, marqué et le ^{99m}Tc sont représentés dans la Figure 90. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les trois éléments quantifiés sur les différents compartiments de l'impacteur. De plus, les moyennes et écart-types des valeurs de la fraction pulmonaire (FP) du mélange physique fMP3 non marqué, marqué et du ^{99m}Tc sont respectivement de 57,6 \pm 2,9 %, 55,2 \pm 1,8 % et 59,3 \pm 2,5 % ; la différence est considérée comme étant statistiquement non significative (p > 0,05).

En ce qui concerne la forme matricielle fM2, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les trois éléments quantifiés, excepté pour le compartiment « inhalateur » pour lequel la déposition est significativement plus faible (p < 0,001) pour la matrice non marquée que pour la matrice marquée et le radio-isotope (Figure 91). Toutefois ceci est sans conséquence puisque ce compartiment n'entre pas en ligne de compte pour le calcul de la dose particulaire fine. D'ailleurs, la différence entre les FP est statistiquement non significative (p > 0,05). Les moyennes et écart-types des valeurs de FP de la formulation matricielle fM2 non marquée, marquée et du ^{99m}Tc sont respectivement de 46,8 ± 0,7 %, 44,3 ± 0,7 % et 47,6 ± 2,4 %.



Figure 88 : Mélange manuel budésonide : ratio cholestérol / Phospholipon 90H 90:10 (2:98)



Figure 89 : Evolution du coefficient de variation lors du mélange manuel budésonide / ratio cholestérol / Phospholipon 90H 90:10 (2:98)



Figure 90 : Déposition comparative du mélange physique fMP3 non marqué, marqué et du ^{99m}Tc (adsorbé sur la budésonide) sur les différents étages du MsLI (100 L/min, 2,4 s, 3 gélules/test, n=3).



Figure 91 : Déposition comparative de la matrice fM2 non marquée, marquée et du ^{99m}Tc (adsorbé sur les particules) sur les différents étages du MsLI (100 L/min, 2,4 s, 3 gélules/test, n=3).

La corrélation entre le profil de déposition des trois éléments dosés établit clairement que la méthode de marquage est fiable pour les deux types de formulation ; le technétium s'adsorbe de manière homogène à la surface des particules de budésonide / lipidiques et ne modifie pas les caractéristiques granulométriques initiales. Par ailleurs, il a été démontré que ce procédé est reproductible puisque les résultats de déposition pulmonaire des trois essais de marquage, mesurés sur trois jours consécutifs, sont comparables (Tableau 25).

	1	fMP3	non n	narqué	fMP3 marqué								
Etage		Bu	désoni	de		Bu	désonie	de	99mTc				
	Dép	osition	1 (%)	Moy. ±	Déposition (%)			Moy. ±	Dép	osition	1 (%)	Moy. ±	
	J1	J2	J3	E.T.	J1	J2	J3	E.T.	J1	J2	J3	E.T.	
Inhalateur	8.2	6.6	8.4	7.7 ± 1.0	9.6	9.0	12.0	10.2 ± 1.6	11.0	15.8	11.3	12.7 ± 2.7	
Gorge	8.2	7.4	7.0	7.6 ± 0.6	8.0	8,9	7.7	8.2 ± 0.6	9.9	8,4	7.4	8.6 ± 1.3	
Etage 1	5.4	3.5	3.9	4.3 ± 1.0	4.6	5.1	4.3	4.6 ± 0.4	6,0	4,9	4.6	5.2 ± 0.7	
Etage 2	11.5	9.7	10,3	10.5 ± 0.9	10.1	12.1	13.4	11.9 ± 1.6	14.0	10.7	13.0	12.6 ± 1.7	
Etage 3	22.2	23.8	23.1	23.1 ± 0.8	23.4	24.0	24.2	23.9 ± 0.5	24.1	24.4	26.3	24.9 ± 1.2	
Etage 4	17.6	19.4	18.1	18.4 ± 0.9	17.2	16.8	18.1	17.4 ± 0.7	18.6	17.9	19.5	18.7 ± 0.8	
Filtre	16.8	18.9	16.7	17.4 ± 1.2	14.9	15.0	16.5	15.5 ± 0.9	15,3	17.8	18.9	17.3 ± 1.8	
FP (%)	55.2	60,9	56.7	57.6±2.9	54.1	54.2	57.2	55.2 ± 1.8	57.3	58.7	62.1	59.3 ± 2.5	

Tableau 25 : Reproductibilité de la méthode de marquage des formulations lipidiques à l'aide du ^{99m}Tc (MsLI, 100 L/min, 2,4 s, 3 gélules/test, n=3).

		fM2 1	non m	arqué	fM2 marqué								
Etage		Bu	désoni	de		Bu	de	**mTc					
	Dépe	osition	1 (%)	Moy. ±	Déposition (%)			Moy. ±	Dép	osition	Moy. \pm		
	J1 J2 J3		J3	1 E.T.	J1	J2	J3	E,T.	J1	J2	J3	E.T.	
Inhalateur	6.5	6.8	6.6	6.6 ± 0.2	8.7	8.6	8.0	8.5 ± 0.4	9.3	9.0	8.8	9.0 ± 0.2	
ρ < 0.00/ Gorge	16.4	16.4	16.7	16.5 ± 0.2	21.9	22.7	17.8	20.8 ± 2.6	17.0	19.2	20.3	18.8 ± 1.7	
Etage 1	5.3	4.7	5.5	5.1 ± 0.4	4,4	4.4	5.2	4.7 ± 0.5	4.5	4,4	4.3	4.4 ± 0.1	
Etage 2	17.7	16,7	18,0	17.5 ± 0.7	15.9	16.9	16.1	16.3 ± 0.5	17.4	15.2	14.6	15.7 ± 1.5	
Etage 3	30.7	30.4	31.1	30.7 ± 0.4	27.3	28.0	25.6	27.0 ± 1.2	29.8	27.9	25.4	27.7 ± 2.2	
Etage 4	12.7	13.7	12.9	13.1 ± 0.5	13.6	13.7	15.2	14.2 ± 0.9	16,1	16.0	12.8	15.0 ± 1.9	
Filtre	4.7	5.3	4.8	4.9 ± 0.4	4.4	4,4	5,8	4.9 ± 0.8	6.1	5.5	4.5	5.4 ±0.8	
FP (%)	46.1	47.5	46.9	46.8 ± 0.7	43.6	44.3	44.9	44.3 ± 0.7	50.0	47.6	45.1	47.6 ± 2.4	

En revanche, nous ne sommes pas parvenus à obtenir des résultats satisfaisants pour le Pulmicort[®]. L'étape de sphéronisation des particules de budésonide, fraîchement marquées, sous forme d'agglomérats lâches de forme sphérique a échoué. Par conséquent, nous avons décidé d'entreprendre l'étude pharmaco-scintigraphique sans marquer le produit de référence.

En résumé, le Tableau 26 reprend les valeurs de fractions pulmonaires obtenues durant l'étape de validation du procédé de marquage pour les 3 formulations.

FD (9/)		Formulations	
FF (70)	fMP3	fM2	Pulmicort [®]
PA non marqué	57,6 ± 2,9	46.8 ± 0.7	34,1 ± 2,5
PA marqué	55,2 ± 1,8	44,3 ± 0,7	****
Radio-isotope	59,3 ± 2,5	47,6 ± 2,4	****
Probabilité p	> 0,05 (NS)	> 0,05 (NS)	*****

Tableau 26 : Validation du procédé de marquage (n=3).

NS : différence non significative

4.3.2. Evaluation de la déposition in vivo

La Figure 92 illustre les images obtenues par scintigraphie gamma pour les six volontaires sains, répartis aléatoirement selon le protocole de l'étude en trois groupes de deux (sujets 1-6 / 2-5 / 3-4).

Nous remarquons que, de manière générale, la déposition pulmonaire est relativement homogène pour les deux types de formulations. Elle est néanmoins plus importante pour le mélange physique que pour la forme matricielle. Cette dernière se retrouve en plus grande quantité au niveau des voies aériennes supérieures et du tractus gastro-intestinal.



Figure 92 : Photos obtenues par gamma scintigraphie chez les six volontaires sains. L'image de gauche représente la déposition de la forme matricielle fM2, et l'image de droite la déposition du mélange physique fMP3.



Figure 92 (suite) : Photos des sujets 2 et 5.



Figure 92 (suite) : Photos des sujets 3 et 4.

La quantité de radioactivité moyenne déposée dans les différents organes, ainsi que celle retenue dans le dispositif d'inhalation et dans le masque facial sont reprises, pour chacune des formulations, dans le Tableau 27.

Zone de dénôt	Formu	Probabilité	
Zone de depor	fMP3	fM2	Р
Dispositif d'inhalation	$10,4 \pm 2,6$	12,1 ± 2,2	0,043
Oropharynx Air exhalé	$26,8 \pm 3,8$ $_{0,13 \pm 0,08}$	38,0 ± 3,1 0,11 ± 0,07	0,006 > 0,05 (NS)
Poumons	62,8 ± 4,9	49,9 ± 3,7	0,003

Tableau	27:	Déposition n	noyenne o	de	budésonide	dans	le	dispositif	ď	inhalation	et	dans	les
		différents tis	ssus chez	les	six volontai	res sa	ins	š.					

NS : différence non significative

Au vu de ces résultats, il apparaît que les dépositions pulmonaires des formulations lipidiques sont particulièrement élevées. Toutefois, les deux formes présentent des profils de déposition différents. Suite à l'inhalation du mélange physique, la fraction pulmonaire (62,8 % > 49,9 %) d'une part, et les fractions déposée dans la sphère oropharyngée (26,8 % < 38,0 %) et retenue dans l'Aeroliser[®] (10,4 % < 12,1 %) d'autre part, sont respectivement significativement supérieure (p < 0,05) et significativement inférieures (p < 0,05) à celles obtenues après l'administration de la matrice.

Il est à noter que la fraction piégée dans le masque facial est négligeable ; l'air exhalé par les sujets contenait moins de 0,2 % de budésonide. La retenue de la respiration, opérée pendant quelques secondes après l'inhalation, a probablement permis aux particules les plus petites de se déposer au niveau des voies aériennes inférieures.

En tant que produit de référence (benchmark product), le Pulmicort[®] Turbohaler[®] a été et continue à être largement étudié et évalué dans de nombreuses et diverses études cliniques. Il en ressort que l'administration de budésonide via ce dispositif d'inhalation conduit à une FP avoisinant les 30 %. A titre d'exemple, Borgström et all. [188] ont mesuré une déposition pulmonaire de 27,7 \pm 9,5 % chez 10 volontaires sains. Trois autres études scintigraphiques, portant cette fois-ci sur l'évaluation de la FP chez des asthmatiques « modérés », ont révélé une déposition de 25,1 \pm 6,1 % (12 patients [93]), de 26,1 \pm 10,5 % (8 patients [189] et de 29,8 \pm 6,9 % (12 patients [190]).

Nous pouvons ainsi établir sur base de l'étude scintigraphique et compte tenu des données relatées dans la littérature que les produits testés, fM2 et fMP3, permettent d'obtenir, respectivement, une déposition pulmonaire approximativement 1,5 et 2 fois supérieure à celle du Pulmicort[®] Turbohaler[®].

Par ailleurs, il est important de souligner, comme le montre la Figure 93, que les données « scintigraphiques » sont bien corrélées avec les résultats de déposition in vitro obtenus sur le MsLI.

Pour les formulations testées, l'impacteur liquide multi-étages s'est révélé être un excellent outil de prédiction de la déposition pulmonaire de poudre sèche pour inhalation chez le volontaire sain. C'est un avantage certain par rapport aux autres dispositifs d'inhalation, pour lesquels la dose en particules fines, déterminée in vitro, surestime souvent la quantité réelle de PA déposée dans les poumons. A titre d'exemple, une étude de corrélation in vitro/in vivo portant sur l'évaluation de la fraction pulmonaire du bromhydrate de fénotérol administré via un aérosol doseur et un nébuliseur a montré que la DPF était 1,7 à 2,3 supérieure à la valeur obtenue in vivo. La déposition pulmonaire du nébuliseur, qui était 1,5 fois supérieure à celle de l'aérosol doseur in vitro, était en réalité 2,2 fois plus importante sur base de l'examen scintigraphique [187].

Enfin, l'indice de pénétration pulmonaire a été calculé. La répartition régionale moyenne de la radioactivité, exprimée d'une part en pourcentage par rapport à la dose se déposant dans les poumons et d'autre part par rapport à la dose nominale, est reprise respectivement dans la Figure 94 et le Tableau 28.

De manière générale, nous remarquons que la déposition est homogène ; la budésonide est répartie de manière à peu près égale entre les zones pulmonaires centrale, intermédiaire et périphérique, et ce, pour les deux formulations. A la lecture attentive du Tableau 28, il apparaît que la différence de FP, observée entre le mélange physique et la matrice, se reflète de façon quasi-symétrique et statistiquement significative sur chacune des trois régions d'intérêt (RI). Les valeurs moyennes du rapport P/C sont significativement similaires (p > 0,05) ; elles sont, respectivement, de 1,2 et 1,1 pour fMP3 et fM2.



Figure 93 : Corrélation entre la fraction pulmonaire (FP) mesurée par déposition in vitro (MsLI, 100 L/min, 2,4 s, 3 gélules/test) et la fraction pulmonaire évaluée in vivo par scintigraphie gamma pour le Pulmicort[®] (données bibliographiques) et les formulations lipidiques.



Figure 94 : Répartition moyenne intrapulmonaire de la budésonide chez les six volontaires sains (pourcentage exprimé par rapport à la quantité de PA déposée dans les poumons).

Tableau 28 : Répartition moyenne de la budésonide dans les zones pulmonaires centrale, intermédiaire, et périphérique des six volontaires sains (pourcentage exprimé par rapport à la dose nominale).

Zone de dépôt	Form	Probabilité	
intrapulmonaire	fMP3	fM2	Р
Zone centrale	18,6 ± 2,6	15,6 ± 2,3	< 0,001
Zone intermédiaire	22,1 ± 2,4	$16,9 \pm 2,0$	< 0,001
Zone périphérique	22,0 ± 3,9	17,4 ± 2,6	< 0,001
Rapport P/C	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,3	> 0,05

En résumé, bien que le mélange physique se dépose en plus grandes quantités dans les poumons que la formulation matricielle, les deux formulations lipidiques présentent le même indice de pénétration pulmonaire.

Il est important de rappeler que l'indice de pénétration pulmonaire est fortement influencé par la façon dont sont dessinées les trois RI. Outre le « quadrillage 5 X 8 », d'autres techniques peuvent être utilisées. Parmi celles-ci, la méthode « onionskin contours », qui consiste à dessiner, en partant du hile vers la bordure externe du poumon, trois cercles concentriques dont les rayons représentent respectivement la moitié, les trois quart et toute la largeur du poumon [185]. Une autre méthode repose sur la division du poumon en trois parties égales [170] ou encore en deux parties, la région centrale occupant seulement un tiers de la surface totale du poumon [191]. Pour un même produit, cet indice est bien entendu d'autant plus grand que la surface délimitant la zone centrale est petite, et les rapports P/C ne peuvent donc être comparés d'une étude à l'autre que s'ils ont été déterminés à partir de la même méthode.

Par ailleurs, en cherchant à comparer les indices de pénétration calculés à celui de la forme de référence, obtenu lui aussi selon la méthode du « quadrillage 5 X 8 », nous nous sommes aperçus que bien qu'elle soit largement répandue, cette technique manque de précision. En effet, le rapport P/C, caractérisant la pénétration du Pulmicort[®] au sein du tissu pulmonaire, variait selon les études entre 0,64 et 1,31 [93, 189, 190]. C'est pourquoi, à l'image des développements qu'ont connus les impacteurs en vue de caractériser de manière de plus en plus précise la distribution granulométrique des particules [192] (impacteur en verre à deux étages => impacteur à cascade multi-étages de type Andersen => impacteur de nouvelle génération), l'équipe de Newman a proposé récemment d'harmoniser la méthode de quantification de ce rapport en s'appuyant sur un nouvel algorithme capable de diviser de façon automatisée la région pulmonaire en un plus grand nombre de zones concentriques comme cela est illustré dans la Figure 95 (6 zones reprenant la forme du poumon et dont la taille est réduite à chaque fois d'un facteur 1/6 en partant de la bordure externe de l'organe) [193].



Figure 95 : Délimitation des régions d'intérêt selon (a) le quadrillage 5 X 8, et (b) selon la nouvelle méthode proposée par Newman et al [79].

La déposition pulmonaire est dès lors quantifiée comme suit :

Pour chacune des régions, un facteur de pénétration (Fp) est calculé par le rapport entre l'activité mesurée et l'activité pulmonaire totale. Ensuite, le profil de pénétration pulmonaire (PP) est obtenu en corrélant les différents Fp en fonction des régions correspondantes. A titre d'exemple, la Figure 96 montre les PP d'un même produit, délivré via un IPS et un nébuliseur, pour lequel les rapports P/C, évalués préalablement par la technique conventionnelle 5 X 8, étaient respectivement de 0,7 et 2,1.

En analysant les indices de pénétration pulmonaire, nous aurions pu dire que l'IPS cible plutôt la zone centrale tandis que les particules inhalées via le nébuliseur se déposent majoritairement dans la zone alvéolaire. Par la nouvelle méthode d'évaluation, nous constatons que la différence est plus nuancée et les résultats plus parlants. Lorsque le produit est administré via l'IPS, la déposition est, en effet, plus importante dans la zone centrale. En revanche, la répartition intrapulmonaire apparaît plus homogène lors de l'inhalation par le nébuliseur.



Figure 96 : Profil de pénétration pulmonaire d'un principe actif donné délivré via un inhalateur à poudre sèche et via un nébuliseur [79].

4.3.3. Monitoring des fonctions respiratoires

Les données se rapportant aux paramètres fonctionnels respiratoires VEF₁ et CVit., mesurés par spirométrie avant l'inhalation et 30 minutes plus tard, des six volontaires sains sont reprises dans le Tableau 29. Le rapport de Tiffeneau est défini par le quotient du volume expiratoire forcé en 1 seconde par la capacité vitale. Il constitue l'indice usuel pour affirmer un trouble obstructif des bronches lorsqu'il est sensiblement inférieur à la moyenne prédite.

Sujet 1		For	mulat	ions	Su	jet 6	Formulations			
		IMP3 IMI		Pulms			fMP3	fM2	Puli	
PPV	Pré-inhalation	91 101	102	FEV	Pré-inhalation	103	101	- 99		
FEV ₁	Post-inhalation	103	95	109	LEA1	Post-inhalation	97	100	10	
C15/24	Pré-inhalation	90	88	90	CVIA	Pré-inhalation	82	81	9	
CVII.	Post-inhalation	91	92	89	Cvit.	Post-inhalation	80	80	10	
R. de	Pré-inhalation	89	96	97	R. de	Pré-inhalation	110	101	10	
Tiffeneau	Post-inhalation	100	90	97	Tiffeneau	Post-inhalation	112	112	11	

Tableau 29 : Principaux paramètres fonctionnels respiratoires des six volontaires durant les trois périodes de l'étude.

Sujet 2		Formulations			Sujet 5		Formulations		
		fMP3	fM2	Pulm*			fMP3	fM2	Pulm*
FEV ₁	Pré-inhalation	116	119	115	FEV ₁	Pré-inhalation	102	87	97
	Post-inhalation	116	118	107		Post-inhalation	97	99	102
CVit.	Pré-inhalation	103	96	99	CVit.	Pré-inhalation	89	83	86
	Post-inhalation	104	107	100		Post-inhalation	82	93	85
R. de Tiffeneau	Pré-inhalation	108	108	108	R. de Tiffeneau	Pré-inhalation	104	100	103
	Post-inhalation	108	108	105		Post-inhalation	103	100	102

Sujet 3		Formulations			Sujet 4		Formulations		
		fMP3	fM2	Puim*			fMP3	fM2	Pulm*
FEV ₁	Pré-inhalation	112	116	106	FEV ₁	Pré-inhalation	100	110	109
	Post-inhalation	112	108	116		Post-inhalation	101	110	112
CVit.	Pré-inhalation	98	101	92	CVit.	Pré-inhalation	97	96	96
	Post-inhalation	98	94	100		Post-inhalation	99	100	89
R. de Tiffeneau	Pré-inhalation	111	107	108	R. de Tiffeneau	Pré-inhalation	94	97	98
	Post-inhalation	109	108	108		Post-inhalation	94	97	98

* Pulmicort Turbohaler®

Les données sont exprimées en % de la valeur prédite [180].

Nous n'observons aucune diminution significative des valeurs de VEF1 et de CVit,

Le rapport de Tiffeneau, qui est supérieur à 75-80 % de la valeur prédite chez l'adulte en bonne santé, reste stable aussi bien après l'administration des mPLS, qu'après l'administration du produit de référence ne contenant pas d'excipients. Ceci dénote que l'inhalation des excipients lipidiques n'entraîne pas d'obstruction bronchique. De plus, aucune complication majeure n'a été reportée durant la durée de cette étude.

4.3.4. Détermination des paramètres pharmacocinétiques

La méthode analytique employée a permis de séparer et de doser quantitativement les deux épimères de budésonide. Nous avons choisi de présenter les données PK individuelles et moyennes relatives à l'épimère B (premier pic, qui représente 49,0 à 60,0 % de la somme des surfaces des pics des deux épimères [194]). Les données pharmacocinétiques (PK) se rapportant à l'épimère A sont reprises en annexe (annexes 3).

Comme le montre le tableau A3-5 (annexes 3), 10 prélèvements sur un total de 378, soit 2,6 % des prélèvements ont dû être écartés en utilisant la procédure « T » relatif aux valeurs extrêmes car ils présentaient des valeurs de concentration plasmatique en budésonide aberrantes.

La procédure « T » se base sur le calcul suivant [186] :

$$T_n = (X_n - X) / S$$
 (18)

Où : Xn représente la valeur extrême,

X, la valeur moyenne,

Et S, l'écart-type.

Lorsque la valeur calculée T_n est supérieure ou égale à la valeur renseignée dans la Table A3-6 (annexes 3), la valeur extrême est considérée comme aberrante (p < 0.05).

La Figure 97 et le Tableau 30 représentent les résultats de l'étude PK après avoir écarté les valeurs aberrantes.

A l'examen de la Figure 97, nous constatons que la budésonide atteint très rapidement la circulation systémique quelle que soit la forme inhalée. Après 10 minutes, les concentrations plasmatiques moyennes de l'épimère B de budésonide du mélange physique, de la matrice et du produit de référence sont de 1332 ± 743 pg/mL, 1123 ± 610 pg/mL et 688 ± 276 pg/mL, respectivement. Toutefois, le profil plasmatique de la matrice révèle un second pic, dix heures après l'inhalation, plus important que ceux du mélange physique et du Pulmicort[®]. Ce pic pourrait s'expliquer par une libération prolongée de la substance active. Ce qui conduit d'abord à penser que la matrice (ou du moins la fraction de la matrice se déposant au niveau des alvéoles), constituée d'éléments biodégradables et biocompatibles identiques à ceux entrant dans la composition du surfactant pulmonaire, aurait échappée en partie à la clairance alvéolaire (macrophages) et/ou aurait été capturée par les pneumocytes de type II en vue du recyclage du surfactant et sécrétée ultérieurement.

Malheureusement, ce pic est également présent après l'administration du Pulmicort[®]; il traduit probablement une erreur de manipulation et/ou d'analyse des échantillons sanguins. A défaut de recommencer cette étude, nous avons décidé de ne prendre en compte que les données relatives aux six premières heures de prélèvement, tout comme c'est généralement le cas dans les études PK « standards » relatées dans la littérature [93].

La Figure 98 représente les profils plasmatiques en budésonide pour les trois formulations durant les six premières heures de l'étude. Le Tableau 31 reprend les paramètres PK moyens déterminés chez les six volontaires. Un tableau plus détaillé est présenté en annexe (annexes 3).

Il faut souligner que les valeurs PK et l'allure de la courbe de la concentration plasmatique en épimère B de la budésonide pour le Pulmicort[®] Turbohaler[®] sont comparables aux résultats renseignés dans la littérature [93].



Figure 97 : Concentrations plasmatiques moyennes de l'épimère B de budésonide obtenues chez les six volontaires sains pour les trois formulations (sur 24h).
Tableau 30 : Paramètres PK individuels et moyens (budésonide - épimère B) mesurés pour les trois formulations sur les six volontaires (sur 24h).

Experiment	Pulmicort		n= 30		Study : BUDST0
Analyte	Epimer B				
			Data		
Galenic Formulati	on				
		Study subjects	AUC 24h	Cmax	Tmax
Turbuhaler		1	1989,34	767,20	0,50
a un cruntanen		2	12481,45	839,39	24,00
		3	1655,82	1090,27	0,33
		4	3906,38	742,04	0,16
		5	8955,34	1319,12	10,00
		6	5630,52	710,70	0,16
Mean turbuhaler			5769,81	911,45	5,86
Max turbuhaler			12481,45	1319,12	24,00
Min turbuhaler			1655,82	710,70	0,16
SD turbuhaler			4240,34	242,15	9,70
Experiment	Budesonide fMP3	3			
Analyte	Epimer B				
		_			
			Data		
Jalenic Formulati	on				
		Study subjects	AUC 24h	Cmax	Tmax
1 1 6 1		1	6827,56	2353.76	0.33
budesonide form1		2	6576.21	1697,70	0.33
		3	5463,59	2656,32	0,83
		4	4467.72	2119,30	0,33
		5	5270,71	1254,70	0,83
		6	4853,96	2216,68	0,16
Mean budesonide	form1		5576,62	2049,74	0,47
Max budesonide f	orm1		6827,56	2656,32	0,83
Min budesonide fo	orm1		4467,72	1254,70	0,16
SD budesonide for	rm1		940,46	499,82	0,29
Experiment	Budesonide fM2				
Analyte	Epimer B				
		_			
			Data		
Galenic Formulati	on				
		Study subjects	AUC 24h	Cmax	Tmax
budesonide form?		1	6581,33	2017,96	1,50
contentionale realities		2	16546,36	3790,87	10,00
		3	2753,95	1689,17	1,00
		4	10209,14	1486,20	0,33
		5	5615,27	846,67	2,50
		6	5341,15	2246,19	0,50
Mean budesonide	form2		7841,20	2012,84	2,64
Max budesonide f	orm2		16546,36	3790,87	10,00
Min budesonide fo	orm2		2753,95	846,67	0,33
SD budaronida for	rm?		4000.10	005.78	3.69



Figure 98 : Concentrations plasmatiques moyennes de l'épimère B de budésonide obtenues chez les six volontaires sains pour les trois formulations (sur 6h).

Tableau	31:	Paramètres	PK	moyens	(budésonide	•	épimère	B)	mesurés	pour	les	trois
		formulation	s che	ez les six	volontaires (s	ur	6h).					

		Probabilité		
-	fMP3	fM2	Pulmicort [®]	р
AUC (pg/mL.h)	4170 ± 400	2905 ± 730	1890 ± 275	< 0,001
C _{max} (pg/mL)	2050 ± 500	1640 ± 484	812 ± 139	< 0,001
T _{max} (h)	$0,47 \pm 0,29$	$1,00 \pm 0,88$	0,36 ± 0,27	> 0,05

Comparativement aux résultats de la forme de référence, nous remarquons que les valeurs des paramètres PK AUC et C_{max} des formulations lipidiques sont significativement plus élevées (p < 0,001). En revanche, la différence entre les temps requis pour atteindre la concentration plasmatique maximale (T_{max}) est non significative (p > 0,05).

Les concentrations plasmatiques maximales moyennes de l'épimère B de budésonide du mélange physique, de la matrice et du produit de référence sont, respectivement, de 2050 \pm 500 pg/mL, 1640 \pm 484 pg/mL et 812 \pm 139 pg/mL. Elles sont obtenues, respectivement, après 0,47 \pm 0,29 h, 1,00 \pm 0,88 h et 0,36 \pm 0,27 h.

Ces résultats ne sont donc pas assez concluants pour mettre en évidence l'effet « retard » escompté pour la forme matricielle. Néanmoins, l'approche pharmacocinétique permet de nous renseigner sur la biodisponibilité systémique de la budésonide pour ces trois produits. En effet, les particules atteignant les voies respiratoires périphériques sont rapidement résorbées à travers la barrière alvéolo-capillaire et se distribuent dans la circulation générale. Par conséquent, au plus la substance active se dépose profondément et en quantité importante dans le poumon, au plus sa concentration plasmatique est grande.

Les valeurs de l'aire sous la courbe de la concentration plasmatique en fonction du temps suivant l'administration des trois formulations sont respectivement de 4170 \pm 400 pg/mL.h, 2905 \pm 730 pg/mL.h et 1890 \pm 275 pg/mL.h. Les biodisponibilités relatives de fM2 et de fMP3, définies par le rapport en pour cent de l'AUC de la forme à caractériser sur l'AUC du produit de référence, sont respectivement de 154 % et 220 % (AUC_{fMP3} 4170 pg/mL.h > AUC_{fM2} 2905 pg/mL.h > AUC_{Pulmicort} 1890 pg/mL.h).

Ceci est en accord avec les résultats de l'étude portant sur l'évaluation in vitro de la dose en particules fines (FP_{fMP3} 57.6 % > FP_{fM2} 46.8 % > FP_{Pulmicort} 34.1 %), et ceux de l'étude scintigraphique de déposition pulmonaire, en tenant compte des données de déposition relatées dans la littérature pour le Pulmicort[®] Turbohaler[®] (FP_{fMP3} 62,8 % > FP_{fM2} 49,9 % > FP_{Pulmicort} \approx 30 %), [78, 188-190].

4.4. Conclusion

En conclusion, il ressort de cette étude in vivo, réalisée pour apprécier la déposition pulmonaire des mPLS, les résultats suivants :

 La méthode de marquage de l'étude scintigraphique a été validée pour les deux formulations lipidiques. Les profils de déposition in vitro des produits non marqués, marqués et du radioélément étaient similaires. Le procédé n'a donc pas modifié les caractéristiques granulométriques et aérodynamiques initiales et le ^{99m}Tc est considéré comme un marqueur fiable. Une bonne corrélation a pu être mise en évidence entre les données scintigraphiques et les résultats de déposition in vitro obtenus sur l'impacteur liquide multiétages. Les dépositions pulmonaires moyennes de budésonide de la matrice fM2 et du mélange physique fMP3 sont, respectivement, de 50 % et 63 %. Elles sont approximativement 1,5 et 2 fois supérieures à celle du Pulmicort[®].

 Le rapport P/C qualifiant l'indice de pénétration pulmonaire est proche de l pour les deux formulations lipidiques. Il témoigne donc d'une déposition/distribution homogène de la budésonide dans les poumons.

 L'inhalation des excipients lipidiques n'a pas entraîné d'obstruction bronchique. De plus, aucune complication majeure n'a été reportée durant la durée de cette étude.

Enfin, l'étude PK n'a certes pu mettre en évidence l'effet « retard » escompté pour la forme matricielle (différence non significative des T_{max}), mais a confirmé les résultats de déposition obtenus in vitro et par gamma scintigraphie. Ainsi, il a été clairement établi que l'administration des deux formulations lipidiques via l'Aeroliser[®] entraîne une résorption pulmonaire de budésonide 1,5 à 2,2 fois supérieure à celle du Pulmicort Turbohaler[®]. Cette étude devra toutefois être répétée sur un nombre plus élevé de patients et dans des conditions de travail plus rigoureuses afin de minimiser la variabilité des résultats obtenus.

CONCLUSION GENERALE

V. Conclusion générale

Au terme de ce travail, de nouveaux excipients ont été proposés pour la formulation de poudres sèches pour inhalation. Ils sont susceptibles d'agir en tant que transporteur dans le but d'améliorer le profil de déposition pulmonaire, ou bien en tant que diluant/agent de contrôle afin d'augmenter le temps de résidence de la substance active dans les voies respiratoires. Notre choix s'est porté sur l'utilisation d'excipients lipidiques constitués d'un mélange de cholestérol et de phospholipides présentant des caractéristiques appréciables pour la délivrance de substances médicamenteuses par la voie inhalée. Parmi leurs avantages potentiels, on peut citer une bonne tolérance au sein du tractus respiratoire, une efficience d'encapsulation relativement élevée, une meilleure stabilité que les autres systèmes encapsulés, ou encore une moindre tendance à l'agglomération.

Le procédé retenu pour la préparation des microparticules lipidiques solides (mPLS) est l'atomisation à température modérée (spray-drying). Il s'agit d'une technique très efficace et rapide de génération de microparticules, facilement transposable à l'échelle industrielle. Un de ses principaux avantages pour la préparation de poudres destinées à la voie pulmonaire est la possibilité de faire varier et de contrôler de manière rigoureuse les caractéristiques essentielles des particules pour ce genre d'administration que sont la taille et la distribution de taille, la densité, ainsi que les propriétés d'écoulement et l'aptitude à la désagglomération.

Dans un premier temps, il a fallu mettre au point les conditions opératoires de fabrication. La production de mPLS de taille adéquate, présentant un rendement convenable, nécessite un contrôle strict de la température de sortie de l'air de séchage. Pour ce faire, l'atomiseur fut muni d'un système d'arrivée d'air froid dans le bas de la chambre d'atomisation et d'un système de circulation d'eau froide autour du cyclone en vue d'abaisser la température de sortie, et de ce fait, de réduire le ramollissement et la fusion des corps gras utilisés.

Nous nous sommes alors intéressés à la formulation proprement dite. Deux types de formes ont été envisagés :

- Une forme à poudre sèche conventionnelle, au niveau de laquelle le PA est mélangé physiquement à l'excipient lipidique en vue d'améliorer les propriétés d'écoulement et de favoriser la redispersion de la poudre lors de l'inhalation.
- Une forme matricielle permettant également d'améliorer les propriétés d'écoulement et de dispersion, mais qui à la différence de la forme précédente ne nécessite pas d'étape de mélange. Elle consiste à incorporer le PA dans une matrice lipidique et, de ce fait, est susceptible de réguler sa cinétique de libération.

Ces formulations ont été évaluées du point de vue de leurs caractéristiques physiques et de leur performance d'aérosolisation. Le procédé de micronisation a permis d'obtenir des microparticules sphériques de structure homogène et de taille « respirable ». Elles se caractérisent par des densités relativement faibles et par de bonnes propriétés d'écoulement. L'évaluation des performances d'aérosolisation a révélé que les mPLS présentent un comportement aérodynamique remarquable ; les fractions pulmonaires sont significativement supérieures à celles des produits de référence (Pulmicort® Turbohaler® 200 µg et Flixotide® Diskus® 250 µg), ainsi qu'à celles d'autres formulations conventionnelles délivrées via le même dispositif d'inhalation (Aeroliser®). Toutefois, les deux formes présentent des profils de déposition différents. Les Fractions pulmonaires déterminées à partir des formulations matricielles sont semblables quel que soit le PA utilisé : la dilution/distribution du PA dans les lipides permet d'obtenir des particules « actives » se comportant de la même manière que les microparticules lipidiques, et ce indépendamment des propriétés physiques du PA incorporé. En revanche, la fraction pulmonaire des mélanges physiques est particulièrement conditionnée par l'intensité des forces d'adhésion entre les particules. Ceux-ci diffèrent selon différents facteurs tels que les propriétés physiques du PA utilisé, le rapport pondéral PA/transporteur ou encore le volume de remplissage de la gélule.

Par ailleurs, il ressort de l'étude de stabilité que les caractéristiques de taille et de redispersion des mPLS ne sont que faiblement influencées par l'humidité relative. Ils sont sensibles à une élévation marquée de la température mais conservent leurs caractéristiques initiales pour autant que les conditions de stockage ne dépassent pas les 30°C/65% HR. Une vigilance particulière doit cependant être portée aux formes matricielles, thermodynamiquement moins stables, car elles auront tendance à subir des modifications chimiques et physiques à long terme.

Nous avons ensuite étudié, dans le cadre de l'optimisation du processus de mélange de poudres à PA cohésif destinées à une inhalation par voie sèche, l'influence sur l'homogénéité du mode d'action et des caractéristiques de trois appareils fréquemment employés pour effectuer des mélanges solides pulvérulents : un mélangeur à cuve mobile de type Turbula[®], un mélangeur planétaire (Colette MP-20[®]) et un mélangeur-granulateur à haute vitesse (Mi-Pro[®]). Il a été démontré que l'obtention d'un mélange homogène, à partir d'une formulation contenant un principe actif cohésif et faiblement dosé et deux types de transporteurs dont l'excipient majoritaire est de taille grossière, implique l'usage de mélangeurs capables de provoquer, dans des conditions d'agitation modérées, des cisaillements importants qui favorisent une « circulation intense » de la poudre, ainsi qu'une destruction des agglomérats de particules cohésives (mélangeurs planétaire ou High-Shear). Par contre les mélanges physiques PA-excipients lipidiques dont les particules sont de taille comparable, peuvent s'effectuer de façon efficace dans un mélangeur à cuve mobile, présentant des forces de cisaillement modérées, sans pour autant subir un phénomène de ségrégation particulaire.

Nous avons terminé ce travail par l'évaluation de la déposition pulmonaire des mPLS in vivo. Un examen scintigraphique a permis d'évaluer la dose de PA, préalablement marquée par du technétium 99 métastable, atteignant le poumon, tandis que l'analyse pharmacocinétique a permis de quantifier la fraction de PA résorbée puis éliminée après inhalation. Il en ressort que les résultats de déposition pulmonaire sont en parfaite corrélation avec les valeurs de FP observées in vitro. L'approche pharmacocinétique n'a pas permis de mettre en évidence la régulation de la cinétique de libération du PA à partir des formes matricielles. Toutefois, en déterminant la biodisponibilité relative des mPLS par cette approche, nous avons, en quelque sorte, confirmé les résultats des expérimentations précédentes (tests sur impacteurs et examen scintigraphique).

En conclusion, cette étude a permis de développer de nouveaux excipients lipidiques, constitués de cholestérol et de phospholipides, à partir d'une méthode de fabrication simple et flexible. Les formulations à base de microparticules lipidiques, administrées via l'Aeroliser[®], présentent des fractions pulmonaires particulièrement élevées et reproductibles. Les mPLS s'avèrent dès lors être des excipients prometteurs pour la formulation de poudres sèches pour inhalation. Ils peuvent être appliqués à d'autres modèles de PA (expérimentations en cours sur des molécules hydrosolubles telle que la tobramycine) pour un usage local (traitement de la mucoviscidose, cancer du poumon, etc.) ou bien pour la recherche d'une action systémique (hormone parathyroïde, insuline, etc.). Ces mPLS devront, toutefois, faire l'objet d'études plus approfondies notamment en ce qui concerne leur tolérance in vivo (études toxicologiques longues et très coûteuses) et leur aptitude à moduler la cinétique de libération des principes actifs.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES

VI. Références bibliographiques

- [1] Weibel E.R., Morphometry of the human lung. Berlin, Springer-Verlag, 1963.
- [2] Horsfield K., Cummings G., Morphology of the bronchial tree in man, J. Appl. Physiol. 24 (1968) 373-391.
- [3] Yeh H., Schum G.M., Models of human lung airways and their application to inhaled particle deposition, Bull. Math. Biol. 42 (1980) 461-480.
- [4] Gehr P., Bachofen M., Weibel E.R., The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity, Resp. Physiol. 32(2) (1978) 121-140.
- [5] Adjei A.L., Ciu Y., Gupta P.K., Bioavailability and pharmacokinetics of inhaled drugs. In: Hickey A.J. (Ed), Inhalation aerosols, Physical and biological basis for therapy, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, pp 197-231.
- [6] Altiere R.J., Thompson D.C., Physiology and pharmacology of the airways. In: Hickey A.J. (Ed), Inhalation aerosols, Physical and biological basis for therapy, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, pp 85-137.
- [7] Courrier H.M., Butz N., Vandamme Th.F., Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects, Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. 19 (2002) 425-498.
- [8] Yu J., Chien Y.W., Pulmonary drug delivery: physiologic and mechanistic aspects, Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. 14 (1997) 395-453.
- [9] Qiu Y., Gupta P.K., Adjei A.L., Absorption and bioavailability of inhaled peptides and proteins. In: Adjei A.L., Gupta P.K. (Eds.), Inhalation delivery of therapeutic peptides and proteins, vol. 107, Marcel Dekker, New York, NY, 1997, pp 89-131.
- [10] Sturgess J.M., Ciliated cells of the lungs. In: Massaro D (Ed), Lung Cell Biology, Marcel Dekker, New York, NY, 1989, pp 115-151.
- [11] Phipps R.J., The airway mucocilliary system, Int. Rev. Physiol. 23 (1981) 213-260.
- [12] Haies D.M., Gil J., Weibel E.R., Morphometric study of rat lung cells. Numeric and dimensional characteristics of parenchymal cell populations, Am. Rev. Respir. Dis. 123 (1981) 533-541.
- [13] Notter R.H., Functional composition and component biophysics of endogenous lung surfactant. In: C. Lenfant (Ed.), Lung surfactants: Basic science and clinical applications, vol. 149, Marcel Dekker, New York, NY, 2000, pp 171-206.

- [14] Notter R.H., Discovery of endogenous lung surfactant and overview of its metabolism and actions. In: C. Lenfant (Ed.), Lung surfactants: Basic science and clinical applications, vol. 149, Marcel Dekker, New York, NY, 2000, pp 119-149.
- [15] Crapo J.D., Barry B.E., Gher P., Bachofen M., Weibel E.R., Cell number and cell characteristics of the normal human lung, Am. Rev. Respir. Dis. 125 (1982) 332-337.
- [16] Sibille Y., Reynolds H.Y., Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury, Am. Rev. Respir. Dis. 141 (1990) 471-501.
- [17] Martonen T., Yang Y., Deposition mechanics of pharmaceutical particles in human airways. In: Hickey A.J. (Ed), Inhalation aerosols, Physical and biological basis for therapy, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, pp 3-27.
- [18] Schulz H., Mechanisms and factors affecting intrapulmonary particle deposition: implications for efficient inhalation therapies, PSTT1. 8 (1998) 336-344.
- [19] Zanen P., Go L.T., Lammers J.W., The optimal particle size for parasympathicolytic aerosols in mild asthmatics, Int. J. Pharm. 114 (1995) 111-115.
- [20] Hiller F.C., Mazumder M.K., Wilson J.D., Bone R.C., Effect of low and high relative humidity on metered-dose bronchodilators solution and powder aerosols, J. Pharm. Sci. 69 (1980) 334-337.
- [21] Gebhart J., Anselm A., Ferron G.A., Heyder J., Stahlhofen W., Experimental data on total deposition of hygroscopic particles in the human respiratory tract. In: Masuda S., Takahashi K. (Eds), Aerosols, sciences, industry, health and environment, Pergamon Press, Oxford, UK, 1990, pp 1299-1302.
- [22] Anselm A., Heibel T., Gebhart J., Ferron G., "in vivo" studies of growth factors of sodium chloride particles in the human respiratory tract, J. Aerosol Sci. 22 (1991) (Suppl.) 427-430.
- [23] Pavia D., Thomson M.L., Clarke S.W., Shannon H.S., Effect of lung function and mode of inhalation on penetration of aerosol into the human lung, Thorax 32 (1977) 194-197.
- [24] Mussante C.J., Schroeter J.D., Rosati J.A., Crowder T.M., Hickey A.J., Martonen T.B., Factors affecting the deposition of inhaled porous drug particles, J. Pharm. Sci. 91 (2002) 1590-1600.
- [25] Lippmann M., Regional deposition of particles in the human respiratory tract. In Lee D.H.K., Falk H.L., Murphy S.D., Geiger R. (Eds.), Handbook of physiology, section 9, reactions to environmental agents, Bethesda, MD: American Physiological Society, 1977, pp 213-233.
- [26] Heyder J., Gebhart J., Scheuch G, Influence of human lung morphology on particle deposition, J. Aerosol Med. 1 (1988) 81-88.

- [27] Stahlhofen W., Rudolf G., James A.C., Intercomparison of experimental regional aerosol deposition data, J.Aerosol Med. 2 (1989) 285-308.
- [28] Hofmann W., Asgharian B., Winkler-Heil R., Modeling intersubject variability of particle deposition in human lungs, J. Aerosol Sci. 33 (2002) 219-235.
- [29] Kompella U.B., Lee V.H.L., Delivery systems for penetration enhancement of peptide and proteins drugs: design considerations, Adv. Drug Deliv. Rev. 46 (2001) 211-245.
- [30] Evora C., Soriano I., Rogers R.A., Shakesheff K.M., Hanes J., Langer R., Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine, J. Control Release. 51 (1998) 143-152.
- [31] Ng K., Stringer K.A., Cohen Z., Serravo R., Tian B., Meyer J.D., Falk R., Randolph T., Manning M.C., Thompson D.C., Alveolar macrophage cell line is not activated by exposure to polymeric microspheres, Int. J. Pharm. 170 (1998) 41-49.
- [32] Holma B., Lung clearance of mono- and di-disperse aerosols determined by profile scanning and whole-body counting. A study on normal and SO₂ exposed rabbits, Acta Med. Scand. 473 (1967) (Suppl.) 1-102.
- [33] Ma J.K.H., Bhat M., Rojanasakul Y., Drug metabolism and enzyme kinetics in the lungs. In: Hickey A.J. (Ed), Inhalation aerosols, Physical and biological basis for therapy, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, pp 155-195.
- [34] Effros R.M., Solute transport following aerosol deposition in the lungs. In: Hickey A.J. (Ed), Inhalation aerosols, Physical and biological basis for therapy, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, pp 139-154.
- [35] Dolovich M.B., Jordana M., Newhouse M.T., Methodologic considerations in mucociliary clearance and lung epithelial absorption measurements, Eur. J. Nucl. Med. 13 (1987) (Suppl) 45-52.
- [36] Gupta P.K., Adjei A.L., Therapeutic inhalation aerosols. In: Adjei A.L., Gupta P.K. (Eds.), Inhalation delivery of therapeutic peptides and proteins, vol. 107, Marcel Dekker, New York, NY, 1997, pp 185-234.
- [37] Patton J.S., Trinchero P., Platz R.M., Bioavailability of pulmonary delivered peptide and protein: interferon alpha, calcitonin and parathyroid hormones, J. Control Release. 28 (1994) 79-85.
- [38] Dalby R.N., Tiano S.L., Hickey A.J., Medical devices for the delivery of therapeutic aerosols to the lungs. In: Hickey A.J. (Ed), Inhalation aerosols, physical and biological basis for therapy, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, pp 441-473.

- [39] Ganderton, D., Targeted delivery of inhaled drugs: current challenges and Future Goals, J. Aerosol Med. 12 (1999) (Suppl.) S3-S8.
- [40] Grossman J., The evolution of inhaler technology, J. Asthma. 31(1994) 55-64.
- [41] Lalor C.B., Hickey A.J., Generation and characterisation of aerosols for drug delivery to the lungs. In: Adjei A.L., Gupta P.K. (Eds.), Inhalation delivery of therapeutic peptides and proteins, vol. 107, Marcel Dekker, New York, NY, 1997, pp 235-276.
- [42] Johnson C.E., Principles of nebulizer-delivered drug therapy for asthma, Am. J. Hosp. Pharm. 46 (1989) 1845-1855.
- [43] Clay M.M., Clarke S.W., Wastage of drug from nebulisers: a review, J. R. Soc. Med. 80 (1987) 38-39.
- [44] Taylor K.M.G., Taylor G., Kellaway I.W., Stevens J., The stability of liposomes to nebulization, Int. J. Pharm. 58 (1990) 57-61.
- [45] Masinde L.E., Hickey A.J., Aerosolized aqueous suspensions of poly(l-lactic acid) microspheres, Int. J. Pharm. 100 (1993) 123-131.
- [46] Thomas S.H., O'Doherty M.J., Fidler H.M., Page C.J., Treacher D.F., Nunan T.O., Pulmonary deposition of a nebulised aerosol during mechanical ventilation, Thorax. 48 (1993) 154-159.
- [47] O'Callaghan C., Barry P.W., The science of nebulised drug delivery, Thorax 52 (1997) (Suppl.) 31-44.
- [48] Smith I.J., Developments in inhalation technology, Drug Deliv. Syst. Sci. 2 (2002) 63-66.
- [49] Dalby R., Suman J., Inhalation therapy: technological milestones in asthma treatment, Adv. Drug Del. Rev. 55 (2003) 779-791.
- [50] Pauwels R., Newman S., Borgström L., Airway deposition and airway effects of antiasthma drugs delivered from metered-dose inhalers. Eur. Respir. J. 10 (1997) 2127-2138.
- [51] Bell J.H., Hartley P.S., Cox J.S.G., Dry powder aerosols I: A new powder inhalation device, J. Pharm. Sci. 60 (1971) 1559-1564.
- [52] Auty R.M., Brown K., Neale M.G., Snashall P.D., Respiratory tract deposition of sodium cromoglycate is highly dependent upon technique of inhalation using the Spinhaler, Br. J. Dis. Chest 81 (1987) 371-380.
- [53] Dunbar C., Dry powder formulations for inhalation, Drug Deliv. Syst. Sci. 2 (2002) 78-80.

- [54] Kawashima Y., Serigano T., Hino T., Yamamoto H., Takeuchi H., Effect of surface morphology of carrier lactose on dry powder inhalation property of pranlukast hydrate, Int. J. Pharm. 172 (1998) 179-188.
- [55] Larhrib H., Zeng X.M., Martin G.P., Marriot C., Pritchard J., The use of different grades of lactose as a carrier for aerosolised salbutamol sulphate, Int. J. Pharm. 191 (1999) 1-14.
- [56] Lucas P., Anderson K., Potter U.J., Staniforth J.N., Enhancement of small particle size dry powder aerosol formulations using an ultra low density additive, Pharm. Res. 16 (1999) 1643-1647.
- [57] Karhu M., Kuikka J., Kauppinen T., Bergström K., Vidgren M., Pulmonary deposition of lactose carriers used in inhalation powders, Int. J. Pharm. 196 (2000) 95-103.
- [58] Prime D., Atkins P.J., Slater A., Sumby B., Review of dry powder inhalers, Adv. Drug Del. Rev. 26 (1997) 51-58.
- [59] Staniforth J.N., Rees J.E., Lai F.K., Hersey J.A., Interparticle forces in binary and ternary ordered powder mixes, J. Pharm. Pharmacol. 34 (1982) 141-145.
- [60] Zeng X.M., Pandhal K.H., Martin G.P., The influence of lactose carrier on the content homogeneity and dispersibility of beclomethasone dipropionate from dry powder aerosols, Int. J. Pharm. 197 (2000) 41-52.
- [61] Clark A.R., Hollingworth A.M., The relationship between powder inhaler resistance and peak inspiratory conditions in healthy volunteers: implications for in vitro testing, J. Aerosol Med. 6 (1993) 99-110.
- [62] Ower E., Pankhurst R. C., The measurement of air flow, 5th ed., Pergamon Press, Great Britain, 1977.
- [63] Srichana T., Martin G.P., Marriott C., Dry powder inhalers: the influence of device resistance and powder formulation on drug and lactose deposition in vitro, Eur. J. Pharm. Sci. 7 (1998) 73-80.
- [64] Wetterlin K., Turbuhaler: a new powder inhaler for administration of drugs to the airways, Pharm. Res. 5 (1988) 506–508.
- [65] Timisina M.P., Martin G.P., Marriot C, Lee K.C., Suen K.O., Yanneskis M., Studies on the measurement of peak inspiratory flow rate (PIF) with dry powder inhaler devices in healthy volunteers, Thorax. 48 (1993) 433-438.
- [66] Particle size analysis Guidance on laser diffraction methods, International Organisation for standardization, 2004.
- [67] Laser diffraction particle size, Pharmeuropa. 14 (2002) 182-183.

- [68] Rawle A., The importance of particle size analysis in the pharmaceutical industry, Malvern Instruments Ltd. (1997) 11–18.
- [69] Pharmacopée Européenne 5^{eme} édition. Chap. 2.9.18. Préparation pour inhalation : évaluation aérodynamique des particules fines, 2005.
- [70] Hinds W.C., Aerosol Technology: Properties, behavior, and measurement of airborne particles, Wiley & Sons 2nd ed., New York, 1999.
- [71] Mitchell J.P., Nagel M.W., Particle Size Analysis of Aerosols from Medicinal Inhalers, KONA, 22 (2004) 32-64.
- [72] Issar M., Mobley C., Khan P., Hochhaus G., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs delivered to the lungs. In: Hickey A.J. (Ed), Pharmaceutical inhalation aerosol technology, second edition, revised and expanded, vol. 134, Marcel Dekker, New York, NY, 2004, pp 215-252.
- [73] Espenscheid W.F., Willis E., Matijevic E., Kerker M., Aerosol studies by light scattering. IV. Preparation and particle size distribution of aerosols consisting of concentric spheres, J. Colloid Sci. 20 (1965) 501-521.
- [74] Derendorf H., Hochhaus G., Rohatagi S., Mollmann H., Barth J., Sourgens H., Erdmann M., Pharmacokinetics of triamcinolone acetonide after intravenous, oral, and inhaled administration, J. Clin. Pharmacol. 35 (1995) 302-305.
- [75] Daley-Yates P.T., Price A.C., Sisson J.R., Pereira A., Dallow N., Beclomethasone dipropionate: absolute bioavailability, pharmacokinetics and metabolism following intravenous, oral, intranasal and inhaled administration in man, Br. J. Clin. Pharmacol. 51 (2001) 400-409.
- [76] Chege J.K., Chrystyn H., The relative bioavailability of salbutamol to the lung using urinary excretion following inhalation from a novel dry powder inhaler: the effect of inhalation rate and formulation, Respir. Med. 94 (2000) 51-56.
- [77] Borgstrom L., Nilsson M., A method for determination of the absolute pulmonary bioavailability of inhaled drugs: terbutaline, Pharm. Res. 7 (1990) 1068-1070.
- [78] Thorsson L., Edsbacker S., Conradson TB., Lung deposition of budesonide from Turbuhaler is twice that from a pressurized metered-dose inhaler P-MDI, Eur. Respir, J. 7 (1994) 1839-1844.
- [79] Newman S.P., Pitcairn G.R., Hirst P.H., Rankin L., Radionuclide imaging technologies and their use in evaluating asthma drug deposition in the lungs, Adv. Drug Deliv. Rev. 55 (2003) 851-867.
- [80] Perkins A.C., Nuclear Medicine: Science and Safety, John Libbey, London, 1995.
- [81] Casey D.L., Beihn R.M., Digenis G.A., Shabhu M.B., Method for monitoring hard gelatin capsule disintegration times in humans using external scintigraphy, J. Pharm. Sci. 65 (1976) 1412-1413.

- [82] Meseguer G., Gurny R., Buri P., In vivo evaluation of dosage forms: application of gamma scintigraphy to non-enteral routes of administration. J. Drug Target. 2 (1994) 269-88.
- [83] Davis S.S., Hardy J.G., Newman S.P., Wilding I.R., Gamma scintigraphy in the evaluation of pharmaceutical dosage forms, Eur. J. Nucl. Med. 19 (1992) 971-986.
- [84] Chan H.-K., Use of single photon emission computed tomography in aerosol studies, J. Aerosol Med. 6 (1993) 23-36.
- [85] Rhodes C.G., Hughes J.M.B., Pulmonary studies using positron emission tomography, Eur. Respir, J. 8 (1995) 1001-1017.
- [86] Jones T., New opportunities in molecular imaging using PET, Drug Inf. J. 31 (1997) 991-995.
- [87] Newman S.P., Wilding I.R., Imaging techniques for assessing drug delivery in man, PSTT. 2 (1999) 181-189.
- [88] Dolovich M., Ruffin R.E., Roberts R., Newhouse M.T., Optimal delivery of aerosols from metered dose inhalers, Chest 80 (1981) (Suppl.) 911-915.
- [89] Newman S.P., Weisz A.W.B., Talace N., Clarke S.W., Improvement of drug delivery with a breath-actuated pressurised aerosol for patients with poor inhaler technique, Thorax 46 (1991) 712-716.
- [90] Newman S.P., Newhouse M.T., Effect of add-on devices for aerosol drug delivery: deposition studies and clinical aspects. J. Aer. Med. 9 (1996) 55-70.
- [91] Newman S.P., Pitcairn G.R., Hirst P.H., Bacon R.E., O'Keefe E., Reiners M., Hermann R., Scintigraphic comparison of budesonide deposition from two dry powder inhalers, Eur. Respir. J. 16 (2000) 178-183.
- [92] Hirst P.H., Newman S.P., Clark D.A., Hertog M.G.L., Lung deposition of budesonide from the novel dry powder inhaler Airmax[™], Respir. Med. 96 (2002) 389-396.
- [93] Ball D.J., Hirst P.H., Newman S.P., Sonet B., Streel B., Vanderbist F., Deposition and pharmacokinetics of budesonide from the Miat Monodose inhaler, a simple dry powder device, Int. J. Pharm. 245 (2002) 123-132.
- [94] Pitcairn G.R., James J., Joyson A., Hirst P.H., Newman S.P., Technecoat: a novel method for radiolabelling dry powder formulations in radionuclide imaging studies. In: Dalby R.N., Byron P.R., Farr S.J., Peart J. (Eds), Respiratory Drug Delivery, vol. VIII, Davis Howood, Centennial, 2002, pp 553-556.
- [95] Ito H., Pitcairn P.H., Hirst S.P., Newman S.P., Frier M., Perkins A.C., An in vivo study to assess the suitability of Technegas as a SPECT imaging agent for pulmonary drug formulations. In: Dalby R.N., Byron P.R., Farr S.J., Peart J. (Eds),

Respiratory Drug Delivery, vol. VIII, Davis Howood, Centennial, 2002, pp 439-442.

- [96] Aiache J.M., Aperçu sur les aérosols médicamenteux de leurs origines à nos jours, Rev. Histoire de la Pharmacie. 26 (1979) 241-298.
- [97] Répertoire commenté des médicaments, Centre belge d'information pharmacothérapeutique, 18^{éme} édition, 2004.
- [98] Celli B.R., MacNee W., Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper, Eur. Respir. J. 23 (2004) 947– 953.
- [99] Nannini L., Cates C.J., Lasserson T.J., Poole P., Combined corticosteroid and Long acting beta-agonist in one inhaler for chronic obstructive pulmonary disease, Cochrane Database Syst. Rev. 3 (2004) CD003794.
- [100] Conway S.P., Evidence for using nebulised antibiotics in cystic fibrosis, Arch. Dis. Child. 80 (1999) 307-309.
- [101] Wei C.C., Pack L.L., Chan C.K., Effects of long-term aerosol pentamidine for Pneumocystis carinii prophylaxis on pulmonary function, Chest. 114 (1998) 742-747.
- [102] Smith S.J., Bernstein J.A., Therapeutic use of lung aerosols. In: Hickey A.J. (Ed), Inhalation aerosols, Physical and biological basis for therapy, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, pp 233-269.
- [103] Harris D., Robinson J.R., Drug delivery via the mucus membranes of the oral cavity, J. Pharm. Sci. 81 (1992) 1-10.
- [104] Wollmer P., Bäckström K., Zhao H., Nilsson P.G., Jonson B., Surface active agents as enhancers of alveolar absorption, Pharm. Res. 17 (2000) 38-41.
- [105] West J., Rodman D.M., Gene Therapy for Pulmonary Diseases, Chest. 119 (2001) 613-617.
- [106] Korpfáš J., Honda Y., Aspects of airway defence mechanisms, Pathophysiology. 3 (1196) 81-86.
- [107] Gupta P.K., Adjei A.L., Modulated-release aerosol. In: Adjei A.L., Gupta P.K. (Eds.), Inhalation delivery of therapeutic peptides and proteins, vol. 107, Marcel Dekker, New York, NY, 1997, pp 667-702.
- [108] Evora C., Soriano I., Rogers R.A., Shakesheff K.M., Hanes J., Langer R., Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine, J. Control. Release. 51 (1998) 143-152.

- [109] Müller R.H., Maassen S., Schwarz C., Mehnert W., Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes, J. Control. Release. 47 (1997) 261-269.
- [110] Edwards D.A., Hanes J., Caponetti G., Hrkach J., Ben-Jebria A., Eskew M.L., Mintzes J., Lotan N., Langer, R., Large porous biodegradeable particles for pulmonary drug delivery, Science. 276 (1997) 868-1871.
- [111] Edwards D.A., Ben-Jebria A., Langer R., Recent advances in pulmonary drug delivery using large porous inhaled particles, J. Appl. Physiol. 84 (1998). 379-385.
- [112] Meisner D., Liposomes as a pulmonary drug delivery system. In Rolland A. (Ed.), Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications, vol. 61, Marcel Dekker, New York, NY, 1993, pp 31-61.
- [113] Canonico A.E., Plitman J.D., Conary J.T., Meyrick B.O., Brigham K.L., No lung toxicity after repeated aerosol or intravenous delivery of plasmid-cationic liposome complexes, J. Appl. Physiol. 77 (1994) 415-419.
- [114] Waldrep J.C., Gilbert B.E., Knight C.M., Black M.B., Scherer P.W., Knight V., Eschenbacher W., Pulmonary delivery of beclomethasone liposome aerosol in volunteers. Tolerance and safety, Chest. 111 (1997) 316-23.
- [115] Hung O.R., Whynot S.C., Varvel J.R., Shafer S.L., Mezei M., Pharmacokinetics of inhaled liposome-encapsulated fentanyl, Anesthesiology. 83 (1995) 277-284.
- [116] Sharma A, Sharma U. S., Liposomes in drug delivery: progress and limitations, Int. J. Pharm. 154 (1997) 123-140.
- [117] Lo Y-L., Tsai J-C; Kuo J-H, Liposomes and disaccharides as carriers in spraydried powder formulations of superoxide dismutase, J. Control. Release. 94 (2004) 259-272.
- [118] Philip V.A., Mehta R.C., Mazumder M.K., DeLuca P.P., Effect of surface treatment on the respirable fractions of PLGA microspheres formulated for dry powder inhalers, Int. J. Pharm. 151 (1997) 165-174.
- [119] Williams R.O., Barron M.K., Alonso M.J., Remunan-Lopez C., Investigation of a pMDI system containing chitosan microspheres and P134a, Int. J. Pharm. 174 (1998) 209-222.
- [120] Armstrong D.J., Elliott P.N.C., Ford J.L., Gadson D., McCarthy G.P., Rostron C., Worsley M.D., Poly-(D,L-lactic acid) microspheres incorporating histological dyes for intra-pulmonary histopathological investigations, J. Pharm. Pharmacol. 48 (1996) 258–262.
- [121] Schwarz C., Mehnert W., Lucks J.S., Muller R.H., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. Production, characterization and sterilization, J. Control. Release. 130 (1994) 83-96.

- [122] Westesen K., Siekmann B., Koch M.H.J., Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction, Int. J. Pharm. 93 (1993) 189-199.
- [123] Szejtli J., Cyclodextrin technology. In: Davies J.E. (Ed.), Kluwer Academic Publishers (Dordrecht-Boston-London, 1988, pp 211-215.
- [124] Armspach D., Gattuso G., Königer R., Stoddart J.F., Cyclodextrins. In: Hecht S.M. (Ed.), Bioorganic chemistry: carbohydrates, Oxford University Press, New-York, 1999, pp 458-488.
- [125] Fukaya H., Iimura A., Hoshiko K., Fuyumuro T., Noji S., Nabeshima T., A cyclosporin A/maltosyl-alpha-cyclodextrin complex for inhalation therapy of asthma, Eur. Respir. J. 22 (2003) 213-219.
- [126] Marttin E., Verhoef J.C., Merkus F.W., Efficacy, safety and mechanism of cyclodextrins as absorption enhancers in nasal delivery of peptide and protein drugs, J. Drug Target. 6 (1998) 17-36.
- [127] Uchenna Agu R., Jorissen M., Willems T., Van den Mooter G., Kinget R., Verbeke N., Augustijns P., Safety assessment of selected cyclodextrins - effect on ciliary activity using a human cell suspension culture model exhibiting in vitro ciliogenesis, Int. J. Pharm. 193 (2000) 219-26.
- [128] Cabral Marques H.M., Hadgraft J., Studies of cyclodextrin inclusion complexes: the pulmonary absorption of β-, DM-β- and HP-β-cyclodextrin in rabbits, Int. J. Pharm. 77 (1991) 297–302.
- [129] Muller R.H., Mäder K., Gohla S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art, Eur. J. Pharm. Biopharm. 50 (2000) 161-177.
- [130] Johnson K.A., Preparation of peptide and protein powders for inhalation, Adv. Drug Deliv, Rev. 26 (1997) 3-15.
- [131] Adjei A.L., Gupta P.K., Dry powder inhalation aerosols. In: Adjei A.L., Gupta P.K. (Eds.), Inhalation delivery of therapeutic peptides and proteins, vol. 107, Marcel Dekker, New York, NY, 1997, pp 625-665.
- [132] Malcolmson R.J., Embleton J.K., Dry powder formulations for pulmonary delivery. Pharm. Sci. Technol. Today. 1 (1998) 394-398.
- [133] Fages J., Lochard H., Rodier E., Letourneau J-J., Sauceau M., La génération de solides divisés par fluides supercritiques, Can. J. Chem. Eng. 81 (2003) 161-175.
- [134] Sacchetti M., Van Oort M.M., Spray drying and supercritical fluid particle generation techniques. In: Hickey A.J. (Ed), Inhalation aerosols, Physical and biological basis for therapy, vol. 94, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, pp 337-384.

- [135] Broadhead J., Rouan S.K.E., Rhodes C.T. The spray drying of pharmaceuticals. Drug Dev. Ind. Pharm. 18, (1992) 1169-1206.
- [136] Masters, K., Spray Drying Handbook, 5th ed. Longman Scientific & Technical, New York, 1991, pp 309–351.
- [137] Vidgren M.T., Vidgren P.A., Paronen T.P., Comparison of the physical and inhalation properties of spray dried and mechanically micronised disodium cromoglycate, Int. J. Pharm. 35 (1987) 139-144.
- [138] Chawla A., Taylor K.M.G., Newton J.M., Johnson M.C.R., Production of spray dried salbutamol sulphate for use in dry powder aerosol formulation, Int. J. Pharm. 108 (1994) 233-240.
- [139] Carvajal M.T., Gasior P., Phillips E.M., Weinreib A., Tarantino R., Malick A.W., Spray-drying optimization to produce powder for inhalation, Pharm. Res. 11 (1994) S140.
- [140] Ikegami M., Jobe A., Yamada T., Priestly A., Ruffini L., Rider E., Seidner S., Surfactant metabolism in surfactant-treated preterm ventilated lambs, J. Appl. Physiol. 67 (1989) 429-437.
- [141] Tabor B., Ikegami M., Yamada T., Jobe A., Rapid clearance of surfactantassociated palmitic acid from the lungs of developing and adult animals, Pediatr. Res. 27 (1990) 268-73.
- [142] R.M. Schwartz, A.M. Luby, J.W. Scanlon, R.J. Kellogg, Effect of surfactant on morbidity, mortality, and resource use in newborn infants weighing 500 to 1500 g, N. Engl. J. Med. 330 (1994) 1476-80.
- [143] Parnham M. J., Wendel A., Phospholipids and liposomes safety for cosmetical and pharmaceutical use. Nattermann Phospholipid GmbH, Scientific Publication Nr.2. (1989).
- [144] Büchi Mini Spray Dryers, Büchi, Switzerland, hTc://www.buchi.com/Spray-Drying.69.0.html - consulté en octobre 2005.
- [145] Buchi B-190 spray-dryer, hTe://www.sprayresearch.com/capabilities/buchi_b190.htm - consulté en octobre 2005.
- [146] Kippax P., Issues in the appraisal of laser diffraction particle sizing techniques, Pharm. Technol. Eur. (2005) 32-39.
- [147] Particle size analysis by light diffraction, European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), European Pharmacopoeia Commission. (2004) E1-E7.
- [148] Guimbard J.P., Besson J., Beaufort S., Pittie J., Gachon M., Evaluation des solvents résiduels, S.T.P. Pharma Pratique 1 (1991) 272-277.

- [149] Understanding Karl Fischer titration, Metrohm, UK (2003) hTc://www.laboratorytalk.com/news/mea/mea246.html - consulté en octobre 2005.
- [150] Poynter W.G, Barrios R.J., Coulometric Karl Fischer titration simplifies water content, Oil & Gas J. 11 (1994) 53-54.
- [151] Mabrouk P.A., Castriotta K., Moisture analysis in lotion by Karl Fischer Coulometry, J. of Chemical Education. 78 (2001) 1385-1386.
- [152] Reh C., Bhat S.N., Berrut S., Determination of water content in powdered milk, Food Chemistry. 86 (2004) 457-464.
- [153] Maury M., Murphy K., Kumar S., Lee G., Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer, Eur. J. Pharm. Biopharm. 59 (2005) 565-573.
- [154] Pharmacopée Européenne 5^{eme} édition. Chap. 5.4 Solvants résiduels, limitations des taux de solvants résiduels dans les principes actifs, les excipients et les médicaments, 2005.
- [155] Maa Y-F., Costantino H., Nguyen P-A., Hsu C., The effect of operating and formulation variables on the morphology of spray dried protein particles, Pharm. Dev. Technol. 2 (1997) 213-223.
- [156] Pulvérisation d'échantillons pour MEB, Notice technique du SCD 030, Balzers Union Ltd, Liechtenstein.
- [157] Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition. Chap. 2.9.15. Volume apparent, 2005.
- [158] McNaughton J.L., Mortimer C.T., Differential scanning calorimetry. In: IRS, Physical Chemistry Series 2, vol. 10, Butterworths, London, 1975, pp 1-44.
- [159] Ford J.L., Timmins P., Pharmaceutical thermal analysis, Techniques and applications, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1989, pp 180-200.
- [160] Clas S.D., Dalton C.R., Hancock B.C., Differential scanning calorimetry: applications in drug development, Pharm. Sci. Technol. Today. 2 (1999) 311-320.
- [161] Suryanarayanan R., Rastogi S., X-ray powder Diffractometry, Encyclopaedia of pharmaceutical technology, 2nd edition, vol.3, Marcel Dekker, New York, 2002.
- [162] Rouessac F., Rouessac A., Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6^{ème} édition, Dunod, 2004, pp 223-241.
- [163] Pharmacopée Européenne 5^{eme} édition. Préparation pour inhalation : Inhalanda, 2005.
- [164] ICH Q1A (R2), Stability testing guidelines: Stability testing of new drug substances and products, CPMP/ICH/2736/99, EMEA (2003) 1-21.

- [165] Note for guidance on dry powder inhalers, CPMP/QWP/158/96, EMEA (1998) p 1-7.
- [166] Desai T.R., Hancock R.E.W., Finlay W.H., Delivery of liposomes in dry powder form: aerodynamic dispersion properties, Eur. J. Pharm. Sci. 20 (2003) 459-467.
- [167] Lee Y.S.L., Poynter R., Podczeck F., Newton J.M., Development of a dual approach to assess powder flow from avalanching behaviour, AAPS Pharm. Sci.Tech. 1 (2000) 21.
- [168] Chan H.-K., Chew N.Y.K., Novel alternative methods for the delivery of drugs for the treatment of asthma, Adv. Drug Deliver. Rev. 55 (2003) 793-805.
- [169] Naini V., Byron P.R., Phillips E.M., Physicochemical stability of crystalline sugars and their spray-dried forms: dependence upon relative humidity and suitability for use in powder inhalers, Drug Dev. Ind. Pharm. 24 (1998) 895-909.
- [170] Vanderbist F., Developpement, optimisation et évaluation d'une formulation de Nacystelyn, un nouvel agent mucoactif, sous forme de poudre pour inhalation, Thèse de Doctorat, Université Libre de Bruxelles, 2000.
- [171] Cartilier L., Contribution à l'étude du mélange des poudres à principe actif cohésif et faiblement dosé, Thèse de Doctorat, Université Libre de Bruxelles, 1987.
- [172] Carstensen J.T., Powders uniformity and blending. In: Pharmaceutics of solids and solid dosage forms, Wiley & Sons, New York, 1977, pp 114-115.
- [173] Train D., Mixing of pharmaceutical solids: the general approach, J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed. 49 (1960) 265-271.
- [174] Sinay Y., Tawashi R., Etude modèle de mélanges solides-solides; facteurs dynamiques et géométriques, Pharm. Acta Helv. 47 (1972) 265-272.
- [175] Lantz R.J., Schwartz J.B., Mixing. In: Lieberman A., Lachman L. (Eds.), Pharmaceutical dosage forms: Tablets, vol 2, Marcel Dekker, New York, NY, 1981, pp 1-53.
- [176] Holm P., High Shear Mixer Granulators. In: Handbook of pharmaceutical granulation technology. Drugs and the pharmaceutical sciences, vol. 81, Marcel Dekker, New York, NY, 1997, pp 151-225.
- [177] Fan L.T., Chen S.J., Watson C.A., Solids mixing, Ind. Eng. Chem. 62 (1970) 53-69.
- [178] Bondesson E., Bengtsson Th., Borgstöm L., Nilsson L.-E., Norrgren K., Trofast E., Wollmer P., Plannar gama scntigraphy - points to consider when quantifying pulmonary dry powder aerosol deposition, Int. J. Pharm. 258 (2003) 227-240.

- [179] Pedersen S., Steffensen G., Ohlsson S.V., The influence of orally deposited budesonide on the systemic availability of budesonide after inhalation from a Turbuhaler, Br. J. Clin. Pharmacol. 36 (1993) 211-214.
- [180] Quanjer P.H., Standardised lung function testing, Bull. Eur. Physiopathol. Respir, 19 (1983) 1-95.
- [181] Pitcairn G.R., Newman S.P., Tissue attenuation corrections in gamma scintigraphy, J. Aerosol Med. 3 (1997) 187-198.
- [182] Newman S.P., Morén F., Trofast E., Talaee v, Clarke S.W., Deposition and clinical efficacy of terbutaline sulphate from Turbuhaler, a new multi-dose powder inhaler, Eur. Respir. J. 2 (1989) 247-252.
- [183] Newman S.P., Hirst P.H., Pitcairn G.R., Clark A.R., Understanding regional lung deposition data in gamma scintigraphy. In: Dalby R.N., Byron P.R., Farr S.J. (Eds), Respiratory Drug Delivery VI, Buffalo Grove: Interpharm Press, 1998, pp 9-15.
- [184] Newman S.P., Pitcairn G.R., Hirst P.H., A brief history of gamma scintigraphy, J. Aerosol Med. 14 (2001) 139-145.
- [185] Dolovich M.B., Practical aspects of imaging techniques employed to study aerosol deposition and clearance. In: Hickey A.J. (Ed), Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology, second edition, revised and expanded, vol. 134, Marcel Dekker, New York, NY, 2004, pp 171-213.
- [186] Bolton S., Transformations and outliers. In: Swarbrick J. (Ed), Pharmaceutical statistics, Practical and clinical applications, vol. 80, Marcel Dekker, New York, NY, 1997, pp 355-383.
- [187] Newman S.P., Wilding I.R., Gamma scintigraphy: an in vivo technique for assessing the equivalence of inhaled products, Int. J. Pharm. 170 (1998) 1-9.
- [188] Borgstrom L., Bondesson E., Moren F., Trofast E., Newman S.P., Lung deposition of budesonide inhaled via Turbuhaler: a comparison with terbutaline sulphate in normal subjects, Eur. Respir. J. 7 (1994) 69-73.
- [189] Thorsson L., Kenyon C., Newman S.P., Borgström L., Lung deposition of budesonide in asthmatics: a comparison of different formulations, Int. J. Pharm. 168 (1998)119-127.
- [190] Hirst R.H., Newman S.P., Clark D.A., Hertog M.G., Lung deposition of budesonide from the novel dry powder inhaler Airmax, Respir. Med. 96 (2002) 389-96.
- [191] O'Doherty M.J., Thomas S.H.L., Gibb D., Lung deposition of nebulized pentamidine in children, Thorax. 48 (1993) 220-226.

- [192] Hallworth G.W., Particle size analysis of therapeutic aerosols. In: Morén F., Dolovich M.B., Newhouse M.T., Newman S.P. (Eds), Aerosols in medicine: Principles, diagnosis and therapy, Elsevier, Amsterdam, 1993, pp 351-374.
- [193] Pitcairn G.R., Joyson A., Hirst P.H., Prior D.V., Newman S.P., Lung penetration profiles: a new method for analysing regional lung deposition data in scintigraphic studies. In: Dalby R.N., Byron P.R. Farr S.J., Peart J. (Eds), Respiratory drug delivery, vol. VIII, Davis Howood, Centennial, 2002, pp 549-552.
- [194] Pharmacopée Européenne 5^{eme} édition. Monographie de la budésonide, 2005.

ANNEXES

/II. Annexes

1. Certificats d'analyse

1.1. Cholestérol

Spécification

Malenwerf 13, Utigeest P.O. Box 120, 1910 AC Uitgeest Holland	Telephone Telefax E-mail	+31 (0)2513-19110 +31 (0)2513-15960 sales@bußun	b	BUFA B.V.
Article:	Chol	lesterolum pulv.		
Analysé selon:	Ph.Eu	r. 2002-4.2		
	Exige	nce	Unité	Remarque standard
CARACTERES				
Aspect	Poudr (sensi	e cristalline, blement) blanche		
IDENTIFICATION				
A	147 -	150	°C	Point de fusion
B	Confo	rme		CCM
с	Rose /	vert		
ESSAI				
Solubilité dans l'alcool	Limpi	de		1%m/V dans l'alcool
Acidité	Confo	rme		
Perte à la dessiccation	<=0.3		96	4 h 60°C sous vide
Cendres sulfuriques	<=0.1		96	
DOSAGE				
Cholest-5-éne-3B-ol	>=95.	0	96m/m	Desséché
Stérols totaux	97.0 -	103.0	%m/m	Desséché
MICROBIOLOGIE				
Nombre de germés aérobies viables totaux	<=100	00	/ g	
Microorganismes spécifiés				
E, coli	Négat	if/g		
Ps. aeruginosa	Négat	if / g		
S. aureus	Négat	if / g		
Salmonelles	Négat	if/g		

1.2. Phospholipon 90H

RHONE-POULENC RORER Köln / Cologne, Germany Guality Control

Issued: 26.10.99

ANALYSEN - ZERTIFIKAT

Certificate	of Analysis	Nr.:	13294
		[2	80068)
Charge	n-Nr./ Batch-No.:		
90080			

368110 Phospholipon 90 H

Material / Product:

Monographie / Monograph: 18.232052 Manufacture : 25.09.99

Ergebnis/ Result Beschreibung Characteristics conforms IR-Spektrum conforms IR spectrum Fettsaeurezusammensetzung Fatty Acid Composition conforms Jodzahl Iodine value 0,6 Wassergehalt (K. Fischer) 0,4 \$ Water content (K. Fischer) PC (HPLC, Zinsser) 95,6 \$ Phosphatidyl cholin LPC (HPLC, Zinsser) 1,6 \$ Lysophosphatidyl choline Oelgehalt Content (Neutral oils, sterol) 0.9 \$ Schwermetalle Heavy metals (10 ppm Loeslichkeit Solubility conforms Pd/C-Verunreinigungen Pd/C-Inpurities conforms Restloesemittel residual solvent 0.002% Reinheit Purity conforms Mikrobielle Verunreinigung Microbiological Contamination conforms

1.3. Budésonide



CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT: BUDESONIDE MICRON	IZED Ph Eur	MANUFACTURE DATE: October 2002		
BATCH : 020463		EXPIRATION DATE : October 2007		
TESTS	SPECIFICAT	rions	RESULTS	
DESCRIPTION	White or almost crystalline pow practically ins water, freely s methylene chlor sparingly solub alcohol.	white der, oluble in oluble in ide, le in	conforms	
IDENTIFICATION	Positive (IR)		positive	
LOSS ON DRYING	Not more than 0	.5%	0,14%	
SULPHATED ASH	Not more than 0	,18	< 0,1%	
EPIMER A	40,0 - 51,0%		42,6%	
RELATED SUBSTANCES Hydroxyprednisolone 22-Methylhomologue D-Homobudesonide Desonide 21-Dehydro 14,15-Dehydro Any unspecified impurity Total impurities RESIDUAL SOLVENTS Methanol Ethyl ether Methylene chloride 1,4-Dioxane	Not more than 0 Not more than 1 Not more than 1 Not more than 4 Not more than 1 Not more than 1 Not more than 1	.5% .2% .2% .2% .2% .1% .5% 00 ppm 00 ppm 00 ppm 00 ppm	< 0,05% < 0,05% < 0,05% < 0,05% < 0,05% < 0,05% < 0,1% < 0,05% < 50 ppm < 5 ppm conforms conforms	
ASSAY	98,0 -102,0% on basis	the dried	100,1%	
PARTICLE SIZE	Min 99% < 5 µ Min 90% < 2,8	m µm	conforms conforms	
BULK DENSITY TAPPED	0,15 - 0,35 Kg/	L	0,18	

HANDLING PROCEDURES - <u>Warning</u>! Keep the container well closed and avoid direct sunlight exposure. Avoid temperature over 40°C.

Saronno

Quality control manager

no

15/M/02

1.4. Propionate de Fluticasone

FOR AUTHORSED USE ONLY



Custumer ID : VIVATIS LTD, GERMANY Order No : Market Dept#2261

Piot No. 25, Phase IV, G.J.D.C., Panoli - 394116, Dist. Bharuch, Gujarat. Tel.: (02646) 272363/272534 Fax: (02646) 272541

CERTIFICATE OF ANALYSIS

ATC	H No. 1 DF50091	A.R. No. + AF50045	
IFG.	DT. : APRIL 2005	RELEASE DATE : 10.05.05	
XP. I	DT. : MARCH 1007	PAGE : 81 of 81	
r.No	TEST	SPECIFICATION	RESULT
01	Anneathac	While or almost while sounder	White setwider
-	Subhiling	Practically isoclable in water, sparingly subable in	Complex
	Somethy	metholene chioride, tlightly soluble in alcohol	e angene
62	himtifaction.	antiquine provider, sugardy service of previous	
**	at IF	1.8 absorption spectrum of the semale is mineral all	Camplies
	at 100	dissertion should be concredut with similarly	
		controlled spectrum of Fluticourse Promissions working	
		streedard	
		The priminal rank is the chromatourum obtained with	
	hatters of	the test preparation should similar in relevation time to	Complies.
	FIT THE FOR	principal peak obtained with the standard preparation	
		in the test assay by HPLC.	
60	Related substances Adothed 1 has	HPLC	
	it Kineten immerity	1	
	at Internetity A	Most more than 0.2%	0.06476
	his formacity B	Not more than 0.2%	Nice detected
	at Method exter insparity	Not more than 0.2%	0.12%
	d) Impurity C	Not more than 0.2%	0.02%
	ci Immurity (2	Net ment than 0.2%	0.12%
	0 Instantity F	Net more than 0.2%	Not detected
	g) Chloro-imparity	Not more than 0.2%	0.15%
	th) Importing 11	Next unone than 0.2%	0.002%
	 Unknown expanity 		
- 1	a) Highest wiknown imparity	Not more than 0.1%	0.05%
	(ii) Total intentities	Next more than 1.0 %	0.47%
	(known + unknown)		
	Related substances. Method II : In T	uc'	
	Thisic acid impurity	Not more than 0.2%	Complies
64	Water energy (by KF)	New many: thus 0.5 %code	0.2% out w
115	Specific optical rotation	+12* m + 3e*	+ 34.47*
~	it' = 0.5% w/v ashitian in	tartivelrous and solvent flog substances)	
	dichlanemethane as 20°C)	territoria and territoria	
Di	Assay the HPLC's	-98 (0° - 164) (52 (0° - ant) (-	WHITE WAT
	the state of the s	tastedrous and advent free substances)	
62	Particle size	01% Particles below 7 cm	96.9495
	Turber sar	09% Particles below 10 am	11825
	Volubered ask	Not more than 6.1.% w/w	0.07%www.
10	Heavy metals	Not many than 10 mm	Loss than 10 perce
in	Residual nationis (by (27)	Constant of the second s	and the second sec
-	at Methodal	Net more than 3000 ppm	Not detected
	ii) Acctone	Net more than 5000 ppm	Not detexted
	iii) Dicklomerethanc	Net more than ditti punt	633 gpm
	ivi Fetrahydrofuran	Not moto that T20 ppm	Not detected
	v) Tohaene	Must more than 390 pena	Nest detected
	with N. Ndispatibul accitamide	Net more than 1990 porn	Nai driegted

REMARKS: The product is satisfactory to the prescribed standards of quality the above mentioned tests as per BP & In-House specification.

Note: DATA REPRODUCED FROM ORIGINAL COA.

DATE OF ISSUE OF COA. : 16.07.05 PREPARED BY VERIFIED BY : A handed over by DATE: 16:07:05 DATE: 16.07 05 VIVATIS PHARMA

Gabhl Mäldenskeven 66 s : D-22087 Hamburg Tel.: +45-(0)40-236 90 90 : Pax: +49-(0)40-236 90 936

2. Principaux documents relatifs à l'étude clinique

11-	FPS of	Public Health, Food Chain Security Directorate-General for Medi	and Environment cinal Products
11		Av	Amazone Bischoffsheim 33
Research and D	evelopment		1000 010000000
Your letter: Your reference:		Prof.K.Amighi	
Our reference: DG3/R&D/AL Date:	NIOHIOS	ULB Institut de Pharmacie Campus Plaine Accès Boulevard du Triompi CP 207 1050 Bruxelles	2 he
Enclosure(s):		1050 Bruxelles	
Phone: Fax :	32 (0)2/210.94.28 32 (0)2/227.55.91		
Subject:	PHARMACOSCINTIGR THE BIOAVAILABILITY DOSE OF THREE DPI SUBJECTS : Pulmicor SINGLE DOSE, 3WAY,	APHIC EVALUATION AND COMPAR Y OF INHALED BUDESONIDE AFTER FORMULATIONS OF BUDESONIDE I t turbuhaler / Budesonide form1/Bud CROSS-OVER STUDY	ATIVE STUDY OF SINGLE ORAL N HEALTHY Issonide form2
Concerning EudraCT no:	Authorisation of clin 2004-004658-14	ical trial	
Dear Sir,			
Conform an person, I ha clinical trial r	ticle 14 of the Law of 7 we decided to authorize the mentioned below.	May 2004 concerning experiments e chemical-pharmaceutical part of th	s on the human he request of the
PHARMACO BIOAVAILAB FORMULATI form1/Budes	SCINTIGRAPHIC EVALUAT ILITY OF INHALED BUDESO ONS OF BUDESONIDE IN H Inde form2 SINGLE DOSE	ION AND COMPARATIVE STUDY OF DNIDE AFTER SINGLE ORAL DOSE (IEALTHY SUBJECTS : Pulmicort turbu SWAY, CROSS-OVER STUDY	THE DF THREE DPI haler / Budesonide
2004-00465	8-14		
Yours sincer	eiy.		
The Minister and Public H	of Social Affairs ealth		
5	ar,		
Rudy DEMO	TTE		
Contactporton: L-coal: Tel.: Jun:	Annie Lamaers Annie Jamaers (Bhealds, Spor, Jie 02/200 P4 34 02/227 35 34	.be	sownet denile Amazone - Av. Siecheffsleig 33 1970 Bresode http://www.afigs.fgrv.be

------UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES HOPITAL ERASME



ACUTE OF LENKIK 808 - 8-1070 BRUKELLER

Brussel, the 10 December 2004

COMITE D'ETHIQUE Agréation: N°OMOZ

> Dr. Alain MICHILS Department of Pneumology

Secrétariat: 191: 32.2.585.37.07 Fax: 32.2.585.46.37 E-mail: colesen@ut ari. 54

Dear Dr. MICHILS.

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. HERCHLIELZ & Mr. G. NISET Ethics Committee Erasme Hospital 808, route de Lennik B-1070 Bruissels, Belgium Nº of agreation by "Ordre des Médecins" : OM021

During the meeting held on 07/12/2004 (dd/mm/yyyy), the Ethics Committee gave its sgreement on the following documents:

- Protocol (Our Ref.: P2004/202) entitled: "Pharmacosciviligniphic evaluation and comparative study of the biceverilebitity of inheled Budesonide after single oral dose of three DPI formulations of Budesonide in healthy subjects: Pulmicot turbuhalerth /Budesonide form 1/Budesonide form 2: Single dose, 3 way, cross-over study: "Your Ref.: Version BU-ST02 Final version dated October 2004)
- > French Patient Information Sheet: Version dated December 2004 and French Informed Consent.
- Form: Version undefined Dutch Patient Information Sheet: Version undefined and Dutch Informed Consent Form: Version > undefined
- Investigator's Curriculum Vitae ъ
- > Request for autorisation of a clinical blal on a medicinal product for human use to the competent
- authorities and for opinion of the ethics committees in the community > Ethics Committees Application form

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 sill participants to the assay, that annual trial status and end trial results will be transmitted to the Comr nittee.

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

> Mr. G. NISET Secretary

e-mail : ethique.hopitalerasme@ulb.ac.be

Internet : http://hopitalerasme.org/ethioue.htm

Pr. A. HERCHUELZ

Chairman



.

STERACT HER REPORTED AND ANY INVESTIGATION OF

3

UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES HOPITAL ERASME

ROUTE DE LENNIK 608 - 8-1070 BRUXELLES

OOMITE D'ETHIQUE Agréation: N°OM021

List of Members present at the meeting of 07/12/2004

Secrétariat: Tél.: 32.2.555.37.07 Fac: 32.2.555.46.20 E-mail: cpieser/@utb.ac.be

Président : Pr. A. Herchuelz

Vice-Président : Pr. F. Lotstra

Secrétaire : Dr. G. Niset

Membres : Dr. E. Dupont Mr. Y. Dusart Mr. P. Fischbach Me. P.A. Foriers Pr. S. Goldman Dr. A. Kentos Dr. M. Lipszyc Dr. H. Louis Mr. M. Mayer Dr. M. Remmelink Dr. J. Rouby Pr. André HERCHUELZ, Chairman, Professor, Head of Department, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine - U.L.B., Madical Doctor, Male

Dr. Georges NISET, Secretary, Chief in the Department of Physiotherapy, Erasme Hospital, Physiotherapist, Male

Dr. Etienne DUPONT, Member, Associate Professor, Department of Immunology, Erasme Hospital, Medical Doctor, Male

Mr Yves DUSART, Member, Assistant Nursing Director, Department of Radiology, Erasme Hospital, Male nurse, Male

Mr Piet FISCHBACH, Member, Harvey Cushing Center, Psychologist, Male

Pr. Serge GOLDMAN, Member, Head of Department, Department of Nuclear Medicine & PET/Biomedical Cyclotron Unit, Erasme Hospital, Medical Doctor, Male

Dr. Alain KENTOS, Member, Assistant Professor, Clinic of Haematology, Erasme Hospital, Medical Doctor, Male

Dr. Maurice LIPSZYC, Member; Assistant Professor, Department of Anesthesiology-Reanimation, Erasme Hospital, Medical Doctor, Male

Dr. Hubert LOUIS, Member, Assistant Professor, Department of Medical Gastroenterology, Erasme Hospital, Medical Doctor, Male

Mr Marc MAYER, Lay member, Moral Counsel, Erasme Hospital, Lay adviser, Male

Dr. Myriam REMMELINK, Member, Assistant Professor, Department of Pathology, Erasme Hospital, Medical Doctor, Female

Edited the 10 December 2004



UTILB



Réf. Dossier 2004-2

ATTESTATION D'ASSURANCE

Ethias Droit Commun, Association d'assurances mutuelles, rue des Croisiers n° 24 à Liège, certifie que par la police n° 45.127.563 souscrite par l'ULB avenue Franklin Roosevelt, 50 à 1050 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 K. 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 :

» Phamacoscintigraphic evaluation and comparative study of the biovailability of inhaled budesonide after single oral dose of three DPI formulations of budesonide in healthy subjects : pulmicort turbuhaler® / budesonide form1/budesonide form2 single dose, 3 way, cross-over study » :

Nombre de patients : 6 volontaires sains; Durée : étude répartie en 3 périodes sur une durée globale de 17 jours ; Site de l'étude : Hôpital Erasme (Pneumologie).

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'assai.

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 1^{er} décembre 2004

Pour le directeur général,

Daniel PIROTT Chef de service

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 52rd WMA General Assembly, Edinburgh, Soutland, October 2000

A. INTRODUCTION

- 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.
- 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."
- Medical progress is based on research which ultimately must rest in part on experimentation involving human subjects.
- 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

2

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

17.C

- 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

- 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.
- 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, 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 leasily authorized surrouzate.
- 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 patientphysician relationship.

5

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 096.14

FICHE SIGNALETIQUE

Titre	Pharmacoscintigraph bioavailability of inhale DPI formulations of I Turbuhaler [®] / Bu Single d	ic evaluation and comparative study of the d budesonide after single oral dose of three budesonide in healthy subjects: Pulmicort desonide form 1/ Budesonide form 2. ose, 3 way, cross-over study.
Identification	Réf. sponsor :	Réf. Comité d'Ethique :

Investigateur(s)				
Nom - Prénom	téléphone	fax	Bip	e-mail
Michils Alain	02/5553985	02/5554411		amichils@ulb.ac.be

Assistant(e) de Recht	erche Clinique	- Erasme		
Nom - Prénom	téléphone	fax	Bip	e-mail
Amand Gheorghita	02/5553946	02/5554411		amand@home.ro

Promoteur – Sponsor			
Nom	Service de pharmad	ie Galénique	e et Biopharmacie
Adresse	Campus d Bouley 10	le la Plaine - vard du triom 50 Bruxelles	CP 207 phe
Personnes de contact	Amighi Karim Sebti Thami	e-mail	kamighi@ulb.ac.be msebti@ulb.ac.be
Téléphone	02/6505252 02/6505254	Fax	02/6505269

Formulaire au patient

Etude randomisée, en cross-over, pour comparer l'efficacité et la tolérance de deux nouveaux produits (ULB-GALDPI 1 et ULB-GALDPI 2) au Pulmicort Turbuhaler[®] chez le sujet sain.

Protocole

Vous êtes invité à participer à une étude clinique utilisant un médicament couramment utilisé par les asthmatiques (le Pulmicort Turbuhaler[®]) ainsi que deux nouveaux médicaments expérimentaux (ULB-GALDPI 1 et ULB-GALDPI 2) contenant la même dose de substance active que le Pulmicort Turbuhaler[®] (200 µg de budésonide).

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. Quelle que soit votre décision, vous ne serez pas pénalisé. 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.

Le but de cette étude est de comparer les deux médicaments expérimentaux au Pulmicort[®] afin de voir dans quelles mesures ils peuvent améliorer l'asthme et réduire les effets secondaires. Vous serez six personnes, en bonne santé, à participer à cette étude durant un peu plus de deux semaines (réparties en trois périodes de un jour de traitement et six jours de repos).

Il vous sera demandé de prendre les trois traitements (ULB-GALDPI 1, ULB-GALDPI 2 ou Pulmicort Turbuhaler[®]) le premier jour de chaque période. L'ordre de la prise de ces traitements sera déterminé par le hasard, comme à pile ou face. Par exemple, vous prendrez le premier jour, une dose de ULB-GALDPI 1, puis vous prendrez une dose de Pulmicort[®] le huitième jour et une dose de ULB-GALDPI 2 le quinzième jour.

Quel que soit le traitement que vous recevrez, votre médecin surveillera vos fonctions respiratoires 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 retourner huit fois à l'hôpital. Avant le début de l'étude, votre médecin vous posera des questions sur votre état général. Vous subirez un examen physique et on procédera 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. Un électrocardiogramme (ECG) sera réalisé pour effectuer un relevé de votre rythme cardiaque. On mesurera aussi votre pression sanguine et votre pouls. Vos fonctions pulmonaires seront testées au moyen d'un appareil appelé spiromètre. Vous devrez souffler dans l'appareil qui mesure combien d'air vous pouvez exhaler et avec quelle force et quelle vitesse vous pouvez le faire. Enfin, votre médecin vous expliquera en détail comment utiliser les inhalateurs qui serviront à la prise des médicaments.

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 détail 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 8	Jour 9	Jour 15	Jour 16	Jour 17
Discussion avec le docteur ou un collaborateur et consentement pour entrer dans l'étude	х							
Antécédents médicaux	Х							
Examen Physique	X							
Electrocardiogramme	X							
Pression artérielle et pouls	X							
Echantillons d'urine	X							X
Échantillons sanguins *	X	х	X	Х	X	X	X	х
Tests des fonctions pulmonaires	X	Х		Х		X		
Prise des médicaments par inhalation		х		х		x		
Images des poumons		X		X		X		

*au total, 495 ml de sang seront prélevés, essentiellement via à un cathéter (pour éviter de piquer les veines plusieurs fois dans la journée et donc faire mal), durant les 17 jours de l'étude.

Le premier jour, à 7h00, vous serez admis (à jeûn) à l'hôpital, un numéro vous sera attribué au hasard et un cathéter vous sera placé. A partir de 7h25 et jusqu'à 20h00, on vous prélèvera 20 fois 7ml de sang et puis vous serez autorisé à quitter l'établissement.

À 8h00, un des trois médicaments vous sera administré par inhalation. Ces médicaments contiennent une très faible dose de technétium pertechnéate, un élément radioactif qui s'élimine très vite et qui servira à visualiser le trajet des médicaments dans les poumons. Immédiatement après l'inhalation et à 9h30, des images (une sorte de radiographie) de votre corps seront prises pour localiser, grâce à l'élément radioactif, la position des médicaments. La dose maximale de radiation, estimée à 0,61mSV pour l'ensemble de l'étude, est inférieure à la dose reçue lors d'une classique radio du thorax. Les risques liés à l'exposition à cet élément radioactif sont donc minimes.

À 9h00, vos fonctions pulmonaires seront testées à l'aide du spiromètre pour s'assurer que tout va bien.

Des repas vous seront fournis à 12h05, 16h05 et 19h00.

Le lendemain, vous reviendrez à l'hôpital à 7h25 et l'on vous prélèvera 7ml de sang. Puis le huitième et le quinzième jour, vous serez de nouveau admis à l'hôpital pour suivre le

même protocole avec les deux autres médicaments.

Enfin, une dernière visite à l'hôpital aura lieu le dix-septième jour pour faire une analyse de sang (27ml) et d'urine pour des tests de contrôle et clôturer le dossier.

Quels sont les avantages à participer à l'étude ?

Si vous décidez de participer à l'étude, votre état général sera suivi de près et vous n'aurez pas à payer pour la médication à l'étude. Vous bénéficierez d'examens médicaux et de tests de laboratoire gratuits.

Vous n'allez pas tirer un avantage thérapeutique direct en prenant ces médicaments, mais en participant, vous aidez les chercheurs à déterminer si les nouveaux produits testés peuvent améliorer l'efficacité et la tolérance du traitement de l'asthme.

Y a-t-il des effets secondaires ou des risques ?

La plupart des personnes qui prennent la budésonide (qui est la substance active des médicaments ULB-GALDPI 1, ULB-GALDPI 2 et Pulmicort Turbuhaler[®]) ne ressentent aucun effet secondaire.

- Quelques personnes signalent des symptômes mineurs de sécheresse de la bouche ou d'irritation de la gorge.
- La budésonide peut causer l'apparition de muguet (des petites plaques blanches causées par une infection aux levures). Lorsque cela se produit, le problème est habituellement traité avec un antibiotique anti-levure. Il est possible de prévenir le muguet en se rinçant la bouche avec de l'eau et la recracher après avoir utilisé l'inhalateur.
- Dans de très rares occasions, la budésonide rend la voix rauque.
- Des répercussions sur la croissance, une diminution de la densité osseuse et la cataracte peuvent être provoquées suite à un traitement à forte dose de budésonide pendant une longue période (6mois).

Si à n'importe quel moment de l'étude vous commencez à éprouver des effets secondaires ou un autre problème, contactez le médecin ou ses collaborateurs pour l'en informer. Le fait de prélever du sang de vos veines peut provoquer des étourdissements, défaillances, douleurs ou inconfort, contusions ou infection à l'endroit du prélèvement.

Que se passe-t-il si je désire stopper l'étude ?

Vous pouvez décider de quitter l'étude à tout moment. Votre médecin 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 planifiés. 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

L'ULB galénique a souscris une 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.

Remboursement des frais

Il ne vous coûte rien de participer à cette étude. Vous serez rémunéré de 600,00 € au Jour 17 ; Un membre du bureau de votre médecin vous informera de quel genre de dépenses seront couvertes.

Si vous interrompez votre participation à l'étude, la rémunération sera au minimum proportionnelle à votre temps de participation.

Confidentialité et traitement des données

Votre médecin notera les informations recueillies dans le cadre de cette étude sur des formulaires qui seront ensuite transmis à ULB Galénique ou ses représentants. Sur ces rapports, vous serez identifié par un numéro de patient. Toutes les données dans lesquelles votre nom apparaît seront gardées par votre médecin et seront toutes confidentielles. Votre nom n'apparaîtra jamais sur aucun formulaire ou dans aucun rapport à publication.

Les personnes autorisées de ULB Galénique, des autorités gouvernementales de la santé compétentes et/ou du Comité d'éthique pourront avoir accès à votre dossier pour vérifier les données.

En signant ce formulaire de consentement éclairé, vous acceptez que les données vous concernant soient utilisées dans le but décrit dans ce document et soient transmises en dehors de la Communauté Européenne incluant les Etats-Unis d'Amérique, en accord avec les lois nationales qui transposent les directives européennes relatives à la protection de la vie privée.

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 ne participer à d'autres études.

* 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. Michils - Service de Pneumologie Tel : 02/5553985

Déclaration du patient

Etude randomisée, en cross-over, pour comparer l'efficacité et la tolérance de deux nouveaux produits (ULB-GALDPI 1 et ULB-GALDPI 2) au Pulmicort Turbuhaler[®] chez le sujet 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 les 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 caractères d'imprimerie)	
Signature du patient :	Date :
Nom de la personne ayant conduit la discus (en caractères d'imprimerie)	sion de consentement éclairé :
Signature de la personne ayant conduit la di	scussion de consentement éclairé :

Date :

-	COMITE D'ETHIQUE MEDICALE DE L'HOPITAL ERASME
	DEMANDE D'AVIS AU COMITE D'ETHIQUE
	SUR UN PROJET D'EXPERIMENTATION CHEZ L'HOMME
1	Nom de l'investigateur principal : Dr. A. Michils Service de : Pneumologie Adresse de l'Institution où l'expérimentation sera faite : Hopital Erasme, Route de Lennik, 808 1070 Bruxelles, Belgique.
2	Titre de l'expérimentation : PHARMACOSCINTIGRAPHIC EVALUATION AND COMPARATIVE STUDY OF TH
	THREE DPI FORMULATIONS OF BUDESONIDE AFTER SINGLE ORAL DOSE O THREE DPI FORMULATIONS OF BUDESONIDE IN HEALTHY SUBJECTS : Pulmicort turbuhaler [®] / Budesonide form1/Budesonide form2 SINGLE DOSE, 3WAY, CROSS-OVER STUDY
3	L'étude est-elle multicentrique ? oui 🛛 non
4	La réalisation de cette étude a-t-elle été notifiée à la Direction Médicale de l'hôpital ? oui non Si NON, veuillez en exprimer la raison :
5	L'investigation bénéficie-t-elle d'un support financier ? oui non Si OUI, veuillez en citer l'origine :
6	Avez-vous spécifié au patient (y compris dans le feuillet d'information) quels étaient les examens supplémentaires requis uniquement pour la réalisation de l'étude ? oui
7	Avez-vous pris des dispositions afin que ces derniers examens ne soient facturés ni à l'IN/ ni au patient ? oui non D
8	Le patient est-il au courant de cet état de chose ? oui non
0	Le dessier (DMII) de chaque patient entrant dans l'étude contiendra tuil à la rubrique
0	"Recherche clinique" :
	un court résumé de l'étude en cours : oui non □
	le lieu de dépôt du protocole complet : oui non □
10	Veuillez donner la liste des actes requis exclusivement par l'étude et non par le traitement

	la pathologie présentée :
	 Une substance chimique sera-t-elle administrée ? oui non
	Par quelle voie ? Inhalation par la voie pulmonaire
	Nom et origine de la substance : Budesonide
	 Des radioisotopes seront-ils utilisés ? oui non
	Lesquels ? ^{som} Tc
	La dose? 10 MBq
	• Des prélèvements seront-ils effectués ? oui
	Nature : Sanguin
	Volume prélevé : 7 à 9 mL
	Fréquence des prélèvements : 21 prélèvements en 24h le 1er, le 8ème et le 15ème jour
	+3 prélèvements avant le début de l'étude et le 17 ^{ème}
	et dernier jour.
	Volume total prélevé: 495 mL
	Sur une durée de: 17 jours.
	 Autres manipulations invasives : non
11	Choix des sujets :
	Sujets atteints d'une affection : oui 🗆 non
	Si OUI, laquelle :
	Nombre de sujets : 6
	 Age : 18 à 55 ans
	Sexe : Masculin
	 Femmes gravides ou susceptibles de le devenir pendant l'étude : oui □ non
	• Femmes allaitantes : oui 🗆 non
	• Mineurs : oui 🗆 non
12	L'expérimentation entreprise a-t-elle un but diagnostique ou thérapeutique immédiatement
	profitable au sujet ? oui 🛛 non 📕
13	L'expérimentation se situe-t-elle dans un cadre diagnostique ou thérapeutique avec des
	résultats que l'on peut espérer rapidement utilisables pour d'autres patients ? oui 🛛 non
14	L'expérimentation fait-elle partie d'un ensemble de recherches dont l'incidence diagnostique
	ou thérapeutique n'apparaît pas immédiatement mais dont les résultats aboutiront à une
	application diagnostique ou thérapeutique ultérieure ou à une meilleure connaissance des
	phénomènes physio-pathologiques ? oui 📕 non 🗆

15	Une expérimentation analogue a-t-elle déjà été entreprise ailleurs, soit en totalité, soit en partie ? oui non
16	Compte tenu des données actuelles de la science, estimez-vous que l'expérimentation est nature à entraîner des risques pour le patient ? oui non non
17	Qu'il s'agisse de sujets sains ou de malades, leur consentement sera-t-il obtenu par écrit ? oui non
18	S'il s'agit de malades et si le consentement n'est pas obtenu par écrit, veuillez en donner la raison :
19	S'il s'agit d'incapables au sens juridique ou matériel du terme (mineurs, inconscients, déments, malades psychiatriques, etc), leurs proches ou leurs représentants légaux seront-ils informés et auront-ils consenti ? oui non □
20	S'il s'agit d'enfants ou d'adolescents, auront-its donné leur consentement ? oui 🗆 non 🗆
21	Les sujets recevront-ils une rémunération ? oui ∎ non □ Si OUI, citez le montan? 600 € Citez la méthode de payement : création d'un compte interne.
22	Existe-t-il d'autres compensations (non financières) ? oui D non Si OUI, lesquelles ?
23	Au cours de cette expérimentation, les sujets sont-ils sous surveillance médicale continue oui oui non
24	Cette surveillance pourra-t-elle être assurée après l'expérimentation ? oui 📱 non 🗆
25	Si le sujet retourne à son domicile dans les heures qui suivent l'expérimentation, un contac pourra t-il être pris rapidement avec un médecin en cas de nécessité ? oui

UN AVIS FAVORABLE DU COMITE D'ETHIQUE NE DEGAGE EN RIEN LA RESPONSABILITE DE L'INVESTIGATEUR PRINCIPAL. TOUTE EXPERIMENTATION HUMAINE DOIT ETRE CONDUITE DANS LE RESPECT DE LA DECLARATION D'HELSINSKI.

Date :

Signature de l'investigateur principal :

Ethics Committees Application form

The Application form presented below, is intended to provide detailed information on the planned trial and also on aspect that might be specific for the Member State in case of multi-centre trials. The headings provided below is intended to give guidance on aspects that might be addressed when relevant. It is not intended to be a complete listing of all elements necessary for the Ethics Committee to consider during its work, but to indicate some and give examples that might have to be considered by the Ethics Committee in some Member States.

This application form can be found in the "Detailled guidance on the application format and documentation to be submitted in an application for Ethics Committee opinion on the clinical trial on medicinal products for human use"

1	EudraCT trial number: 2004-004658-14 Ethics Committee trial ID:
2	Title of the project (This should be understandable for laypersons) :
	PHARMACOSCINTIGRAPHIC EVALUATION AND COMPARATIVE STUDY OF THE BIOAVAILABILITY OF INHALED BUDESONIDE AFTER SINGLE ORAL DOSE OF THREE DPI FORMULATIONS OF BUDESONIDE IN HEALTHY SUBJECTS : Pulmicort Turbuhaler [®] / budesonide form 1/ budesonide form 2 SINGLE DOSE, 3WAY, CROSS-OVER STUDY
3	Summary of the project. (justification and relevance)
	We have developed dry powder formulations using solid lipid microparticles as pharmaceutically acceptable fillers and/or carriers, which are potentially able to overcome some related problems with the pulmonary administration of drugs such as a limited drug deposition, irritation of upper airways, rapid elimination of inhaled particles, short duration action. These new formulations of budesonide are investigated for research purposes in order to evaluate their potential to improve the performances of classical marked products used in the treatment of asthma. The main objective is to assess the comparative bioavailability of the two investigational inhaled products versus marketed inhaled comparator product.
4	Results of pre-clinical tests or reasons for not doing pre-clinical tests
	Budesonide is an active substance assessed in many clinical trials. This is the reason why we have not done pre-clinical tests after the in vitro trials.
5	Primary hypothesis in this trial (if relevant, also secondary hypotheses)
	These solid lipid microparticles, formed of phospholipids and cholesterol, two physiologically well- tolerated components, may present interesting characteristics for the delivery of drugs by the pulmonary route: They can be formulated as a lipidic matrix, entrapping both water-soluble and water insoluble drugs and allowing a prolonged local drug release, or as physical blend with the active substance improving the drug deposition. Moreover, they offer a better stability and an encapsulation higher than liposomes. And, their hydrophobic nature reduces the absorption of the ubiquitous vapour leading to a reduction of the aggregation and the adhesion of particles.
6	Research ethical considerations (Identify and state any possible problems that might occur. Present possible gain in knowledge to be obtained in the trial and its importance, possible risks for injuries or distress for the participants. Present your own evaluation of the risk-benefit ratio).

	Budesonide is an active substance assessed in many clinical trials. Its side effects are well known and not present major risks for injuries or distress for the participants. The excipients are mainly constituted of biocompatible and biodegradable material. They may reduce local irritation offering a good tolerance in the pulmonary tract. For example, dipalmitolphosphatidylcholine comprises an estimated 70-80% of the naturally occurring pulmonary surfactant pool. In order to assess the regional lung deposition, the formulations will be radiolabelled with up to 10 M ³⁹ ^{mare} Tc. The maximum effective dose to each subject from participation in this study is estimated to be 0.61mSV, which is less than that received from a single abdominal X-ray. The risk to the subject from this amount of radiation is therefore considered to be very small.
,	Reason for including persons from vulnerable groups, i.e. minors, temporaily or permanently incapacitated subjects.
	Because pharmacokinetics of budesonide does not differ significantly in healthy volunteers and asthr patients and the aim of this study is experimental (and not therapeutic), only healthy male volunteers be selected on the basis of inclusion, exclusion criteria and medical examination.
3	Description of the recruitment procedure (all material to be used should be appended)
	Healthy volunteers will be selected on the basis of inclusion, exclusion criteria and medical examinat 1. INCLUSION CRITERIA
	I. Sex: Male
	J. Ethnic group : Caucastan K. Subject aged between 18 and 55 years
	L. Subject aged between to and 55 years
	M. BMI between 19 and 30 kg/m2
	N. Good physical, medical and mental status estimated on the basis of the medical history and a gene clinical examination.
	O. Results of laboratory tests within the normal range of the local laboratory
	P. Subjects with normal cardiovascular clinical examination, absence of any abnormality
	Q. Subject is available for the whole study period.
	S. Freely given fully informed written consent obtained.
	2. EXCLUSION CRITERIA
	H. Drug addiction or excessive use of alcohol (daily intake in excess of the equivalent of 25 g pure alcohol) or xanthines (tea, coffee, cacao).
	 Excessive use of tobacco (more than 10 cigarettes per day). University of and investigation of the state of t
	 History of cardiovascular, respiratory, nepatic, renai, gastrointestinal, endocrinological, neurologic disorders susceptible of constituting a risk factor when taking the study medication or modifying t absorption, metabolism or elimination of the drugs.
	K. Subjects having a history of significant sensitivity or allergy to budesonide derivatives or related drugs.
	L. Any drug treatment undertaken from 15 days (2 months for enzyme-inducing drugs) before until o day after the end of the trial.
	M. Subjects who have participated in blood donation within the last 2 months before the proposed stu N. Participation in an electric state of the st
	N. Participation in another clinical study, currently or during the past four weeks.
	O, Subjects unable to fulfil the requirements of the protocol.

After obtaining the written informed consent, the investigator will record the significant medical and surgical history data (neurological, psychiatric, eyes/ears/nose/throat, skin, cardiovascular, respiratory, hepato-gastrointestinal, musculoskeletal, genito-urinary, allergic, endocrinian/metabolic, hematological/lymphatic, immunological, special diet, others).

The routine medical examination will include physical examination, weight, height, pulse, systolic and diastolic blood pressure, a 12-lead electrocardiogram, and a siprometer test. Urine and venous blood samples will be obtained for the urinalysis and the hematology and clinical chemistry testing. An urine drug screen will also be performed.

- I. Urinalysis: pH, protein, glucose, ketones, bilirubin, blood, cells, sediment ;
- Hematology: full blood count (RBC, WBC, differential), hemoglobin, haematocrit, platelet count, erythrocyte sedimentation rate (ESR);
- III.Clinical chemistry: total bilirubin, AST (SGOT), ALT (SGPT), alkaline phosphatase (ALP), GGT (gamma-GT), total protein, albumin, creatinine, urea, glucose, cholesterol, sodium, potassium, chloride.
- IV.Screening for drugs of abuse: opium alkaloids, amphetamine, cocaine metabolites and cannabinoids.

Procedure at the site to provide information and obtain consent from the subjects, or parents or legal representatives if applicable (who will give the information and when, need for legal representatives, witness etc).

9

Within the two weeks before the beginning of the trial, the Medical Responsible, Dr. Michils (Service de Pneumologie) will obtain a freely given written consent from each subject after an appropriate explanation of the aims, methods, anticipated benefits, potential hazards, and any other aspect of the study which is relevant to the subject's decision to participate. The consent form must be signed and dated by the subject before the subject is exposed to any trial-related procedure, including screening tests for eligibility.

For patients not qualified to give their legal consent, the written informed consent must be obtained from the legal parent or guardian.

The investigator will explain that the subjects are completely free to refuse to enter the study or to withdraw from it at any time, without any consequences for their further care and without the need to justify.

Each subject will be informed that the portions of his/her source records and source data related to the trial may be reviewed by the monitor, a quality assurance auditor or a health authority inspector, in accordance with applicable regulatory requirements.

10 Investigational procedures and any deviations necessary from the routine treatment

The study design is an open single-dose, three-treatment, three-period cross-over study with wash-out period of 6 days at least between the three phases of the study. An equal number of subjects are rando assigned to each of the three possible dosing sequences.

400 mg of radiolabelled budesonide will be administred on each of three separate occasions. On the fi one, it will be delivered to the lungs via the Turbuhaler multi-dose dry powder inhaler. On the other occasions, it will be delivered using the Novartis[®] Aeroliser dry powder inhaler.

- Treatment 1 + Pulmicort Turbuhaler[®] 200 μg (2 puffs) (Budesonide 200 μg radiolabelled with up to 5 MBq ^{99m}Tc, Astra-Zeneca- REFERENCE PRODUCT) after ingestion of active charcoal.
- Treatment 2 : ULB-GALDPI 1 (2 capsules) (Budesonide 200 μg radiolabelled with up to 5 MBq ^{99m}Tc, ULB-Galénique - TEST PRODUCT) after ingestion of active charcoal.
- Treatment 2: ULB-GALDPI 2 (2 capsules) (Budesonide 200 μg radiolabelled with up to 5 MBq ^{99m}Te, ULB-Galénique- TEST PRODUCT) a ingestion of active charcoal.



Immediately following administration of the radiolabelled aerosol, scintigraphic images will be recoras described below:

- 1. Posterior view of the chest;
- 2. Anterior view of the chest;
- 3. Right lateral view of the oropharynx;
- Anterior and posterior abdominal views if necessary, ie. If activity had spread through the intestine, beyond the field of view in either of the chest images;
- 5. Image to record any activity on items external to the body, as follows:
 - · Turbuhaler mouthpiece;
 - Aeroliser monodose device;
 - Aeroliser monodose capsule;
 - Exhalation filter.

On the three days of drug administration, an indwelling i.v. catheter will be inserted into forearm veir During each session, 21 blood samples of 7 ml will be collected, according to the following sampling schedule : pre-dose and, 10, 20, 30, 40, 50 min, and 1h, 1h30, 2h, 2h30, 3h, 3h30, 4h, 4h30, 5h, 6h, 8h, 10h, 12h and 24hours post-dose, by venipuncture in the forearm in evacuated glass tubes contain heparin. The samples will be obtained via an indwelling heparinized catheter to trauma and speed up sampling. After collecting of the 12 hours sample, the catheter will be removed. The subsequent sam will be drawn by direct venipuncture.

11 Risk assessment, foreseeable risks of treatment and procedures to be used (incl. pain, discomfort, violation of integrity and means to avoid and/or take care of unforeseen / unwanted events)

Lung function tests will be performed at screening and at the post-study medical examination. On each of the study days, lung function tests will be performed both before dosing and again at 30 minutes after dosing.

All subjects will stand during lung function measurements and the best of three technically acceptable attempts will be taken as the true measure of lung function at each time point. The following lung function tests will be performed using a Micromedical Microloop spirometer:

FEV1 (forced expiratory volume in one second) FVC (forced vital capacity) PEFR (peak expiratory flow rate) PIFR (peak inspiratory flow rate

In case of bronchospasm and If FEV1 falls by >15% but <30% of baseline, treat with inhaled salbutamol 200 μ g or equivalent via a MDI and spacer. Monitor FEV1 30 minutes post treatment, then hourly or at physician's discretion until it returns to >15% of baseline.

If FEV1 falls by >30% but <50% of baseline, treat with 2.5 mg salbutamol or equivalent via nebuliser. Monitor FEV1 15 minutes after completion of nebulisation then at intervals as above until it returns to >15% of baseline. If subject is distressed, consider withdrawing from study.

If FEV1 falls by \geq 50% give 40-60% oxygen and 5 mg salbutamol or equivalent via nebuliser. Arrange immediate transfer to QMC. Monitor heart rate and Sa0₂. Withdraw from study,

12 Previous experience of the conduct of similar research procedures at this site.

Yes.

13 Any foreseeable benefit for included subjects

Such formulations may provide a prolonged local drug release and therefore improve patients' compliance and reduce side effects.

14 Relation between subject and investigator (patient-physician, student - teacher etc)

The medical responsible, Dr. Michils, will supervise this trial on six healthy volunteers.

15 Procedures of the site to check if the subject participates simultaneously in other research or if a required period has elapsed since previous participation in research (of special importance when healthy subjects are included in pharmacology trials).

Healthy volunteers will be selected on the basis of a medical examination, inclusion and exclusion criteria such as the participation in another clinical study, simultaneously or during the four weeks preceding the study.

Within the two weeks before the beginning of the trial, the Medical Responsible, Dr. Michils (Service de Pneumologie) will inform each subject of these requirements, and any other aspect of the study which is relevant to the subject's decision to participate.

The subject must carry out his duties once the consent form is signed and dated.

For each subjection of the subjects of the subject of the sub	ect enrolled, an abbreviated case report form (CRF) will be completed and signed by stigator or an authorised co-investigator. All forms will be filled out using indelible be legible. searching, recording and reporting adverse effects (describe when, by whom ar n questions and/or according to lists) will be monitored for adverse events (AE) throughout the entire confinement periods. The don adverse events during each vitals signs examination and at the post-study visit, taneously reported by the subjects or observed by the investigator will be recorded in the according to the following definitions:
Methods for s how, i.e. ope The subjects v will be queried All AEs spon CRF and rated The following Mild:	searching, recording and reporting adverse effects (describe when, by whom an n questions and/or according to lists) will be monitored for adverse events (AE) throughout the entire confinement periods. The d on adverse events during each vitals signs examination and at the post-study visit. taneously reported by the subjects or observed by the investigator will be recorded in a according to the following definitions: three-point rating scale will be used for rating the intensity of each AE:
The subjects v will be queried All AEs spont CRF and rated The following Mild:	vill be monitored for adverse events (AE) throughout the entire confinement periods. I d on adverse events during each vitals signs examination and at the post-study visit, taneously reported by the subjects or observed by the investigator will be recorded in d according to the following definitions: three-point rating scale will be used for rating the intensity of each AE:
The following Mild:	three-point rating scale will be used for rating the intensity of each AE:
Mild:	
	Awareness of signs or symptoms, but no disruption of usual activity.
Moderate:	Event sufficient to affect usual activity (disturbing).
Severe:	Inability to work or perform usual activities (unacceptable).
The following investigational	g four-point scale will be used for rating the causal relationship of the AE to I product:
Unrelated:	Clearly and incontrovertibly due only to extraneous causes, and does not meet criteria listed under unlikely, possible or probable.
Unlikely:	Does not follow a reasonable temporal sequence from administration. May have been produced by the subject's clinical state or by environmental factors or other therapies administered.
Possible:	Follows a reasonable temporal sequence from administration. May have been produced by the subject's clinical state or by environmental factors or other therapies administered.
Probable:	Clear-cut temporal association with improvement on cessation of test drug or reduction in dose. Reappears upon rechallenge. Follows a known pattern of response to test drug.
AEs requiring well-being of t the best possib	therapy must be treated by recognised standards of medical care to protect the health the subject. Appropriate resuscitation equipment and medicines must be available to en ole treatment of an emergency situation.
The outcome of	of Aes will be rated as:
• cor	mplete recovery
• inc	known
• dea	ath
	Severe: Severe: The following nvestigationa Unrelated: Unlikely: Possible: Probable: AEs requiring vell-being of he best possib The outcome of inc unil dea

18	Procedures used to protect the privacy of recorded data, source documents and samples (if applicable).				
	The investigator is responsible for maintaining the records which enable the conduct of the study to be fully documented, according to the ICH GCP filing standards. All the required study documentation and correspondence should be kept by the investigator for the maximum period of time permitted by local requirements.				
	The investigator is responsible for the completion and maintenance of the confidential subject identification code which provides the unique link between named patient source records and anonymous CRF data for the sponsor. The investigator must arrange for the retention of this confidential code for at least fifteen years after the completion or discontinuation of the study.				
	No study document should be destroyed without prior written agreement between the investigator and the sponsor. Should the investigator elect to assign the study documents to another party, or move them to another location, the sponsor must be notified.				
	On request, the investigator will provide the sponsor with additional data relating to the study, or copies of relevant source records, duly anonymised. This is important when CRFs are illegible or when errors in data transcription are encountered. In case of particular issues or governmental queries, it may be necessary to have access to the complete study documentation, provided that the confidentiality of the subjects is protected in accordance with applicable requirements.				
	The samples will be stored in Laboratoire de Pharmacie Galénique ULB, in a controlled temperature freezer (-80°C +/- 5°C), for a period of 1 year following the study completion.				
19	Plan for treatment or care after the subject has ended the participation in the trial (who will be responsible and where)				
	All adverse events and serious adverse events have to be followed up by the Medical Responsible (Dr. Michils) until the medical condition of the subject is normalized.				
20	Statistical consideration and reasons for the number of subjects to be included in the trial.				
	Because of the numerous blood sampling to be collected in 24 hours and some technical aspects of radiolabelling the products, we have decided to recruit 6 volunteers.				
21	Amount and procedure for remuneration or compensation of subjects (description of amount paid, during the participation in the trial and for what, i.e. travel cost, loss of earning, pain and discomfort etc).				
	The total amount for this study is $600.00 \in$. Travel cost will be paid for every visit to the hospital and remuneration will be given in order to make up for pain and discomfort after the participation to the three periods.				
22	Rules for stopping or prematurely ending the trial at the site(s) in this Member State or as a whole				

Subjects have the right to withdraw from the study at any time for any reason, without the nee- justify. The investigator also has the right to withdraw a subject in case of AEs, protocol violations, c or administrative reasons. Since an excessive rate of withdrawals can make the study uninterpretable, unnecessary withdrawal of subjects must be avoided.
For any post-randomisation discontinuation, the investigator will obtain all the required details and document the reason(s) in the CRF. If the reason for the removal of a subject is an AE, the main speci event or laboratory test will be recorded in the CRF, and the investigator will make thorough efforts to clearly document the outcome.
Subjects withdrawn from the study because of safety reasons will not be replaced. Subjects who do complete the study for reasons unrelated to the study medication will be replaced.
Agreement on investigator's access to data, publication policy etc. (if not available in the protocol)
Sources of funding (if not available in the protocol) and information on financial or other interests of the investigator(s).

NAME AND SIGNATURE OF	APPLICANT - CO-ORDINATING
INVESTIGATOR/PRINCIPAL	INVESTIGATOR (and/or sponsor, if applicable)

I hereby confirm that the information given in this application is correct and that I am of the opinion that it will be possible to conduct the trial in accordance with the protocol, national regulations and principles of Good Clinical Practice.

Name : Surname : Address :

Position :

Date :

Signature:

3. Donées PK

		DONNEES su	r 24 h		
Experiment	Pulmicort		n= 30		Study : BUDST
Analyte	Epimer B				
			Data		
Galenic Formulati	on			-	
		Study subjects	AUC 24h	Cmax	Tmax
Turbuhaler		1	1989,34	767,20	0,50
		2	12481,45	839,39	24,00
		3	1655,82	1090,27	0,33
		4	3906,38	742,04	0,16
		5	8955,34	1319,12	10,00
		0	5630,52	710,70	0,16
Mean turbuhaler			5769,81	911,45	5,86
Max turbuhaler			12481,45	1319,12	24,00
Min turbuhaler			1655,82	710,70	0,16
SD turbuhaler			4240,34	242,15	9,70
		-			
Experiment	Budesonide fMP	3			
Analyte	Epimer B				
			-		
0.1.1.P. 1.4			Data		
Galenic Formulati	on	Study autoinste	ALIC 24L	Course	
		Study subjects	AUC 240	Cinax 2262.76	1 max
budesonide form1		1 1	6827,50	2353,/6	0,33
		1	5463.50	2656 12	0,33
		4	4467 72	2119 30	0.33
		5	5270 71	1254 70	0.83
		6	4853.06	2216.68	0.16
Mean budesonide	form1		5576.62	2049 74	0.47
Max budesonide f	orm1		6827.56	2656.32	0.83
Min budesonide fo	orml		4467.72	1254.70	0.16
SD budesonide for	ml		940.46	499.82	0.29
and consecutive rea			370,10	455,02	(jac)
Experiment	Budesonide fM2	7			
Analyte	Epimer B	-			
		-			
			Data		
Galenic Formulati	on				
		Study subjects	AUC 24h	Cmax	Tmax
hudesonide form?		1	6581,33	2017,96	1,50
adenoinde torma		2	16546,36	3790,87	10,00
		3	2753,95	1689,17	1,00
		4	10209,14	1486,20	0,33
		5	5615,27	846,67	2,50
		6	5341,15	2246,19	0,50
Mean budesonide	form2		7841,20	2012,84	2,64
Max budesonide for	orm2		16546,36	3790,87	10,00
Min budesonide fo	orm2		2753,95	846,67	0,33
SD budesonide for	rm2		4900.19	995.78	3.69

Experiment	Pulmicort		n= 30		Study : BUDST
Analyte	Epimer A				14-01-2006
			Data		
Galenic Formulati	on	Study subjects	AUC 24h	Cmax	Tmax
		1	2421,02	825,22	0,33
turbuhaler		2	8626,66	634,94	24,00
		3	1678,09	675,22	0,16
		4	3972,51	680,86	0,33
		5	9356,04	1264,45	10,00
		6	4342,90	585,95	1,00
Mean turbuhaler			5066,20	777,77	5,97
Max turbuhaler		9356,04	1264,45	24,00	
Min turbuhaler			1678,09	585,95	0,16
SD turbuhaler			3202,35	251,48	9,63

Experiment Budesonide fMP3 Analyte Epimer A

	Data			
Galenic Formulation	Study subjects	AUC 24h	Cmax	Tmax
hades mide from 1	1	5971,06	1884,73	0,33
budesonide form1	2	4754,91	1200,34	0,33
	3	3552,80	2248,19	0,83
	4	3215,70	1898,60	0,33
	5	3354,49	902,97	1,00
	6	3602,25	1822,77	0,16
Mean budesonide form1		4075,20	1659,60	0,50
Max budesonide form1	5971,06	2248,19	1,00	
Min budesonide form1	3215,70	902,97	0,16	
SD budesonide form1	1078,06	502,84	0,34	

Experiment	Budesonide fM2		
Analyte	Epimer A		

		Data		
Galenic Formulation	Study subjects	AUC 24h	Cmax	Tmax
hadronida Gana?	1	6601,84	2443,68	1,50
budesonide form2	2	14207,00	3092,88	10,00
	3	1488,96	921,85	0,83
	4	8169,00	1384,30	0,33
	5	6835,28	1302,82	0,33
	6	4653,03	2041,35	0,50
Mean budesonide form2		6992,52	1864,48	2,25
Max budesonide form2		14207,00	3092,88	10,00
Min budesonide form2		1488,96	921,85	0,33
SD budesonide form2		4227,82	813,67	3,82

	<u>L</u>	OTHERS SH	101		
Experiment	Pulmicort		n= 30		Study : BUI
Analyte	Epimer B				
			Data		
Galenic Formulati	on	Study subjects	AUC 6h	Cmax	Tmax
		1	1780,11	767,20	0.50
turbuhaler		2	1859.39	785,46	0.83
		3	1655,82	1090,27	0.33
		4	1742.52	742.04	0,16
		5	2427,43	777,74	0,16
		6	1877,06	710,70	0,16
Mean turbuhaler			1890,39	812,23	0,36
Max turbuhaler			2427,43	1090,27	0,83
Min turbuhaler			1655,82	710,70	0,16
SD turbuhaler			275,17	138,91	0,27
Experiment	Budesonide fMP3				
Analyte	Epimer B	1			
			Data		
Galenic Formulati	on				
		Study subjects	AUC 6h	Cmax	Tmax
hudesonide form!		1	4569,94	2353,76	0,33
Charactime territi		2	4441,25	1697,70	0,33
		3	4459,86	2656,32	0,83
		4	3808,33	2119,30	0,33
		5	3583,58	1254,70	0,83
		6	4154,10	2216,68	0,16
Mean budesonide	form1		4169,51	2049,74	0,47
Max budesonide for	orml		4569,94	2656,32	0,83
Min budesonide fo	orm1		3583,58	1254,70	0,16
SD budesonide for	rm l		398,12	499,82	0,29
Para da sera	[n.]	1			
Experiment	Budesonde fM2	-			
Analyte	Epimer B	1			
			Data		
Galenic Formulati	on	1	Data		
		Study subjects	AUC 6h	Cmax	Tmax
hudennite P		1	2902,33	2017,96	1,50
budesonide form2		2	4012,08	1557,94	0.16
		3	2726,92	1689,17	1,00
		4	2888,18	1486,20	0,33
		5	1743,10	846,67	2,50
		6	3160,01	2246,19	0,50
Mean budesonide	form2		2905,44	1640,69	1,00
Max budesonide for	orm2		4012,08	2246,19	2,50
Min budesonide fo	orm2		1743,10	846,67	0,16
SD budesonide for	am7		731.12	494.25	0.99

Experiment	Pulmicort		n= 30		Study : BUDST
Analyte	Epimer A				14-01-2006
			Data		
Galenic Formulati	on	Study subjects	AUC 6h	Cmax	Tmax
		1	1571,58	825,22	0,33
turbuhaler		2	1099,39	598,55	0,83
		3	1081,24	675,22	0,16
		4	1362,72	680,86	0,33
		5	1290,83	461,08	6,00
		6	1210,62	585,95	1,00
Mean turbuhaler			1269,40	637,81	1,44
Max turbuhaler		1571,58	\$25,22	6,00	
Min turbuhaler			1081,24	461,08	0,16
SD turbuhaler			183,44	121,52	2,26

Experiment Budesonide fMP3 Analyte Epimer A

			Data		
Galenic Formulation	F/NF	Study subjects	AUC 6h	Cmax	Tmax
budesonide form1	NF	1	3152,72	1884,73	0,33
		2	3171,83	1200,34	0,33
		3	3546,39	2248,19	0,83
		4	2723,31	1898,60	0,33
		5	2141,72	902,97	1,00
		6	3539,67	1822,77	0,16
Mean budesonide form	1		3045,94	1659,60	0,50
Max budesonide form1	1		3546,39	2248,19	1,00
Min budesonide form1	2141,72	902,97	0,16		
SD budesonide form1			537,25	502,84	0,34

Experiment	Budesonide fM2		
Analyte	Epimer A		

		Data		
Galenic Formulation	Study subjects	AUC 6h	Cmax	Tmax
hadavarida 62	1	3251,21	2443,68	1,50
budesoniae form2	2	2562,42	1247,59	0,16
	3	1488,96	921,85	0,83
	4	2203,40	1384,30	0,33
	5	2421,40	1302,82	0,33
	6	2650,09	2041,35	0,50
Mean budesonide form2		2429,58	1556,93	0,61
Max budesonide form2	3251,21	2443,68	1,50	
Min budesonide form2	1488,96	921,85	0,16	
SD budesonide form2		579,19	568,22	0,49

	(a)																					
		Prélèvements																				
Formulation	Sujet	0h	0.16h	0.33h	0.5h	0.66h	0.83h	1h	1.5h	2.0h	2.5h	3.0h	3.5h	4.0h	4.5h	5.0h	6.0h	7.0h	8.0h	10.0h	12.0h	24.0h
Pulmicort	1	0.0	224.4	681.6	767.2	303.7	286.2	591.3	432.8	251.1	248.9	246.7	199.4	168.3	93.4	417.6	140.4	56,6	54.9	0.0	0.0	0.0
Pulmicort	2	0.0	598.9	408.8	461.1	491.3	785.5	489.4	3358.9	297.A	190.1	1722	355.0	280.9	263,1	223.6	185.6	460.7	500.0	678.A	406.2	839.4
Pulmicort	3	0.0	1071.4	1090.3	759.9	688.1	687.1	574.1	550.8	156.6	129.4	156.2	361.3	135.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pulmicort	4	0.0	742.0	731.6	598.5	564,3	278.9	440.0	415.6	391.3	382.7	1432.1	254.5	154.9	126.7	81.8	445	43.5	237.6	368.3	143.6	0.0
Pulmicort	5	0.0	777.7	2357.5	757 2	596.0	464.5	612.1	605.6	511.2	442.4	437.6	873.1	117.1	108.6	100.8	666.7	182.6	172.6	1319.1	101.4	400.8
Pulmicort	6	0.0	710.7	632.8	460.1	471.1	482.8	706.5	469.1	341.6	286.1	205.1	356.2	169.5	107.8	73,2	314.4	89,4	0.0	437.2	376.1	0.0
fMP3	1	0.0	2093.8	2353.8	1671.0	1537.1	1531.2	1513.1	630.6	620.4	611.7	595.8	644.1	619.9	419,5	403.1	308.9	247.6	76.9	118.9	504.1	112.7
fMP3	2	0.0	1364.0	1697.7	1569.2	1464.2	1359.3	1169.5	1141.9	1115.8	604.3	592.0	758.0	347.0	337.7	293.2	271.9	132.5	113.9	113.4	107.3	119.7
fMP3	3	0.0	545.9	2052.8	1370,5	545.9	2656.3	2087.6	1021.5	1079.2	1354.8	434.5	331.6	258.3	155.4	9.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	167.3
fMP3	4	0.0	1323.3	2119.3	2045.2	1638.3	1325.6	1318.1	7162	663.0	527.6	455,4	454.7	357.3	315,4	171,4	162.5	1197.0	220,4	28,1	0.0	0.0
fMP3	5	0.0	448.3	924.6	933.5	1000.6	1254.7	1055.1	1019.6	922.2	914.1	388.5	578.2	367.3	293.7	227.5	128.3	106.3	186.4	148.3	134.9	0.0
fMP3	6	0.0	2216.7	1729.1	1436.4	t110.4	0.068	770.6	905.3	1294.3	514.0	2897,4	1112.9	277.4	129.1	117.2	107.2	94.7	83.6	81.9	37.5	0.0
fM2	1	0.0	906.8	756.0	642.8	659.9	744.5	3017 A	2018.0	453.7	228.7	216,8	205,8	159.3	95.2	200.2	168.3	109,8	101.8	202.6	1,806	128,4
fM2	2	0.0	1557.9	1146.6	1179.9	1245.2	1213.6	969.5	868.6	#01.3	760.5	756.0	420.3	593.0	350.7	327.9	215.3	451.6	336.4	3790.9	368.7	229,6
fM2	3	0.0	810.7	671.8	532.9	1028.6	1940,5	1669.2	901.5	479.6	267.4	417.6	221.B	217.9	210.6	88.5	54.1	0.0	0.0	0.0	0:0	0:0
fM2	4	0.0	743.1	1486.2	1194.3	1158.4	896.2	574.3	573.4	565.1	529.7	495.3	421.9	351.4	252.3	119.0	259.0	629.1	220.6	91.2	407,5	532.8
fM2	5	0.0	563.3	768.0	339.6	218.9	193.9	184.8	181.6	154.6	846.7	566,5	195.3	418.5	187.1	361	50,8	132.5	763	203,9	249,8	240,6
fM2	6	0.0	2157.6	2201.9	2246.2	946.7	1454.7	1223.6	467.7	381.8	372.4	276.8	232.2	227.4	226.9	130.7	106,6	91.4	1796-8	789.4	133.3	120.1

Tableau A3-5 : (a) Concentrations plasmatiques de l'épimère B de budésonide au cours du temps chez les six volontaires (valeurs brutes).

Tableau A3-5 : (b) Concentrations plasmatiques de l'épimère B de budésonide au cours du temps chez les six volontaires (valeurs aberrantes interpolées).

	(b)	_																				
Formulation	Sujet	0h	0.16h	0.33h	0.5h	0.66h	0.83h	1h	1.5h	2.0h	2.5h	3.0h	3.5h	4.0h	4.5h	5.0h	6.0h	7.0h	8.0h	10.0h	12.0h	24.0h
Pulmicort	1	0.0	224.4	681,6	767.2	303.7	286.2	591.3	432.8	251.1	248.9	246.7	199.4	168.3	93.4	417.5	140.4	56.6	54.9	0.0	0.0	0,0
Pulmicort	2	0.0	598.9	408.8	461.1	491.3	785.5	489.4	393.4	297.4	190.1	172.2	355.0	280.9	263.1	223.6	185,6	392.5	600.0	678,4	406.2	839.4
Pulmicort	3	0.0	1071.4	1090.3	759.9	688.1	687.1	574.1	550.0	150.0	128.4	158.2	363.3	135.0	0.0	0.0	0.0	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pulmicort	4	0.0	742.0	731.6	598.5	584.3	278.9	440.0	415.6	391.5	382.7	318.6	254.5	154.9	126.7	81.8	44.5	43.5	237.6	368.3	143.6	0.0
Pulmicort	5	0.0	777.7	772.5	767.2	596.0	454.5	612.1	605.6	511.2	442.4	437.6	277.3	117.1	108.6	100.8	666,7	182.6	172.8	1319.1	101.4	400.8
Pulmicort	6	0.0	710.7	632.8	460,1	471.1	482.8	706.5	469.1	341.6	286,1	205.1	356.2	169.5	107.8	73.2	314.4	119.4	0.0	437.2	376.1	0.0
fMP3	1	0.0	2093,8	2353.8	1671.0	1537.1	1531.2	1513.1	630.6	620.4	611.7	595.8	644.1	619.9	419.5	403.1	308.9	247.6	76.9	118.9	118.0	112.7
fMP3	2	0.0	1364.0	1697.7	1569.2	1464.2	1359.3	1169.5	1141.9	1115.8	604.3	592.0	758.0	347.0	337.7	293.2	271.9	132.5	113.9	113.4	107.3	119.7
fMP3	3	0.0	545.9	2052.8	1370.5	1993.9	2656.3	2087.6	1021.5	1079.2	1334,8	434.5	331.6	258.3	155.4	9.5	0,0	0.0	0.0	0.0	0.0	167.3
fMP3	4	0.0	1323.3	2119.3	2045.2	1638.3	1325.6	1318.1	716.2	663.0	527.6	456.4	454.7	357.3	315.4	171.4	182.5	191.4	223.4	28.1	0.0	0.0
fMP3	5	0,0	448.3	924.5	933.5	1000.6	1254.7	1055.1	1019.6	922.2	914.1	368.5	578.2	367.3	293.7	227.5	128.3	106.3	185.4	145.3	134.9	0.0
fMP3	6	0.0	2216.7	1729.1	1436.4	1110.4	890.0	770.6	905.3	1294.3	514.0	813.5	1112.9	277.A	129.1	117.2	107.2	94,7	83.6	81.9	37.5	0.0
fM2	1	0.0	905.8	756.0	642.8	659.9	744.5	1067.6	2018.0	453.7	228.7	216.8	206.6	159.3	98.2	200.2	168.3	109.8	101.8	202.6	305.1	128.4
fM2	2	0.0	1557.9	1145.6	1179.9	1245.2	1213,8	969.5	868.6	801.3	760.5	756.0	420.3	593.0	350.7	327.9	215.3	451.8	336.4	3790.9	358.7	229.6
fM2	3	0,0	810.7	671.H	532.9	1028-6	1140.5	1689.2	901.5	479.6	287.4	417.6	221.8	217.9	210.6	88.5	54.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
fM2	4	0.0	743.1	1486.2	1194.3	1158.4	696.2	574.2	573.4	566.1	529.7	495.3	421.9	351.4	252.3	119.0	259.0	629.1	220.6	91.2	407.5	532,8
fM2	5	0.0	562.3	768.0	335.5	218.9	193.9	184.B	181.6	164.6	846.7	566.5	195.3	418.5	167.1	36.1	50.8	132,5	76.3	203.9	249.5	240,6
fM2	6	0.0	2157,6	2201.9	2246.2	945.7	1464.7	1223.6	467.7	381.8	372.4	276.8	232.2	227,4	226.9	130.7	106.6	91,4	99.8	769.4	133,3	120,1

Tableau A3-6 :

Sample size	Т
3	1.155
4	1.481
5	1.715
6	1.887
7	2.020
8	2.126
9	2.215
10	2.290
11	2.355
12	2.412
13	2.462
14	2.507
15	2.549
16	2.585
17	2.620
18	2.651
19	2.681
20	2,709
25	2.822
30	2.908
35	2.979
40	3.036
50	3.128
100	3.383

