

# La Vague

LE MAGAZINE DE LA PHARMA ET DES BIOTECHS

N° 80 | Janvier 2024  
Trimestriel

The Myth of Testing Colored  
Samples: Debunked.

The alternatives and  
rapid Microbiological  
methods &  
Pharmacopeias world.

Conception de modèles  
galéniques intelligents  
pour la formulation de  
molécules actives.

Advancing Sustainability:  
Recycling Single-Use  
Technology in the  
Pharmaceutical Industry.

## Développement Durable Microbiologie



# Conception de modèles galéniques intelligents (stimuli-sensitifs) pour la formulation de molécules actives.

Par Camille MATHIEU - Laboratoire PIMM et EBI, Emmanuel RICHAUD - Laboratoire PIMM & Samar ISSA - EBI

Parmi les différents systèmes de libération prolongée des principes actifs (API) (Active Pharmaceutical Ingredient), les polymères stimuli-sensitifs, dits matériaux "intelligents", ont gagné un intérêt en développement galénique compte-tenu du changement de la configuration du réseau polymère selon le paramètre de choix de son environnement (pH, température, oxydoréduction, polarité...).

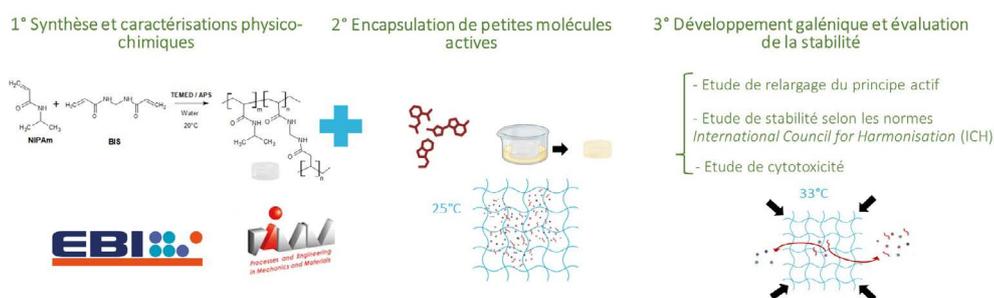


Fig. 1. Méthodologie globale d'étude du pouvoir d'encapsulation et de libération du support.

Cet article décrit la méthodologie de développement de formulation prolongée à base de Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAm), un polymère biocompatible, thermosensible, aux propriétés uniques et versatiles et les caractéristiques physico-chimiques du vieillissement, ainsi que sa capacité d'encapsulation d'API.

Avec l'augmentation de la prévalence des maladies chroniques, la croissance du marché des produits biologiques, l'augmentation des investissements en R&D qui se divisent les avancées technologiques accompagnées de lancement de nouveaux produits, la prévision du taux de croissance annuel moyen du marché mondial de l'administration de médicaments serait de 5,9 %<sup>[1]</sup>. Plusieurs approches en matière d'administration de médicaments par le biais de modifications (du médicament, de son environnement et des systèmes d'administration) ont été développées afin d'améliorer l'efficacité et la libération d'API tout en minimisant son accumulation hors cible<sup>[2]</sup>. Parmi les différents systèmes de délivrance de médicament (Drug Delivery Systems, DDS), plusieurs familles de polymères ont été décrites<sup>[3]</sup> se divisant en deux familles : les polymères naturels et synthétiques (Fig. 2) dont les polymères biodégradables et bio absorbables tels que l'acide poly-lactiques (polylactic acid, PLA) et l'acide poly-lactique-co-glycolique (poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA).

En tenant compte des **5 différentes générations d'API**, des formulations utilisant des polymères sont décrites :

- 1) petites molécules (< 900 daltons) : Naloxegol (Movantik®), naloxone PEGylée ,
- 2) protéines & peptides : Pegademase bovine (Adagen®), protéine PEGylée,
- 3) anticorps : Certolizumab pegol (Cimzia®),
- 4) acides nucléiques : Givosiran (Givlaari®), un conjugué N-acetylgalactosamine-siRNA, (GalNAc-siRNA),
- 5) thérapie cellulaire : les CAR-T cells, (Chimeric Antigen receptor (CAR) inserted into the T cells, hydrogels à base de Gelatin Methacryloyl (GelMA) récemment développés depuis la commercialisation du Tisagenlecleucel (Kymriah®)<sup>[4]</sup>.

→

Systèmes de Délivrance de Médicament - Polymeric Drug Delivery Systems (DDS)	
Polymères Naturels	Polymères synthétiques
Dérivés de la L-Arginine Dérivés du Chitosan Dérivés de la Cyclodextrine Acides Poly(glycoliques), poly (lactiques). Acide Hyaluronique Polysaccharides — Amylose	Poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (Poly(HEMA)) Poly(N-isopropyl acrylamide)s (PNIPAAm) Poly(éthylèneimine)s (PEI) Polymères Dendritiques  Polymères biodégradables and bio-absorbables <ul style="list-style-type: none"> <li>— Poly(lactic-co-glycolic acid) PLGA</li> <li>— Poly(lactic acid) PLA</li> <li>— Poly(glycolic acid) PGA</li> <li>— Poly(ortho esters) (POE)</li> <li>— Poly(anhydrides)</li> <li>— Poly(amides)</li> <li>— Poly(ester amides)</li> <li>— Poly(phosphoesters)</li> <li>— Poly(alkyl cyanoacrylates) PACA</li> </ul>

Fig. 2. Présentation des différents polymères décrits dans les DDS (adapté de Sung & Kim 2020<sup>[3]</sup>)

Le (PNIPAm) est un polymère modèle pour ses propriétés thermosensibles en tant que polymère intelligent "smart polymer". Il possède des propriétés tout à fait uniques en solution aqueuse et ces dernières sont représentées par son diagramme de phase et sa Lower Critical Solution Temperature (LCST) décrite depuis 1968 par Heskins et Guillet<sup>[5]</sup> (Fig. 3). Au-dessus de cette température critique, les chaînes polymériques du PNIPAm transitionnent d'un état de pelote vers une configuration plus hydrophobe. Ceci entraîne la rétraction des chaînes polymériques sous forme de globule et deux phases apparaissent<sup>[6,7]</sup>. Cette propriété est d'autant plus intéressante puisqu'elle est/compte tenu qu'elle soit proche de celle du corps humain (LCST = 32°C)<sup>[8]</sup>.

Les travaux présentés dans cet article montrent la première phase du projet de thèse, en co-direction entre deux laboratoires à l'EBI et l'ENSAM, qui consiste à étudier le comportement thermosensible d'un polymère modèle, le PNIPAm de forme linéaire. De plus, pour vérifier la stabilité de ce matériau dans le temps, des vieillissements thermo-oxydantifs accélérés ont été réalisés. Puis dans un second temps, un gel de PNIPAm est synthétisé, par voie radicalaire, et sa capacité à encapsuler un API est étudiée complétée par les caractérisations physico-chimiques.

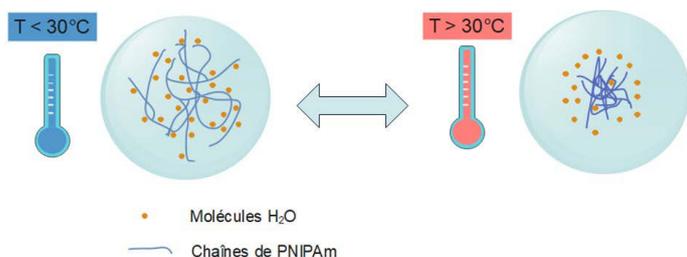


Fig. 3. Présentation de la transition de phase du PNIPAm

## 1. Matériels et Méthodes

### 1.1 Matériaux

#### PNIPAm Linéaire

Le modèle de polymère linéaire utilisé dans cette étude est un Poly(N-isopropylacrylamide) (CAS : 25189-55-3, Sigma-Aldrich) ayant une masse molaire (donnée fournisseur) en nombre  $M_n = 40\,000\text{ g.mol}^{-1}$ .

#### Synthèse de l'hydrogel de PNIPAm

La synthèse de l'hydrogel de PNIPAm a été adaptée selon le protocole décrit par Lapointe<sup>[9]</sup>. Le monomère, N-isopropylacrylamide (NIPAm) (CAS : 2210-25-5, Thermo Scientific) est recrystallisé dans de l'éther diéthylique (CAS : 60-29-7, VWR Chemicals). Puis une polymérisation radicalaire en milieu aqueux est effectuée. Pour résumer, 0,8 g de NIPAm, le monomère, 0,012 g de N, N'-méthylènebisacrylamide (BIS), l'agent réticulant (CAS : 110-26-9, Sigma-Aldrich) et 0,0085 g de tétraméthyléthylènediamine (TEMED), jouant le rôle d'agent réducteur, accélérateur de la réaction rédox, (CAS : 110<sup>-1</sup>8-9, VWR Chemicals) sont

homogénéisés dans 10 mL d'eau déionisée (EDI). Ensuite, 340 µL d'une solution de persulfate d'ammonium (APS) (CAS : 7727-54-0, ACROS ORGANICS) (10% wt) est ajouté pour initier la réaction rédox<sup>[9]</sup>. Les solutions sont initialement mises sous flux d'azote pendant 1 heure et la synthèse est scellée pendant 24 heures à température ambiante (20°C). À la suite de la synthèse, un nettoyage de 7 jours en immersion dans de l'EDI est effectué.

### 2.2 Caractérisation de la stabilité du polymère

Pour étudier le comportement thermosensible du PNIPAm linéaire et sa stabilité, une méthode reposant sur des mesures par spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis) est appliquée. La démarche consiste à resolubiliser le polymère dans de l'EDI, avant et après vieillissement à 120°C (en étuve ventilée), à 1 % de concentration spécifique et 10 % en poids. Puis, chaque échantillon est analysé par UV-Vis à une longueur d'onde de 651 nm avec une rampe de chauffe de 0,3 °C.min<sup>-1</sup> entre 20°C et 40°C pour caractériser la température de transition de phase.

Pour étudier la stabilité chimique des fonctions chimiques du polymère au cours du vieillissement thermique, une analyse par spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) par réflectance Totale Atténuée (ATR) est réalisée en mode transmission. L'analyse par IRTF est effectuée entre les nombres d'onde allant de 650 à 4000 cm<sup>-1</sup>, avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup>, et un total de 32 enregistrements.

Pour étudier les variations de masses molaires au cours du vieillissement thermique, des analyses par chromatographie à perméation de gel (GPC) sont effectuées. Les colonnes de séparation utilisées T3000 et T6000 permettent d'analyser une gamme de 10 000 à 20 000 000 g.mol<sup>-1</sup> et utilisant le tétrahydrofurane (THF) comme phase mobile. La courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide de 5 échantillons standards de poly (méthyl méthacrylate) (PMMA) ( $M_w = 4,7.10^3 - 137.0.10^3\text{ g.mol}^{-1}$ ). Les poudres de polymère (2,0 mg.mL<sup>-1</sup>) sont analysées à 35°C avec un débit de la phase mobile de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

Caractérisation de la synthèse d'hydrogel et de la capacité r d'adsorption et de désorption

Afin de vérifier la conformité du polymère synthétisé, une des caractérisations consiste en une analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF-ATR).

Pour étudier la capacité du gel de PNIPAm à encapsuler l'API, le protocole suivant a été mis en place : Des solutions aqueuses de métronidazole (MTZ), à différentes concentrations (0,01, 0,5 et 2 mg.mL<sup>-1</sup>) sont préparées. Puis 0,04 g de gel séché est déposé dans 20 mL de la solution à 20°C (réalisé en triplicata). L'absorbance est suivie en mesurant  $\lambda_{\text{max}} = 317\text{ nm}$  du MTZ dans l'EDI par Spectroscopie UV-Vis pour différents intervalles de temps (30min, 1h, 2h, 3h, 5h et 24h).

Une courbe d'étalonnage est préalablement constituée à partir de solutions de MTZ de concentration allant de 2 µg.mL<sup>-1</sup> à 10 µg.mL<sup>-1</sup>. La saturation de la mesure UV apparaît pour 25 µg.mL<sup>-1</sup>. Ainsi, pour réaliser le suivi de l'encapsulation, il est nécessaire de se positionner en dessous de cette concentration.

Le calcul de la quantité de MTZ adsorbé par masse de PNIPAm est obtenu selon l'équation (1).

→

$$Q_t = \frac{C_0 - C_t}{m} \times V \quad (1)$$

Avec  $C_0$  (mg. mL<sup>-1</sup>) la concentration initiale,  $C_t$  (mg. mL<sup>-1</sup>) la concentration à l'instant  $t$ ,  $m$  la masse du support (g) et  $V$  le volume de solution (mL).

Le calcul du pourcentage de MTZ adsorbé est obtenu selon l'équation<sup>(2)</sup>

$$\% \text{ de MTZ adsorbé} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

## 2. Résultats

### 2.1 Propriétés thermosensibles et stabilité du support polymérique

Le PNIPAm linéaire étudié possède un diagramme de phase représenté par les carrés (Fig. 4a). En dessous des températures de turbidités ( $T_c$ ), les solutions de PNIPAm sont homogènes et une phase unique est observée. Les fonctions amides, présentes sur la chaîne latérale, sont liées par des liaisons hydrogène à l'eau, le polymère est totalement soluble. Lorsque la température est augmentée au-delà de la  $T_c$ , la rupture des liaisons hydrogène provoque un réarrangement des chaînes du polymère : une rétractation s'observe sous forme de globule et ensuite une démixtion de phase (Fig. 3). Le critère de démixtion correspond ici à une perte de 50 % de transmittance. Pour des solutions très faiblement concentrées en PNIPAm, les  $T_c$  sont élevées. Ces dernières diminuent cependant très rapidement lorsque la teneur en PNIPAm augmente, jusqu'à atteindre un plateau autour 25°C correspondant à la LCST à 50 % en poids de PNIPAm<sup>[8]</sup>.

A la suite du vieillissement thermique du PNIPAm linéaire, il est observé une augmentation de la  $T_c$  pour une même concentration. Par exemple, pour une solution à 10 % en poids, un écart de 2,8°C est relevé après 90 jours de vieillissement à une température de 120°C (Fig. 4b). Plus le vieillissement est sévère, que ce soit en termes de température ou bien de durée, plus l'écart de  $T_c$  est significatif. Une telle variation provient très certainement d'une modification au niveau des chaînes polymériques qui interagissent avec l'eau différemment une fois le vieillissement thermique effectué. Des caractérisations structurales sont ainsi effectuées afin de mieux comprendre l'origine de cette modification de comportement.

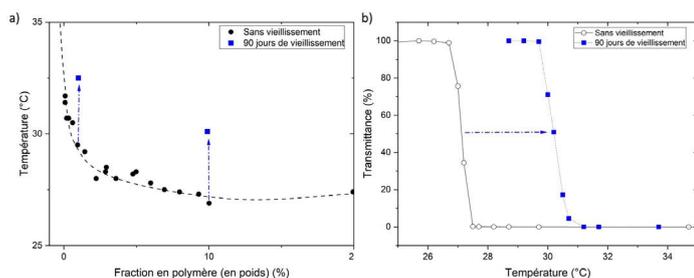


Fig. 4. a) Diagramme de phase; b) Courbes de turbidités à 10 % en poids.

Le spectre infrarouge typique du PNIPAm est décrit dans la Fig. 5a. La bande à 3289 cm<sup>-1</sup> correspond aux liaisons -OH. Les bandes à 2973, 2928 et 2872 cm<sup>-1</sup> correspondent aux liaisons -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub> et -CH<sub>2</sub> du groupement isopropyle ainsi que les bandes à 1460 et 1386 cm<sup>-1</sup>. Le groupement amide correspond aux bandes à 1633 cm<sup>-1</sup> de la liaison -C=O amide I et à 1537 cm<sup>-1</sup> de la liaison -C=O amide II.

Pour finir, la bande à 1367 cm<sup>-1</sup> est propre à la chaîne primaire du squelette carboné du PNIPAm. Après un vieillissement thermique de 90 jours à 120°C, aucune modification chimique n'est observée sur le spectre. Ces résultats indiqueraient que la structure chimique du polymère reste stable et ne serait pas responsable de l'augmentation des  $T_c$ .

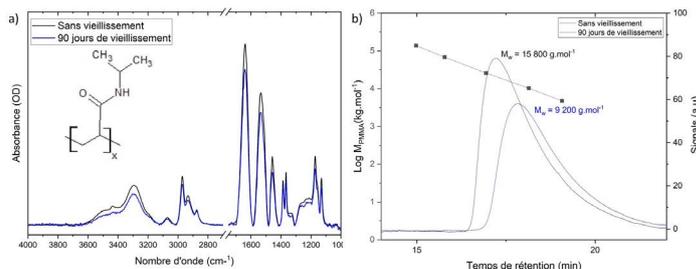


Fig. 5. a) Comparaison des spectres infrarouges avant et après un vieillissement à 120°C; b) Pics de rétention avant et après un vieillissement à 120°C

L'analyse par GPC (Fig. 5b) permet d'estimer la masse molaire du polymère vieilli. Après vieillissement thermique, un pic de rétention du polymère se trouve légèrement déplacé vers un temps de rétention plus long. Ceci démontre que la taille des chaînes du polymère deviennent plus courtes, à la suite du vieillissement thermique. Ce raccourcissement peut s'expliquer par des phénomènes de coupure de chaîne sous l'effet d'un vieillissement thermo-oxydatif. La taille des chaînes polymériques du PNIPAm impacte fortement les  $T_c$  tels que décrits par Furryk et al.<sup>[7]</sup>. Plus les masses molaires du PNIPAm sont courtes, plus les  $T_c$  sont élevées, ceci concorde avec les résultats obtenus.

### 2.2 Caractérisation initiale des gels polymériques

À la suite de la polymérisation et au lavage, un séchage sous étuve à 40°C est réalisé et la conformité de l'hydrogel est analysée (Fig. 6). Le spectre IR du gel synthétisé présente exactement la même structure que le PNIPAm linéaire commercial. Les liaisons correspondantes aux groupements amides, isopropyle et la chaîne carbonée sont bien présentes.

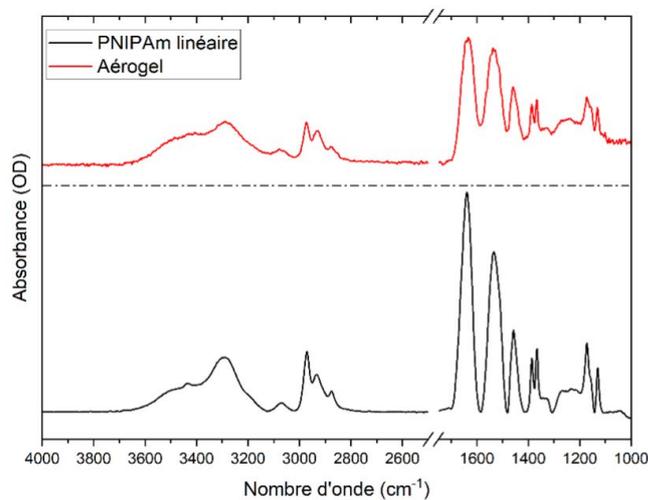


Fig. 6. Spectre Infrarouge du PNIPAm synthétisé vs. PNIPAm linéaire

### 3. Étude d'adsorption/désorption du MTZ

Après séchage, des aérogels sont obtenus et l'adsorption de MTZ a pu être effectuée par mise en contact du support avec une solution de MTZ. Une adsorption maximale de 40 % avec 468 mg.g<sup>-1</sup> de MTZ/g de gel sec est obtenue pour une concentration initiale de 2 mg. mL<sup>-1</sup> et un temps de contact de 3 heures.

Après traitement des résultats plusieurs phénomènes peuvent être relevés. Tout d'abord, plus la concentration initiale en MTZ est importante plus la quantité adsorbée par le support est forte. La seconde observation est que l'état d'équilibre atteint après 24 heures n'offre pas l'adsorption la plus optimale qui retourne à 0 %. Après 3 heures de mise en contact une désorption en MTZ apparaît.

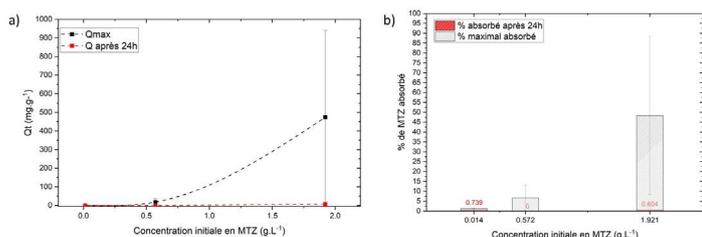


Fig. 7. Analyse de l'adsorption du MTZ encapsulé dans du PNIPAm linéaire

La phase de désorption est aussi relevée pour d'autres molécules actives et apparait entre 1 et 3 heures de mise en contact. Les interactions entre l'EDI et le gel, plutôt hydrophile, sont très favorables, au détriment des interactions API-support, d'où l'importance du choix du solvant lors de l'adsorption. Le solvant le plus adéquat pour le couple API-PNIPAm est sélectionné. Par ailleurs, d'autres observations ont été réalisées en fonction du nombre de groupements donneurs d'H de l'API, de son logP et son poids moléculaire.

Enfin, les évaluations en termes de stabilité et toxicité seront effectuées selon le guide International Conference on Harmonisation (ICH) Q8 (R2)<sup>[10]</sup>.

### 3. Conclusion

La stabilité thermo-chimique du PNIPAm a été étudiée. Le vieillissement thermo-oxydatif accéléré effectué ne provoque aucune modification chimique et impose un mécanisme assez lent de coupure de chaîne. La conséquence principale est une légère modification du comportement thermosensible. Ce polymère est donc stable chimiquement pour être appliqué dans la formulation pharmaceutique. Par ailleurs, l'adsorption est réalisée sur un réseau de PNIPAm sous forme d'hydrogel, ou forme réticulée qui est encore plus stable que le modèle linéaire. Par conséquent, ces résultats confirment que la propriété thermosensible sera maintenue stable 12 mois à minima à 120°C et ainsi d'une durée plus importante à température ambiante, selon les conditions de formulation et de stockage du matériau. Une mise en contact avec un antibiotique, le MTZ, a été effectuée et celui-ci intègre facilement le réseau de PNIPAm mais ne s'y lie pas, les molécules d'eau possédant une plus grande affinité avec le gel de PNIPAm. Il est donc projeté par la suite d'étudier des protéines qui sont capables de s'intégrer davantage dans le réseau en phase avec le développement de médicaments issus de la biotechnologie.

Les propriétés d'adsorption, désorption et modélisation seront poursuivies dans le cadre du projet de thèse : <https://www.theses.fr/s353389>

\*Camille Mathieu est lauréate du prix de financement de sa thèse à 50% par le concours de l'Ecole Doctorale ED432 <https://edsmi.hesam.eu/et> à 50% par le Fonds Social de l'EBI <https://www.helloasso.com/associations/ecole-de-biologie-industrielle/collectes/lancement-de-la-fondation-ebi>

### Références

1. Pharmaceutical Drug Delivery Market by Route of Administration (Oral, Injectors, Implantable, Syrups, Gels, Pulmonary, Solutions, Tablets, Syringes), Application (Cancer, Diabetes), Facility of Use (Hospitals), COVID-19 Impact - Forecast to 2026; MarketsandMarkets, 2021.
2. Vargason, A. M., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2021). The evolution of commercial drug delivery technologies. *Nature biomedical engineering*, 5(9), 951-967.
3. Sung, Y. K., & Kim, S. W. (2020). Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomaterials Research*, 24(1), 1-12.
4. Zhou, W., Lei, S., Liu, M., Li, D., Huang, Y., Hu, X., Yang, J., Li, J., Fu, M., Zhang, M., Wang, F., Li, J., Men, K. & Wang, W. (2022). Injectable and photocurable CAR-T cell formulation enhances the anti-tumor activity to melanoma in mice. *Biomaterials*, 291, 121872.
5. Heskins, M., & Guillet, J. E. (1968). Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide). *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry*, 2(8), 1441-1455.
6. Tamai, Y., Tanaka, H., & Nakanishi, K. (1996). Molecular dynamics study of polymer-water interaction in hydrogels. 2. Hydrogen-bond dynamics. *Macromolecules*, 29(21), 6761-6769.
7. Furryk, S., Zhang, Y., Ortiz-Acosta, D., Cremer, P. S., & Bergbreiter, D. E. (2006). Effects of end group polarity and molecular weight on the lower critical solution temperature of poly(N-isopropylacrylamide). *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 44(4), 1492-1501.
8. Halperin, A., Kröger, M., & Winnik, F. M. (2015). Poly(N-isopropylacrylamide) Phase Diagrams: Fifty Years of Research. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(51), 15342-15367.
9. Lapointe, J. (2012). Fabrication et caractérisation d'hydrogels thermosensibles pour des applications de livraison ciblée de médicament et d'embolisation. Ecole polytechnique de Montréal.
10. International Conference on Harmonisation (ICH) of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (Pharmaceutical development Q8 (R2) [https://database.ich.org/sites/default/files/Q8\\_R2\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf)

### Glossaire & Abréviations

API	Active Pharmaceutical Ingredient
APS	Ammonium Persulfate
ATR	Attenuated Total Reflectance
BIS	N, N' - méthylènebisacrylamide
CAR-T cells	Chimeric Antigen receptor (CAR) inserted into the T cells
DDS	Drug Delivery Systems
EDI	Eau Déionisée
GPC	Gel Permeation Chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation
IRTF	InfraRouge à Transformée de Fourier
LCST	Lower Critical Solution Temperature
MTZ	Métronidazole
NIPAm	N-isopropylacrylamide
PLA	PolyLactic Acid
PLGA	Poly-Lactic-co-Glycolic Acid
PMMA	Poly (MéthylMéthAcrylate)
PNIPAm	Poly(N-isopropylacrylamide)
Tc	Température critique de transition de phase
TEMED	N, N, N', N'-TétraMéthylEthylèneDiamine
THF	TétraHydroFurane
UV-Vis	Spectroscopie Ultraviolet-Visible