

Microencapsulation de protéines dans des systèmes polymériques par des procédés sans solvants toxiques, en particulier la technologie des fluides supercritiques

Mykien Tran

▶ **To cite this version:**

Mykien Tran. Microencapsulation de protéines dans des systèmes polymériques par des procédés sans solvants toxiques, en particulier la technologie des fluides supercritiques. Pharmacologie. Université d'Angers, 2013. Français. NNT : . tel-00952800

HAL Id: tel-00952800

https://theses.hal.science/tel-00952800

Submitted on 27 Feb 2014

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

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

l'université nantes angers le mans
PÔLE DE RECHERCHE ET D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

université angers

Thèse de Doctorat

My-Kien Tran

Mémoire présenté en vue de l'obtention
du grade de Docteur de l'Université d'Angers
Sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans

Discipline : *Sciences Pharmaceutiques*
Spécialité : Pharmacologie expérimentale
Laboratoire : INSERM U1066

Soutenue le 08 juillet 2013

École doctorale : ED 502 Biologie-Santé
Thèse N° 1295

Microencapsulation de protéines dans des systèmes polymériques par des procédés sans solvants toxiques, en particulier la technologie des fluides supercritiques.

JURY

Rapporteurs :	**M.** ***Hamid Elaissari, Directeur de Recherches CNRS, Université de Lyon*** *1*
	Mme. ***Elisabeth Rodier, HDR, Maître Assistante à l'Ecole des Mines d'Albi-Carmaux***
Examinateurs :	**M.** ***Frantz Deschamps, Président chez Stanipharm***
	M. ***Igor Chourpa, Professeur à l'Université François-Rabelais de Tours***
Directeur de Thèse :	**M.** ***Frank Boury, Professeur à l'Université d'Angers***

Je souhaite remercier vivement,

Monsieur Jean-Pierre Benoît, Professeur à l'Université d'Angers et directeur de l'Unité INSERM U1066, de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire.

Monsieur Hamid Elaissari, Directeur de Recherches CNRS au sein de l'unité UMR 5007 à Lyon et Madame Elisabeth Rodier, Maître-Assistante à l'Ecole des Mines d'Albi- Carmaux de me faire l'honneur de participer à ce jury et pour avoir accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail de thèse en qualité de rapporteur.

Monsieur Frantz Deschamps, Président chez Stanipharm, et Monsieur Igor Chourpa, Professeur à l'Université François-Rabelais de Tours, de me faire l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examinateurs.

Je tiens à remercier Monsieur Frank Boury, Professeur à l'université d'Angers et directeur de ce travail de thèse. Je te remercie profondément pour tes précieux conseils, ta confiance, ta générosité, ta compréhension, ta patience et tes encouragements au bon moment que tu m'as accordés au cours de ces trois années de thèse. Les mots me manquent pour exprimer ma reconnaissance!

Ministère de l'Education Nationale et Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur pour les aides financières octroyées.

Je tiens à remercier également:

Monsieur Brice Calvignac, Maître de Conférence à l'Université d'Angers. Je te remercie de m'avoir transmis tes expériences concernant les mesures d'équilibre de phase. Je suis content de savoir que tu restes définitivement à Angers.

Madame Sonia Georgeault, Monsieur Roldophe Perrot et Monsieur Romain Mallet , membres du Service Commun d'Imagerie et de Microsopie de l'Université d'Angers pour vos aides lors des manipulations en microscopie électronique à balayage et microscopie confocale, et aussi pour votre sympathie et votre disponibilité tout au long de ces trois années de thèse.

Monsieur Roger Phan-Tan-Luu, Professeur à l'Université Paul-Cézanne de Marseille et Monsieur Mark J. Anderson, Manager général chez Stat-Ease, Inc. pour nos discussions au sujet de la construction de plan d'expériences et du traitement des données.

Monsieur Gary Lynn, Vice-président chez Neurodimension, Inc. pour nos discussions sur la modélisation mathématique en utilisant la technique de réseaux de neurones.

Monsieur Phil Collier, ingénieur chez Aspen Technology, Inc. pour nos échanges sur la technique de régression en utilisant le logiciel Aspen Plus®.

Professeurs Marie-Claire Venier, Brigitte Pech, Frédéric Lagarce, Catherine Passirani, Patrick Saulnier avec qui j'ai partagé mes premières expériences d'enseignement. Merci encore pour votre soutien et votre sympathie.

Un grand merci aussi à:

Professeur Thanh-Xuan Do qui m'a encouragé à faire mes études post-universitaires en France et qui m'a aidé à trouver la bourse pour mon Master 2. Je te souhaite plein de santé et on se verra au Vietnam.

Amin Swed et Kim-Ngan Dang, mes stagiaires avec qui j'ai partagé le plus de temps au laboratoire. Merci de m'avoir fait confiance et je sais que "c'est dur le travail!", merci encore pour votre aide et pour votre bon humeur. Ngan, je sais que tu as trouvé un bon boulot au Vietnam, je te souhaite beaucoup de réussite. Amin, je sais que "c'est pas facile la vie!", je te souhaite de tout mon cœur beaucoup de courage...

Leila N. Hassani, ma collègue au labo CO_2. Tu as su apporter une note de gaité à l'ambiance du labo. J'espère que tu vas finir en beauté ta thèse. J'oublie jamais "les soirées des étrangers" avec toi et Amin...

Anna Cieślak, mon amie polonaise. On a passé pas mal de week-end ensemble et on a parlé de tout et de rien. Je suis content de savoir que t'as trouvé la bourse pour ta thèse. Bonne continuation et restons en contact.

Maud Gonnet, mon ex-collègue de bureau à l'IBT. Merci pour ta gentillesse et tes encouragements...

Stéphanie David avec qui je partage mes expériences d'enseignement et les formations de moniteur. Toujours positive et efficace, je te souhaite plein de succès!

Je voudrais également remercier mes autres collègues et l'ensemble du personnel du laboratoire INSERM U1066 pour leur gentillesse et pour la bonne ambiance au labo: Nathalie Faisant, Emmanuel Garcion, Claudia Montero-Menei, Jean-Luc Courthaudon, François Hindré, Laurence Sindji, Anne Clavreul, Olivier Thomas, Edith Greleau, Nolwenn Lautram, Nathalie Juhel, Jerôme Bejeau, Guillaume Bastiat, Marie Morille, Thomas Beuvier, Gaëtan Delcroix, Elodie Moysan, Anne-Laure Lainé, Jean-Pierre Karam, Nicolas Daviaud, Audrey Griveau, Anne-Claire Groo, Fabien Violet, Tram Pham, Thanh Tran...

Enfin, j'adresse des remerciements à ma famille et ma femme pour leur amour infini et leur soutien inconditionnel. Grâce à eux, j'ai pu vivre trois années intenses pleines d'évènements, d'émotions et de bonheur!!!

TABLES DES MATIERES

I INTRODUCTION GENERALE 6
I.1 Introduction à l'encapsulation des protéines et peptides 7
I.2 Objectif de la thèse 11
II ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 14
II.1 Drug Delivery Systems 15
II.1.1 Les systèmes conjugués 15
II.1.1.1 L'influence de PEG sur la clairance rénale.....15
II.1.1.2 Influence de pégylation sur la biodistribution.....16
II.1.1.3 Protéines pégylées sur le marché 17
II.1.2 Systèmes à base de lipide 18
II.1.2.1 Liposomes 18
II.1.2.2 Technologie DepoFoam® (SkyePharma, London, UK).....20
II.1.3 Hydrogels: (Polymeric drug delivery systems).....21
II.1.3.1 Hydrogels de Dextran comme système à libération contrôlé de protéine.....22
II.1.3.2 Hydrogels thermosensibles 25
II.1.4 Systèmes matrices polymériques 28
II.1.4.1 Systèmes de matrice polymériques non dégradable 28
II.1.4.2 Systèmes de délivrance osmotiques 30
II.1.4.3 Systèmes de matrice polymériques dégradable 33
II.1.4.3.1 Technologie Atrigel (Atrix Laboratories, Colorado, USA 33
II.1.4.3.2 Technologie Alzamer® Depot (Alza Corporation, California, USA) 34
II.1.4.3.3 Technologie Prolease® (Alkermes, Massachusett, USA) 35
II.1.4.3.4 Lupron® Depot 36
II.1.4.3.5 Technologie Saber® (Sounthern Biosystems, Alabama, USA) 37
II.1.5 Comparaisons et analyse critique des systèmes de délivrance.....39
II.1.6 Paramètres physico-chimiques importants à prendre en compte dans les procédés 41
II.1.6.1 Séparation de phase 41
II.1.6.2 Emulsification/extraction 42
II.2 Solvants injectables 45
II.3 Formulation de particules polymériques à l'aide des fluides pressurisés 51
II.3.1 Rappels sur le fluide CO_2 supercritique 51

II.3.2 Procédés de génération de particules....52
II.3.2.1 Rapid expansion of supercritical solution (RESS)....52
II.3.2.2 Procédé d'anti-solvant 55
II.3.2.3 PGSS (Particles from Gas Saturated Solution) :....58
II.3.2.4 Remarques concernant les procédés de génération des particules de PLA, PLGA utilisant le fluide CO_2 pressurisé 60
III PRINCIPES DE METHODOLOGIE 62
III.1 Mesures d'équilibre de phase 63
III.1.1 Méthodes de mesures d'équilibres de phase 63
III.1.1.1 1.3.1.1 Méthodes synthétiques....63
III.1.1.2 Méthodes analytiques....64
III.1.2 Corrélation des données dans une situation d'équilibre vapeur-liquide en utilisant une équation d'état 64
III.2 Méthodologie du plan d'expérience 68
III.2.1 Introduction 68
III.2.2 Critères pour la construction d'une matrice d'expériences dans un domaine d'étude préalablement fixé 72
IV TRAVAIL EXPERIMENTAL 93
IV.1 CHAPITRE 1: Encapsulation du lysozyme dans des particules de PLGA et $CaCO_3$ en milieu CO_2 supercritique 94
IV.2 CHAPITRE 2: Encapsulation de protéines dans des particules de PLGA préparées en milieu CO_2 pressurisé en utilisant des solvants non-toxiques: formulation et comparaisons avec la méthode de séparation de phase....125
IV.3 CHAPITRE 3: Préparation de particules de PLGA en milieu CO_2 pressurisé en vue de l'encapsulation des protéines: discussions du mécanisme de formation de particules 156
V DISCUSSION GENERALE....187
VI CONCLUSION & PERSPECTIVES 203
VI.1 CONCLUSION : 204
VI.2 PERSPECTIVES 205
VII ANNEXES....207

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Marché global des protéines et peptides thérapeutiques.....7
Figure 2: Structure des liposomes 19
Figure 3: Structure typique d'une particule de la technologie DepoFoam® 21
Figure 4: Structure du dextrane-methacrylate (A) ; (B) dextrane- hydroxyl-ethyl-methacrylate (dex-HEMA) et (C) dextrane-lactate-hydroxyl-ethyl-methacrylate (dex-lac-HEMA) 22
Figure 5: Profils de libération d'IgG au cours du temps à partir de différentes formulations d'hydrogels de dex-lactate-HEMA contenant différentes teneurs d'eau: 90% (A), 80% (B), and 70 % (C).....23
Figure 6: Procédé de formulation de particules d'hydrogel 24
Figure 7: Profil de libération d'IgG à partir de particule dex-HEMA comportant différents dégrées de substitution (DS) :DS 3 (□) ; DS 6 (○) ; DS 8 (△) ; DS 11 (▽) 24
Figure 8: Hydrogel formé par stéréocomplexation. L'hydrogel est simplement obtenu après un mélange des solutés du dex- (l) - lactate (oligomère acide l-lactique greffé au dextrane) et du dex- (d) - lactate 25
Figure 9: Diagramme de phase de la solution aqueuse Regel® 26
Figure 10: Profils de liberation de l'insuline à partir de lots de microparticules d'hydrogel et de microparticules préparées par la méthode d'émulsification/extraction de solvant 27
Figure 11: Profil de libération de ferritine à partir de matrices d'EVAc en fonction du temps (a) et racine carré du temps (b) [taux d'encapsulation 35% (●), 50% (♦)] (selon la référence [85]) 29
Figure 12: Vue schématique d'une matrice de polymère EVAc chargé en protéine. (a) Vue en coupe des matrices avec deux taux d'encapsulation différents. À des taux élevés, des pores sont reliés, fournissant les chemins continus pour la diffusion de protéine à la surface. (b) Des pores typiques dans la matrice sont agrandis. Les grands pores (diamètres de 100-400 μm) sont reliés par de plus petits canaux (diamètres de 1-10 μm).....30
Figure 13: Implant osmotique DUROS® 31
Figure 14: Profil de libération *in vitro* de leuprolide et étude de sa stabilité pendant un an 32
Figure 15: Concentration de leuprolide libéré et de testosterone dans le sang après 2 cycles d'injection d'Eligard-à 0 et 6 mois 34
Figure 16: Concentration plasmatique de hGH après une injection montrant l'influence de la nature du solvant sur le profil de libération 35
Figure 17: Procédé d'encapsulation de la technologie Prolease®.....35
Figure 18: Procédé de formulation du système Lupron Depot® 37
Figure 19: Structure du sucrose acetate isobutyrate 38
Figure 20: Schéma des interactions entre les différents composants lors d'un procédé basé sur la séparation de phase 42
Figure 21: Etape d'émulsification dans la méthode d'émulsification/extraction 44
Figure 22: Schéma de procédé RESS 54
Figure 23: Schéma de procédé SAS 56

Figure 24: Diagramme P-T du système polyethylèneglycol-CO_2 . De 1 à 10 bar, la diminution de la température de liquéfaction n'a pas été observé (dP/dT>0). Au delà de 10 bar, la température de transition diminuait avec l'augmentation de la pression (dP/dT<0).....59
Figure 25: Schéma du procédé PGSS 60
Figure 26: Image des particules de PLGA ou PLA chargés de protéine préparées en milieu CO_2 pressurisé. (A): par le procédé SAS, taille des particules de 5-60µm;(B): par le procédé SAS, la taille moyenne des particules d'environ 600 nm ; (C): par le procédé PGSS, taille moyenne des particules d'environ 150 µm. 61
Figure 27: Procédure de calcul de l'équilibre liquide-vapeur dans la condition isothermique en utilisant une équation d'état. 67
Figure 28: Exemple d'une étude sur l'interaction des facteurs. 70
Figure 29: Exemple d'une étude utilisant la méthodologie de surfaces de réponses. La figure montre la relation entre les facteurs influents et la réponse étudiée - le rendement d'encapsulation de HSA dans des particules de PLGA 71
Figure V. 1: Particules de PLGA préparées par séparation de phase en utilisant un mélange DMI : GF (1 : 1) (la barre = 1 µm). La concentration de la solution de polymère est 7.5%. 190
Figure V. 2: Comparaison de la solubilité du CO_2 dans le DMI et dans le GF en fonction de la pression à 313.15 °K. 190
Figure V. 3: Expansion volumique du glycofurol et du DMI en milieu CO_2 pressurisé. 191
Figure V. 4: Equilibre liquide-vapeur des mélanges binaires: tétrahydrofurane-CO_2 (A) et méthoxy-éthanol-CO_2 (B) 191
Figure V.5: Liaison hydrogène possible dans le cas du glycofurol.....193
Figure V.6: Formes galéniques visées concernant les particules de PLGA chargées de protéine 198

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Exemples d'anticorps présents sur le marché.....9
Tableau 2: Exemples de systèmes à libération prolongée de protéine présents sur le marché. 10
Tableau 3: Protéines pégylées approuvées par FDA pour des applications thérapeutiques chez l'homme. 11
Tableau 4: Comparaisons des inconvénients des systèmes de délivrance.....39
Tableau 5: Classification de quelques solvants organiques selon la Pharmacopée européenne....46
Tableau 6: Paramètres physicochimiques de quelques solvants injectables. 46
Tableau 7: Comparaison de la toxicité cardiovasculaire de solvants organiques miscibles avec l'eau basée sur les changements de la pression artérielle.....47
Tableau 8: Données sur la toxicité de solvants miscibles avec l'eau. 48
Tableau 9: Exemples des particules de PLA générées par le procédé RESS. 54
Tableau 10: Exemples de particules de PLA formées à l'aide du procédé anti-solvant. 56
Tableau 11: Avantages et inconvénients des procédés de génération de particules. 60
Tableau 12: Recapitulatif des examples concernant l'encapsulation de protéines en milieu CO_2 pressurisé. 61
Tableau 13: Des paramètres dans différentes équations d'état cubiques. 65
Tableau 14:Expressions de la fonction alpha utilisée dans différentes équations d'état cubiques 66
Tableau 15: Récapitulatif des facteurs 69
Tableau V. 1: Volumes libres fractionnaires (calculés en utilisant le logiciel COSMOtherm®) 192
Tableau V. 2: Probabilité des interactions moléculaires et énergies d'interactions. 193

I .INTRODUCTION GENERALE

I.1 .INTRODUCTION A L'ENCAPSULATION DES PROTEINES ET PEPTIDES

Durant ces dernières années, l'utilisation des protéines et peptides a émergé comme un nouvel outil efficace dans l'arsenal thérapeutique. Grâce aux progrès de la biotechnologie permettant la synthèse à grande échelle de peptides et la production de protéines et peptides recombinantes, de nombreuses biomolécules thérapeutiques ont été développés. Ces nouveaux médicaments représentent aujourd'hui environ 8% des spécialités et approximativement 10% de toutes les dépenses liées aux médicaments [1]. Les biomolécules sont présentes approximativement dans 32% des programmes de recherche. L'utilisation de ces molécules continue à évoluer très rapidement comme l'indique le tableau 1 relatif au marché des anticorps monoclonaux [2]. En 2013, le marché des anticorps est estimé à 36.9 milliards dollars (Figure 1) avec une croissance rapide un rôle de plus en plus important en thérapeutique. Le marché des produits biopharmaceutiques a été estimé à 79 milliards de dollars en 2007 et les perspectives de marché sont de 160.1 milliards pour l'année 2013. D'ici 2020, le marché pourrait dépasser 200 milliards dollars du fait de nouvelles applications des biomolécules thérapeutiques [1].

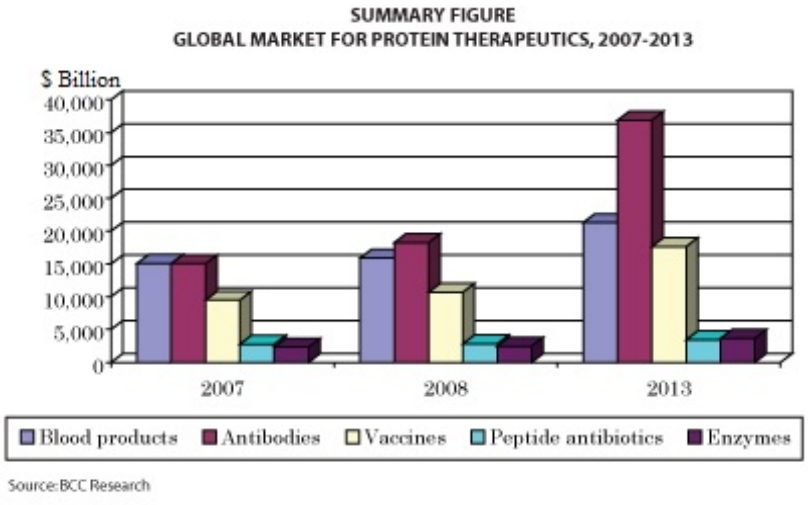


Figure 1: Marché global des protéines et peptides thérapeutiques (source: BCC research http://www.bccresearch.com /pressroom/report/code/BIO021C) .

Les protéines et peptides, deviennent de plus en plus indispensables pour le traitement de maladies graves. Cependant, ces molécules possèdent des caractéristiques bien particulières qui exigent des considérations spécifiques lors du développement pharmaceutique. En raison d'une faible biodisponibilité par voie orale due à la dégradation par le pH gastrique et par des enzymes présentes dans le tube digestif ainsi qu'une faible absorption via les barrières épithéliales, les peptides et protéines commercialisés sont généralement administrés par voie parentérale. Néanmoins, il faut aussi souligner l'existence sur le marché de quelques produits qui sont délivrés par des voies non-invasives comme la desmopressine (DDAVP®) par voie nasale [3] ou la deoxiribonucléase (Pulmozyme®) par inhalation[4]. Ces voies d'administration constitue actuellement un domaine de recherche en plein développement. Quelle que soit la voie d'administration, il faut noter que les peptides et protéines ont généralement une demi-vie plasmatique très courte, ce qui exige une administration répétée pour maintenir la concentration plasmatique des protéines ou peptides dans le fenêtre thérapeutique. Les raisons de la courte demi-vie plasmatiques des protéines et peptides sont nombreuses [5]: (1) élimination rapide par filtration rénale ; (2) dégradation enzymatique ; (3) capture par le système réticuloendothélial ; (4) faible stabilité en milieu physiologique.

Il est donc utile de développer des systèmes à libération prolongée («Drug Delivery System ») pour ces produits, ce qui permet de réguler la libération des peptides ou protéines au cours du temps et donc d'améliorer la tolérance des patients envers le traitement, de diminuer le risque de toxicité et d'augmenter l'efficacité du traitement. On trouve sur le marché quelques spécialités telles que Lupron Depot®, Sandostatin LAR®,… dont les principales sont mentionnées dans le tableau 2. Ces spécialités sont développées selon des procédés qui seront présentés dans les chapitres suivants. Par définition, un système à libération prolongée doit satisfaire aux deux conditions suivantes : (1) inclusion d'un composé qui permet de moduler les caractéristiques du système comme la vitesse de libération, la durée de libération ou la cible d'action et (2) la durée d'action qui doit être supérieure à 24 heures [6].

Tableau 1: Exemples d'anticorps présents sur le marché.

Nom commercial	Anticorps	Année de mise sur le marché	Cible	Indication
Orthoclone OKT3	Muromonab-CD3	1986	T cell CD3 Receptor	Troubles immunitaires, rejet de greffe.
ReoPro	Abciximab	1994	Glycoprotein IIb/IIIa	Maladies cardiovasculaires
Rituxan	Rituximab	1997	B-lymphocyte antigen CD20	Lymphome non-Hodgkin
Remicade	Infliximab	1998	Tumor necrosis factor (TNF)-a signaling	Troubles immunitaires
Erbitux	Cetuximab	2004	Epidermal growth factor (EGF) receptor	Cancer colorectal
Herceptin	Trastuzumab	1998	Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu)	Cancer du sein
Synagis	Palivizumab	1998	Respiratory syncytial virus (RSV) protein F	Infection de RSV virus
Mylotarg	Gemtuzumab	2000	Transmembrane receptor CD33	Leucémie aiguë
Raptiva	Efalizumab	2002	Integrin, alpha L subunit (CD11a)	Psoriasis
Xolair	Omalizumab	2004	Immunoglobulin E (IgE)	Allergie associée à l'asthme
Tysabri	Natalizumab	2006	Integrin alpha-4 (a4) subunit	Sclérose, maladie de Crohn
Lucentis	Ranibizumab	2006	Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)	Dégénérescence maculaire
Soliris	Eculizumab	2007	Complement protein C5	hémoglobinurie paroxystique nocturne

Cimzia	Certolizumab pegol	2008	Tumor necrosis factor (TNF)-a inhibitor	Maladie de Crohn
Stelara	Ustekinumab	2009	Cytokines IL-12 and IL-23	Psoriasis
Ilaris	Canakinumab	2009	Activated cytokine IL-1b (catabolin)	Maladies auto-immunes
Simponi	Golimumab	2009	Tumor necrosis factor (TNF)-a	Rhumatisme articulaire

Tableau 2: Exemples de systèmes à libération prolongée de protéine présents sur le marché.

Produit commercial	Principe actif /Matériau enrobant	Compagnie	Application
Lupron Depot	Leuprolide acetate/ PLGA	TAP	Cancer de la prostate
Nutropin Depot	rGH/ PLGA	Genentech-Alkermes	Déficit d'hormone de croissance chez l'enfant
Suprecur MP	Busereline acetate/ PLGA	Aventis	Cancer de la prostate
Decapeptyl	Triptoreline pamoate/PLGA	Ferring	Cancer de la prostate
Sandostatin LAR	Octretide acetate/ PLGA	Novartis	Acromégalie
Somatuline LA	Lanreotide/PLGA	Ipsen	Acromégalie
Trelstar Depot	Triptoreline pamoate/PLGA	Pfizer	Cancer de la prostate
Parlodel Depot	Bromocryptin mesylate/PLGA	Sandoz Pharma Ag	Acromégalie, Parkinson
Enantone LP	Leuprolide/PLGA	Takeda	Cancer de la prostate
Zoladex	Gosereline acetate/PLGA	I.C.I	Cancer de prostate

I.2 .OBJECTIF DE LA THESE

De nombreuses méthodes permettant l'encapsulation et la libération contrôlée de peptides et protéines ont été décrites dans la littérature. Parmi les plus étudiées on peut citer les systèmes conjugués, les systèmes lipidiques, les hydrogels, et les systèmes polymériques. Toutes ces formes galéniques seront présentées dans la partie « Bibliographie » pour donner une vue globale sur l'état d'art des « Drug Delivery Systems » et pour permettre de souligner les principaux avantages et inconvénients de chaque classe. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons seulement aux formes basées sur des systèmes particulaires polymériques avec pour objectif d'élaborer de nouvelles stratégies de formulation à l'aide de polymères biodégradables et biocompatibles tels que les PLGA (poly-lactique-glycolique acide) qui servent à encapsuler des protéines, dans le but de chercher une action prolongée de ces molécules.

En 1987, Sounthern Research Institute sponsorisé par Syntex était la première équipe aux Etats-Unis qui a breveté un produit à libération prolongée à la base de LHRH (Leutinizing hormone-releasing hormone) encapsulé dans des microparticules de PLGA (poly-lactique-glycolique acide) [7, 8]. En 1986, Debiopharm a introduit le premier système de délivrance sous forme de microparticules de PLGA chargées de leuproline (Decapeptyl®) en Europe et ce produit est encore présent sur le marché[8]. Depuis, différentes méthodes d'encapsulation ont été développées et améliorées par différentes équipes parmi lesquelles on peut citer les méthodes suivantes : émulsification suivie d'extraction de solvant par une phase aqueuse - eau/huile/eau (w/o/w) [9], émulsification suivie d'extraction de solvant par une phase aqueuse - solide/huile/eau (s/o/w) [10], coacervation simple[11], spray-drying et la technologie à l'aide de fluides supercritiques [12-14]. Ces techniques ont été utilisées avec plus ou moins de succès et présentent chacune leurs avantages et inconvénients. Par exemple, dans la méthode w/o/w, l'adsorption des protéines à l'interface huile/eau, entraine leur dépliement et le contact avec les solvants. Ceci a pour conséquence une perte de la structure tertiaire et donc de l'intégrité structurale, nécessaire à l'activité pharmacologique [15]. Pour atténuer ce phénomène d'adsorption et de contact avec les solvants, les méthodes s/o/w et solide/huile/huile (s/o/o) ont été développées et leur utilité a été démontrée par de nombreux de travaux [10, 16-18]. Cependant, dans la méthode s/o/o la quantité du solvant résiduel et le caractère non polaire de la phase continue sont considérés comme des inconvénients tandis que le faible taux d'encapsulation

et la diffusion des agents stabilisants dans la phase aqueuse sont des problèmes mentionnés dans la méthode s/o/w [19]. Pour la méthode par coacervation simple qui a été employée couramment pour l'encapsulation de protéine et de peptide, le problème principal est lié à la toxicité des agents de coacervation et de solidification qui restent dans le produit final avec des taux résiduels pouvant engendrer une toxicité du produit [20].

Dans les méthodes mentionnées ci-dessus, l'utilisation des solvants volatiles tels que les solvants halogénés est rarement évitée. Ces solvants sont considérés comme nocifs pour la santé humaine et pour l'environnement. Par conséquent, des techniques alternatives permettant d'éviter l'utilisation de ces solvants dans des procédés d'encapsulation doivent être développées. C'est dans cette optique de recherche que nous nous sommes intéressés dans cette thèse à l'utilisation de solvants miscibles avec l'eau qui possèdent une haute température d'ébullition et une faible toxicité. Nous cherchons à appliquer ces solvants avec de nouveaux procédés permettant de formuler des particules polymériques de PLGA. En particulier, nous nous intéressons aux procédés à l'aide du CO_2 pressurisé. Le CO_2 pressurisé, possédant des propriétés physico-chimiques fortement modulables, nous semble particulièrement utile pour le développement de nouveaux procédés de préparation de particules de PLGA.

Ce manuscrit débute par une étude bibliographique dédiée aux thèmes suivants: "Drug Delivery Systems", choix des solvants injectables, et techniques de formulation de particules polymériques à l'aide du fluide CO_2 pressurisé. Nous présenterons ensuite une partie expliquant les principes de méthodologie que nous avons utilisés comme les méthodes de mesure d'équilibre de phase, la modélisation de l'équilibre liquide-vapeur par des équations d'état, et la méthodologie des plans d'expérience. Cette partie se poursuit par le travail expérimental, constitué de trois chapitres. Dans le premier chapitre expérimental, nous présenterons un procédé de formulation de particules de PLGA basé sur la formation d'une émulsion avec le milieu CO_2 pressurisé, permettant d'encapsuler une protéine modèle. En comparant avec un procédé basé sur le phénomène de séparation de phase, nous décrirons ensuite dans le deuxième chapitre expérimental un nouveau procédé de formulation de particules de PLGA en milieu CO_2 pressurisé, permettant d'encapsuler une protéine modèle, basé sur la méthode d'émulsification-extraction. Le dernier chapitre expérimental consiste à discuter le mécanisme de formation de particules de PLGA préparées en milieu CO_2 pressurisé selon le procédé présenté dans le deuxième chapitre. Finalement, le

manuscrit se termine par une discussions générale suivie des conclusions principales et des perspectives envisagées.

II .ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 .DRUG DELIVERY SYSTEMS

Dans cette partie, différents systèmes de délivrance de drogue seront présentés et regroupés dans différentes classes selon leurs caractéristiques. Le but de cette partie n'est pas de présenter de façon exhaustive tous les systèmes de délivrance mais de montrer différents groupes de « Drug Delivery System » (DDS) en illustrant avec des exemples concrets des produits présents sur le marché ou étudiés en phase clinique. Ceci permet d'avoir une vue globale sur une large gamme de DDS et de fournir des orientations pour la formulation de ces systèmes.

II.1.1 Les systèmes conjugués

Il s'agit de systèmes dans lesquels les protéines ou peptides sont conjuguées avec une autre molécule dans le but d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. On peut citer comme exemple la « lipidization » [21] et la pégylation. Dans cette partie, seule la pégylation sera présentée en détails.

La conjugaison covalente des chaînes de poly (éthylène-glycol) (PEG) aux protéines, connue sous le nom de la pégylation, a été développée avec succès afin de moduler les propriétés *in vivo* des protéines. Cette technique permet non seulement de réduire la fréquence d'administration et d'améliorer l'efficacité mais aussi d'augmenter la stabilité et la biocompatibilité des protéines thérapeutiques dans le corps humain [22-24]. L'action prolongée obtenue dans le cas des protéines pégylées s'explique par le fait que cette transformation chimique modifie fortement les profils pharmacocinétiques des protéines en agissant sur la clairance rénale et la biodistribution.

II.1.1.1 L'influence de PEG sur la clairance rénale

La clairance rénale représente une des principales routes d'élimination des protéines de la circulation sanguine [25]. Les capillaires glomérulaires au niveau du rein sont organisés en architectures fortement structurées avec des barrières qui permettent la filtration des macromolécules hydrophiles telles que les protéines ou les polymères, et la réabsorption de ces molécules au niveau du tubule proximal. Les éléments proximaux riches en sialo-protéine chargée négativement retardent la filtration des poly-anions en circulation par effet de répulsion électrostatique. Le passage des poly-anions est également retardé au niveau de l'épithélium non-glomérulaire qui est négativement chargé [26, 27]. En convertissant la lysine et les groupes aminés terminaux des acides aminés en liaisons amides, la pégylation entraîne une perte globale

de la charge positive des protéines [22], ce qui prolonge la présence des protéines dans le corps par une diminution de la filtration rénale.

Il est également important de prendre en considération la masse molaire des protéines. Ainsi, les protéines globulaires ayant une masse molaire inférieure à 65 kDa, qui est la taille de l'albumine sérique et qui correspond au seuil de coupure de la filtration rénale, sont rapidement filtrées par le rein. Les protéines de plus grande masse molaire sont excrétées après avoir été lysées par des enzymes en des fragments plus petits. La pégylation des protéines thérapeutiques augmente donc leur taille hydrodynamique, ce qui permet de dépasser le seuil de coupure de la filtration rénale et d'augmenter le temps de séjour de ces protéines conjuguées dans la circulation sanguine [28, 29]. En général, le volume hydrodynamique et la clairance des protéines pegylées sont dictés par le poids moléculaire, la structure du PEG, et par le nombre de chaînes de polymère [30]. Un PEG de 18 kDa, ayant un volume hydrodynamique plus élevé que celui de l'albumine, est considéré comme la masse minimale permettant de réduire de manière significative la clairance rénale [27].

II.1.1.2 Influence de pégylation sur la biodistribution [27]

Après administration intraveineuse, les protéines pégylées montrent habituellement le profil pharmacocinétique d'un modèle bi-compartimental, c'est-à-dire une distribution dans les organes et les tissus périphériques. Le passage d'une protéine pégylée du sang au compartiment périphérique est dicté par les caractéristiques des barrières biologiques et par la taille et la structure moléculaire de la protéine pégylée. Le foie est impliqué dans le processus d'élimination des protéines conjuguées et ce processus est fortement influencé par la taille des protéines conjuguées. Il a été observé que les protéines pégylées subissent l'internalisation non-spécifique par les cellules de Küpffer, les hépatocytes et les cellules du système réticulo-endothéliales. Cependant, les captures via des récepteurs cellulaires spécifiques ou via la charge globale sont habituellement réduites avec la présence du polymère sur la surface de protéine[31]. La pégylation est donc considérée comme une stratégie permettant d'accroitre la furtivité des protéines et leur échappement au système réticulo-endothélial. Des études d'interaction avec l'hémoglobine ont prouvé que la pégylation empêchait l'association entre les protéines et l'haptoglobine et permettait par conséquent, d'augmenter la furtivité vis à vis du système réticulo-endothélial. Ces résultats indiquent que la présence des molécules de PEG sur la surface de protéine réduit le phénomène d'opsonisation et donc la phagocytose.

II.1.1.3 Protéines pégylées sur le marché

Durant les deux dernières décennies, la pégylation a été employée dans l'industrie et a permis la mise sur le marché de plusieurs produits (quelques exemples de ces produits sont présentés dans le Tableau 3).

L'Oncaspar®-L-asparaginase pegylé (Enzon/Rhone-Poulenc Rorer) a été approuvé par la FDA pour l'utilisation dans le traitement de leucémie lymphoblastique chez l'enfant. La pégylation permet d'une part d'augmenter la demie-vie à 357 heures par rapport à 24 heures pour la protéine native et d'autre part de diminuer fortement l'immunogénicité de la protéine [32].

D'autres produits tels que Pegintron®-Interferon-α2b pégylé (Enzon/Schering-Plough) et Pegasys®-Interferon-α2a pégylé (Nektar/Roche) ont été approuvés respectivement en 2000 et 2002 pour le traitement de l'hépatite C. Ces deux interférons ont les mêmes séquences d'acide aminé, mais ont été modifiés par différents protocoles de conjugaison. Après une administration sous-cutanée, Pegintron® a une vitesse de clairance 7 fois inférieure et une demi-vie 5 fois supérieure par rapport à l'interferon- α2b [33]. En ce qui concerne Pegasys®, la demi-vie de la protéine pégylée est augmentée de 3-8 heures à 65 heures et la clairance systémique réduite de 6.6-29.2 L/h à 0.06-0.10 L/h par rapport à la protéine non-conjugée [34, 35]. Dans les deux cas, les études cliniques ont prouvé que les deux produits pégylés ont augmenté de manière significative la réponse anti-virus et la posologie a pu être réduite ainsi à une seule administration par semaine au lieu de trois pour la protéine non conjuguée [36].

Tableau 3: Protéines pégylées approuvées par FDA pour des applications thérapeutiques chez l'homme.

Produit commercial	Principe actif	Indication	Année de mise sur le marché
Adagen®	Adenosine deaminase	Déficit immunitaire combiné sévère	1990
Oncaspar®	L-asparaginase	Leucémie	1994
Pegintron®	Interferon a-2β	Hépatite C	2000
Pegasys®	Interferon a-2α	Hépatite C	2002
Neulasta®	Granulocyte-colony stimulating factor	Neutropénie associé à chimiothérapie	2002
Somavert®	Human growth hormone antagonist	Acromégalie	2003
Mucagen®	anti-VEGF aptamer	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	2004
Mircera®	Erytropoietin-β	Anémie associée à l'insuffisance rénale	2007
Cimzia®	Anti-TNF-αFab'	Maladie de Crohn	2008

II.1.2 Systèmes à base de lipide

II.1.2.1 Liposomes

Les liposomes sont les vésicules artificielles de phospholipide capable d'encapsuler des principes actifs (Figure 2). La taille des liposomes peut varier d'environ 80 nanomètres à quelques micromètres de diamètre et dépend de la composition et de la méthode de préparation. Les vésicules multilamellaires présentent une gamme de taille allant de 500 à 5000 nanomètre et se composent de plusieurs bicouches concentriques. Les grandes vésicules unilamellaires ont un diamètre de 200 à 800 nanomètre. Les petites vésicules unilamellaires sont formées par une seule bicouche et mesurent environ 100 nanomètre [37].

Les liposomes sont très connus pour leur application dans l'encapsulation des principes actifs de faible poids moléculaire, et surtout des anti-cancéreux (ex, Daunoxome®, Myocet®, Depotcyte®,…). En dehors de ces applications, les liposomes pourraient être utilisés également comme transporteurs de protéines et peptides. Ce type de système possède de nombreux avantages tels que (1) la biocompatibilité ; (2) la biodégradabilité ; (3) la possibilité d'encapsuler à la fois des principes actifs hydrophiles (dans le cœur du système) et lipophiles (dans la bicouche

du système, voir figure 2), (4) la possibilité de libérer des principes actifs au niveau d'un site d'action ciblé.

Différentes méthodes ont été suggérées pour préparer des liposomes de différentes tailles et structures. Les méthodes les plus utilisées sont l'ultrasonication et l'évaporation en « reverse phase » [38, 39]. Pour augmenter la stabilité des liposomes dans les conditions physiologiques, du cholestérol est incorporé dans la formulation, parfois son pourcentage peut aller au total jusqu'à 50% en fraction molaire. La modification des caractéristiques physicochimiques des liposomes comme leur taille et leur propriétés de surface ainsi que leur fonctionnalisation par différentes molécules à leur surface peuvent être facilement réalisés, ce qui permet de formuler des systèmes furtifs ou de ciblage dont le séjour dans le corps humain est prolongé. [5]

Les liposomes ont été beaucoup étudiés pour l'encapsulation d'enzymes (glucose oxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, hexokinase et β-galactosidase, β-glucuronidase, glucocerebrosidase, α-mannosidase, amyloglucosidase, hexosaminidase A80, peroxidase,… [40]) Par exemple, liposome encapsulant la L-asparaginase est utilisé dans le traitement de la leucémie [41]. D'autre part, l'utilisation de liposomes pour encapsuler des anticorps spécifiques au traitement du cancer est également beaucoup étudiée [5].

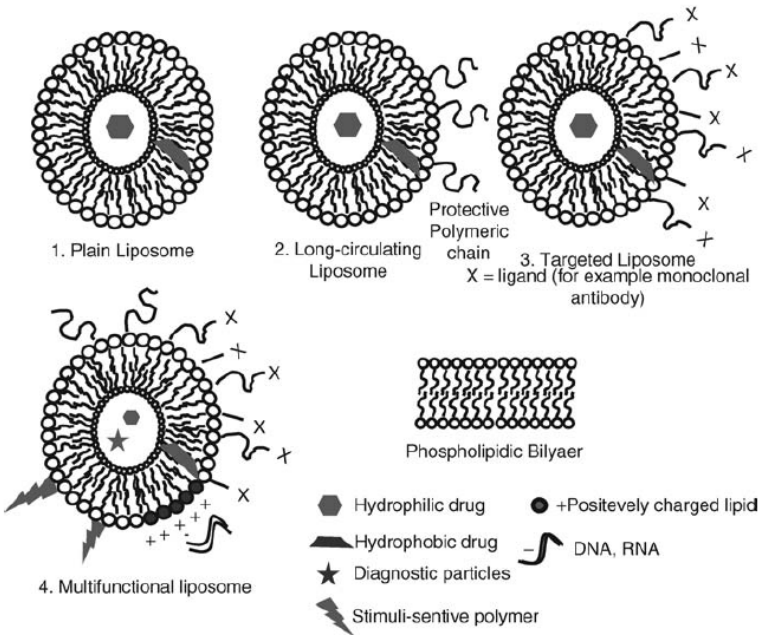


Figure 2: Structure des liposomes (d'après la référence [37]).

II.1.2.2 Technologie DepoFoam® (SkyePharma, London, UK)

Les particules de DepoFoam® contiennent des centaines de compartiments aqueux entourés par des bicouches [42]. Ces particules sont formées en émulsionnant, dans une première étape, une phase aqueuse contenant le principe actif à encapsuler avec une phase organique contenant des lipides. Cette première émulsion est alors dispersée et émulsionnée dans une deuxième phase aqueuse. Après l'évaporation du solvant, les particules de DepoFoam® sont formées avec une structure présentée sur la Figure 3 [43, 44].

Les particules de DepoFoam® ont une structure multivésiculaire. Un point intéressant de ce système est l'absence d'effet « burst» (libération précoce) au niveau du profil de libération [45]. La durée de libération peut être adaptée selon le régime thérapeutique en changeant les paramètres de formulation et la composition des particules [46-51]. Skye-Pharma a créé différentes formulations qui peuvent libérer des médicaments avec des périodes allant d'un jour jusqu'à plusieurs semaines. Puisque DepoFoam® contient seulement moins de 5% en poids de lipide, une grande quantité de principe actif peut être encapsulée sous forme de solution dans les particules. DepoFoam® se présente sous la forme d'une suspension injectable prête à l'emploi.

Les formulations de DepoFoam® peuvent être administrées par voies sous-cutanée, intra-musculaire, ou intra-péritonéale. Puisque les composants de DepoFoam® (phospholipides, cholestérol, triglycérides) sont des composants présents naturellement dans le corps humain, ce système est complètement biodégradable et biocompatible.

Ce système DepoFoam® a démontré son intérêt pour l'encapsulation de macromolécules comme par exemple l'interleukin-2, l'insuline humaine, l'encéphaline, l'octreotide, le granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, la LHRH, l'insulin-like growth facteur, l'α-interféron. Tous ces peptides ou protéines sont actuellement en développement pour la recherche d'une libération prolongée. Les études précliniques ont démontré que des injections une fois par semaine ou une fois par mois sont faisables avec ce système DepoFoam® [52].

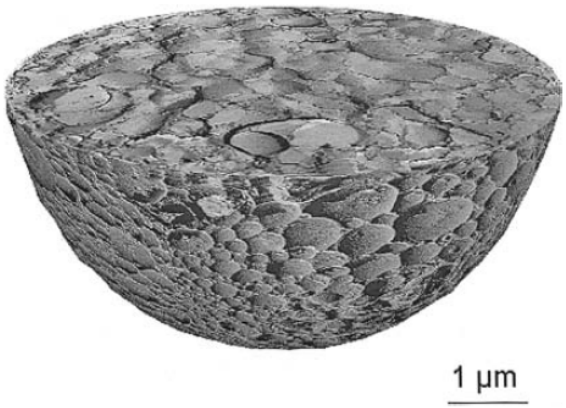


Figure 3: Structure typique d'une particule issue de la technologie DepoFoam® (selon la référence [42]).

II.1.3 Hydrogels

Les hydrogels sont des réseaux polymériques contenant une grande quantité d'eau. Dans ce réseau de polymère, les groupes ou les domaines hydrophiles sont hydratés dans un milieu aqueux, créant ainsi la structure d'hydrogel. Les hydrogels sont utilisés pour différentes applications en santé, par exemple, comme matériaux pour des lentilles de contact ou comme matrices pour l'encapsulation de cellules, de médicaments et de protéines [53-58]. Pour maintenir la structure du réseau, une étape de réticulation est nécessaire pour éviter la dissolution des segments hydrophiles ou des chaînes de polymère dans la phase aqueuse. La réticulation peut être réalisée soit par méthode chimique soit par interactions physiques [59].

Les hydrogels injectables ou implantables chargés en protéine, sont des systèmes biodégradables généralement hydrolysés dans l'organisme par l'action des enzymes dans les conditions physiologiques. Ces systèmes doivent être biocompatibles et les produits issus de leur dégradation ne doivent pas être toxiques. De part leur hydrophilie, les hydrogels présentent une faible énergie libre interfaciale avec les liquides corporels, une caractéristique qui entraîne une faible adhérence des protéines et des cellules à leur surfaces et contribue à leur biocompatibilité [60]. Dans les paragraphes qui suivent, quelques types d'hydrogel seront présentés comme exemples.

II.1.3.1 Hydrogels de Dextrane comme système à libération contrôlée de protéine [60]

De nombreux travaux mentionnent des formulations d'hydrogels à base de dextrane. Ce type de polymère présente en effet une bonne innocuité puisqu'il est utilisé en clinique comme extenseur volumique de plasma. Les gels de dextrane ont été initialement utilisés comme système de délivrance au niveau du côlon [61, 62]. En effet, la dextranase, une enzyme d'origine bactérienne présente dans le côlon humain, permet dans les conditions physiologiques l'hydrolyse de l'hydrogel. D'autres études ont été menées pour la délivrance de médicaments au niveau d'autres sites d'administration. Dans ces études, la dextranase était encapsulée dans le système d'hydrogel afin de pouvoir hydrolyser le réseau. Cependant, la dextranase est seulement efficace dans des hydrogels ayant une faible densité de réticulation [63-65]. De plus, l'utilisation de dextranase pourrait entrainer des réactions immunogènes indésirables. C'est pourquoi, la recherche est actuellement concentrée sur la dégradation non-enzymatique des hydrogels de dextrane à usage parentéral.

Dans cette optique et afin d'augmenter la sensibilité envers l'hydrolyse, différentes fonctions chimiques ont été associées aux monomères du dextrane (Figure 4) [66]. Après la polymérisation de ces dérivés, les gels peuvent être dégradés en condition physiologique. Le temps de dégradation varie d'un jour à plus de 3 mois et pourrait être modulé en changeant le type d'ester, la densité de réticulation et la longueur des unités dégradables [67, 68]. Quelle que soit la forme galénique finale, implant ou microsphère injectable, les gels montrent une bonne biocompatibilité. De plus, le temps de dégradation *in vivo* (après implantation sous-cutanée chez le rat) est proche de celui de dégradation *in vitro* [69, 70].

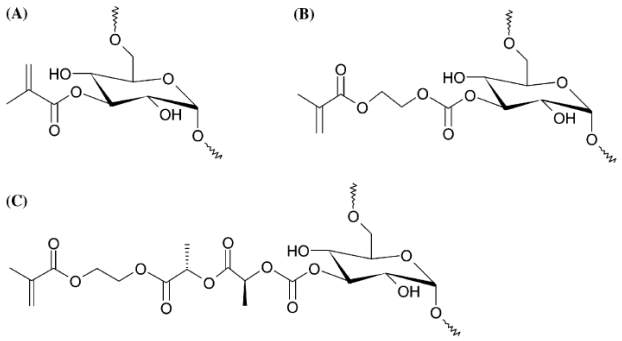


Figure 4: Structure du dextrane-methacrylate (A) ; (B) dextrane- hydroxyl-ethyl-methacrylate (dex-HEMA) et (C) dextrane-lactate-hydroxyl-ethyl-methacrylate (dex-lac-HEMA) (selon la référence [66])

Le profil de libération d'une protéine modèle [immunoglobuline G (IgG)] à partir d'un réseau d'hydrogel cylindrique (rayon 0.23 cm, longueur 1 cm) formé des monomères dex-lac-HEMA (dextrane-lactate-hydroxyl-ethyl-methacrylate) avec différentes teneurs d'eau a été étudié [67, 71]. Comme l'indique la figure 5, pour des gels avec une teneur en eau initiale élevée (80-90%), un profil de libération du premier ordre a été observé, tandis que pour des gels avec une teneur en eau initiale de 70%, un profil d' ordre zéro a été observé pendant 35 jours.

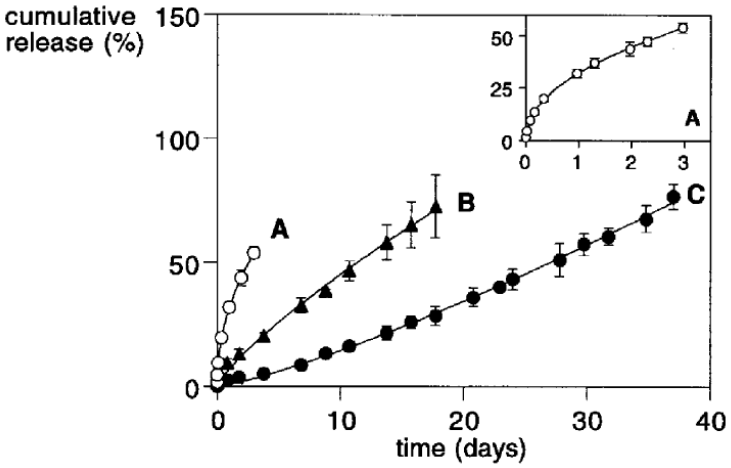


Figure 5: Profils de libération d'IgG au cours du temps à partir de différentes formulations d'hydrogels de dex-lactate-HEMA contenant différentes teneurs d'eau: 90% (A), 80% (B), and 70 % (C) (selon la référence [67]).

En ce qui concerne des microsphères injectables, les particules peuvent être préparées par le procédé décrit sur Figure 6 [72]. Ce produit est nommé Octodex™ par Octopus Technologies. Les microsphères-hydrogels sont réticulés chimiquement par polymérisation radicalaire des unités de méthacrylate dans des conditions modérées (température ambiante, pH 7) en utilisant soit une irradiation UV en présence d'un photo-initiateur, soit un système d'initiateurs composé de peroxydisulfate et de N,N,N',N'-tetramethylenediamine (TEMED). Les composés résiduels tels que le peroxydisulfate et TEMED ainsi que leurs produits de dégradation doivent être éliminés du gel avant une application *in-vivo*. Le profil de libération prolongée des IgG à partir des microsphères à pH 7, 37 °C est montré sur la Figure 7. On remarque que la vitesse de libération peut être modulée en faisant varier le degré de substitution (DS) du méthacrylate [71].

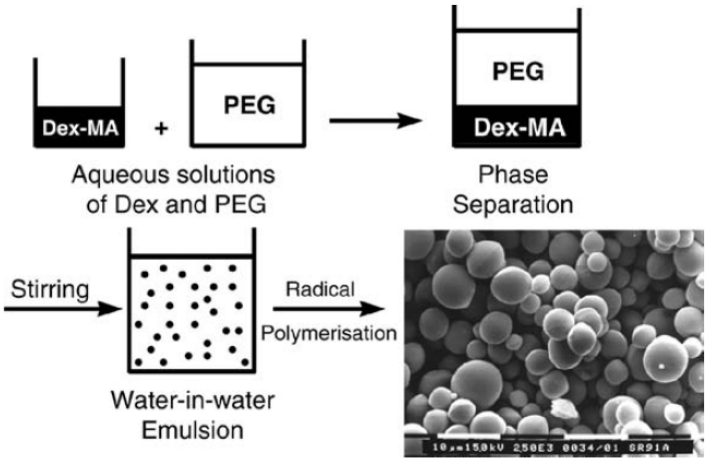


Figure 6: Procédé de formulation de particules d'hydrogel (selon la référence[72]).

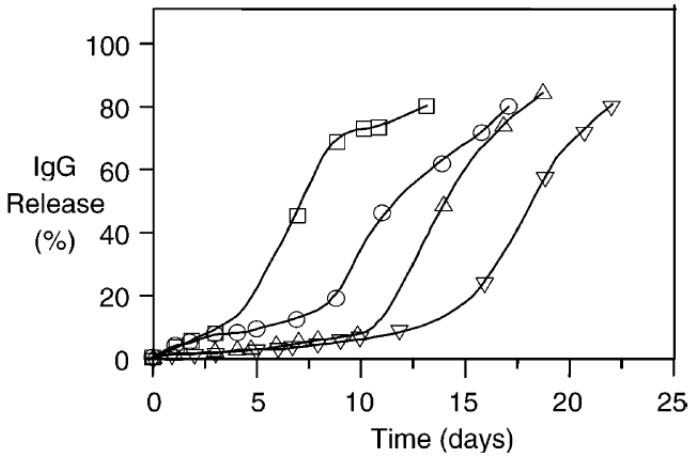


Figure 7: Profil de libération d'IgG à partir de particule dex-HEMA comportant différents dégrées de substitution (DS) :DS 3 (□) ; DS 6 (○) ; DS 8 (△) ; DS 11 (▽) (selon la référence [71])

En raison de la toxicité des agents de réticulation, une méthode de réticulation physique a été développée. Le procédé utilisant une réticulation basée sur la formation de stéréo-complexes [73-75] est résumé sur la figure 8.

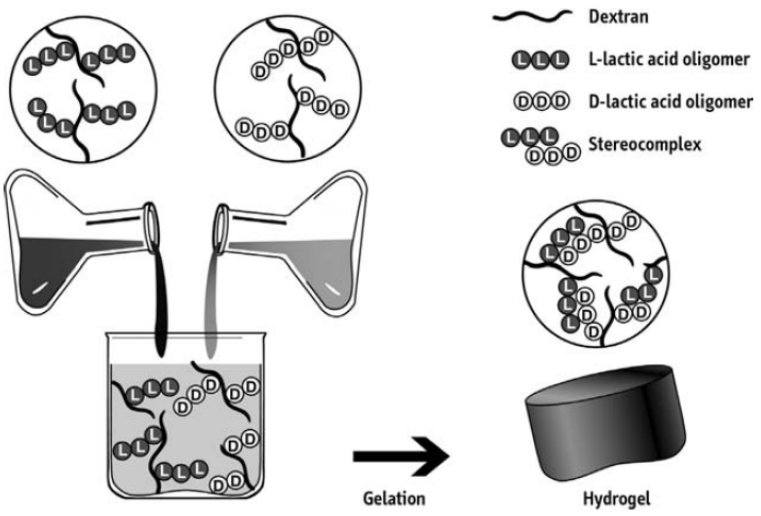


Figure 8: Hydrogel formé par stéréocomplexation. L'hydrogel est simplement obtenu après un mélange des solutés du dex- (l) - lactate (oligomère acide l-lactique greffé au dextrane) et du dex- (d) - lactate (selon la référence [73]).

Dans cet exemple l'hydrogel est préparé dans un environnement aqueux sans la présence de solvant organique. La réticulation est établie par la formation des stéréocomplexe entre les oligomères d'acide lactique [73]. Des hydrogels-stéréocomplexe chargés en protéine ont été préparés comme suit: la protéine a été solubilisée dans les deux solutions de dextrane-l-oligomère-acide lactique et dextrane-d-oligomère-acide lactique qui ont été ensuite mélangées pour former l'hydrogel. Il a été montré que dans des conditions physiologiques, les protéines (IgG, lysozyme) gardaient leur activité. Les gels sont entièrement dégradables et le temps de dégradation dépend du pH et de la composition de l'hydrogel [76].

II.1.3.2 Hydrogels thermosensibles

Des polymères capables de répondre à différents stimuli ont été largement explorés comme de potentiels systèmes de délivrance de médicaments. Les stimuli étudiés jusqu'ici incluent les substances chimiques, le pH, des champs électriques ainsi que des changements de la température. Ce dernier type de stimuli a été le plus étudié avec des polymères hydrosolubles qui subissent un fort changement au voisinage de la température corporelle. Par exemple, il a été observé qu'une solution aqueuse d'un tri-bloc PLGA-PEG-PLGA a un point de transition sol-gel proche de la température corporelle [60]. Ainsi, le système Oncogel® (Macromed, Inc., Sandy, UT) a été développé pour des injections intra-tumorales. Cette formulation injectable qui

combine du PLGA-PEG-PLGA (ReGel®) et du paclitaxel a montré une libération prolongée du principe actif au lieu d'injection et une distribution minimale dans d'autres organes [77]. Ce système est maintenant sous investigation pour la phase II des essais cliniques.

D'autres polymères possèdent cette caractéristique thermosensibles comme le poly(N-isopropylacrylamide) [78, 79] ou un copolymère tri-bloc PEG-PLGA-PEG [80, 81]. Dans le cadre de cette synthèse bibliographique, seul le système ReGel® mentionné ci-dessus sera présenté en détails avec des exemples concernant l'encapsulation de protéines. Les caractéristiques de gélification thermo-réversible de la solution de ReGel® sont présentées sur la Figure 9 [77].

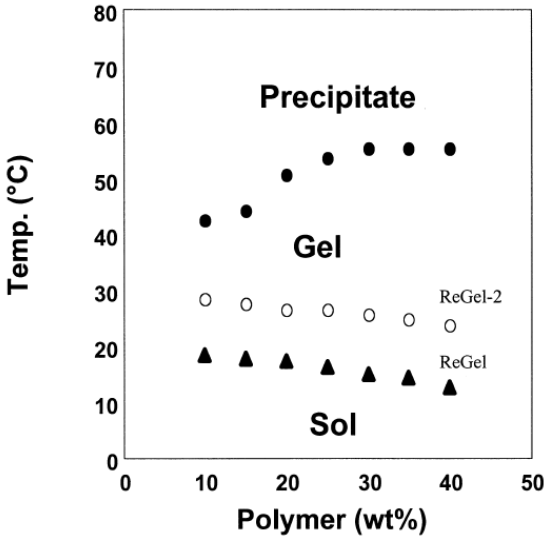


Figure 9: Diagramme de phase de la solution aqueuse Regel® (selon la référence [77])

L'application du système ReGel® *in-vivo* repose sur les deux propriétés suivantes :

-le polymère est hydrosoluble au-dessous de la température de transition sol-gel qui est inférieure à celle du corps.

-la solution de polymère forme un système de gel une fois soumis à la température corporelle dû aux interactions physiques entre des domaines hydrophobiques des chaines de polymère.

Une analyse mécanique dynamique a indiqué une augmentation de viscosité jusqu'à quatre ordres de grandeur via la transition sol-gel. Ce type copolymère a été employé dans la formation d'un gel *in-situ* pour la libération continue d'insuline humaine. Une réduction de l'effet « burst » et une libération continue de l'insuline ont été observées avec ce système. Des études *in-vivo* chez des rats ont montré que la libération de l'insuline a été maintenue jusqu'à 15 jours, ce qui pourrait permettre aux patients diabétiques de réduire le nombre d'injections d'insuline à deux par mois par rapport aux injections quotidiennes classiques [82]. Récemment, la technologie Regel® a été utilisée pour la formulation de deux nouveaux produits : Cytoryn® (Interleukine 2) et hGHD-1 (hormone de croissance hGH)[83].

D'autre part, il faut noter que des microsphères-hydrogel peuvent être préparées avec ce type de polymère sans utiliser les solvants organiques volatiles. Ce procédé a été comparé avec la méthode classique d'émulsification-extraction de solvant (w/o/w) pour l'encapsulation d'insuline humaine. Les profils de libération sont montrés sur la Figure 10. On peut observer que dans le cas des microsphères A d'hydrogel, la libération précoce est réduite et la libération de l'insuline est maintenue jusqu'à 20 jours [84].

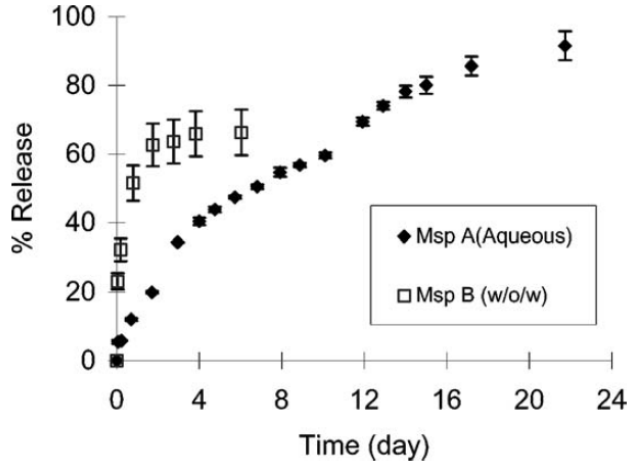


Figure 10: Profils de liberation de l'insuline à partir de lots de microparticules d'hydrogel et de microparticules préparées par la méthode d'émulsification/extraction de solvant (selon la référence [84]).

II.1.4 Systèmes matrices polymériques

Dans cette partie, des systèmes de délivrance basés sur des matrices polymériques seront regroupés en 3 sous-classes :

- Systèmes de polymères non-dégradables.
- Systèmes de délivrance osmotiques.
- Systèmes de polymères dégradables.

Du fait que la libération des principes actifs dans le cas des systèmes de délivrance osmotiques s'appuie principalement sur la présence d'une membrane semi-perméable constituée à partir d'un polymère non-dégradable, nous avons choisi de présenter ce type de système dans cette partie.

II.1.4.1 Systèmes de matrice polymériques non dégradable [85]

Parmi les nombreux systèmes non dégradables élaborés pour la délivrance des principes actifs, ceux utilisant des polymères hydrophobes non-dégradables ont été étudiés les premiers. Un élastomère de silicone a été utilisé pour la première fois avec cet objectif il y a environ cinquante ans. Cette découverte a conduit au succès de Norplant® (laboratoire de Wyeth-Ayerst) qui libère de façon continue du levonorgestrel pour un effet contraceptif durant cinq années après une implantation sous-cutanée. Norplant® a été à la disposition des femmes aux Etats-Unis depuis 1990, où il a connu un succès commercial important [86]. De la même façon, des systèmes utilisant du poly(ethylène-co-vinyl acetate) (EVAc) ont permit de développer des systèmes de délivrance d'hormones contraceptives (Progestasert®, Alza Corporation) et de principes actifs liphophiles (Ocusert®, Alza Corporation ; Estraderm® et Transderm Nitro®, Ciba-geigy Corporation).

Puisque les macromolécules comme les protéines ne traversent pas les films de silicone ou d'EVAc, beaucoup d'investigateurs ont pensé qu'ils n'étaient pas adaptés pour la libération contrôlée de protéines [85]. Vers la fin des années 70, cependant, un système de libération contrôlé de protéines à partir d'un polymère non-dégradable a été décrit [85]. Ce système permet une libération des molécules biologiquement actives pendant une longue période allant jusqu'à plusieurs années dans certains cas [85]. Les matrices d'EVAc chargées en protéine peuvent être fabriquées par évaporation de solvant ou par compression [85]. Il est important de souligner que ce polymère est biocompatible et a été approuvé par la FDA pour l'usage dans la fabrication des

implants. Des études ont montré qu'après sept mois d'implantation sous-cutanée, une simple couche mince de tissu conjonctif entourait des implants d'EVAc et qu'aucune inflammation n'était présente [85].

*Relargage des protéines à partir des matrices polymères

Quand des matrices d'EVAc chargées de protéines sont immergées dans l'eau, des protéines sont libérées lentement (Figure 11). On peut observer que le taux d'encapsulation influence fortement le profil de libération. D'autre part, le profil de libération est quasiment linéaire avec la racine carrée du temps (Figure 11b), suggérant un mécanisme de diffusion pour ce processus de libération

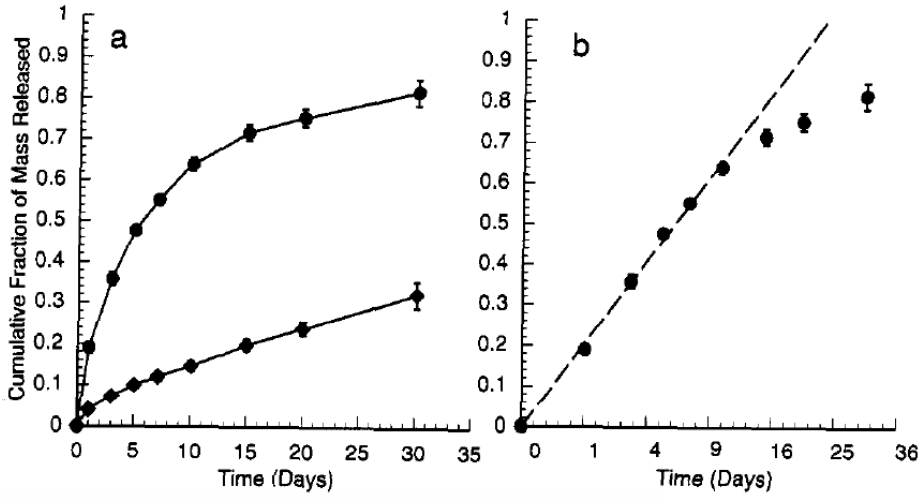


Figure 11: Profil de libération de ferritine à partir de matrices d'EVAc en fonction du temps (a) et racine carré du temps (b) [taux d'encapsulation 35% (●), 50% (♦)] (selon la référence [85]) .

Parmi les macromolécules étudiées dans ces systèmes matriciels, on peut citer des hormones, l'héparine, des facteurs de croissance, des inhibiteurs d'angiogenèse tumoraux, des anticorps polyclonaux et monoclonaux, et des antigènes. Il a été montré que des macromolécules ont maintenu leur activité biologique après avoir été libérés à partir des matrices d'EVAc[87, 88].

*Mécanisme de libération:

Les matrices d'EVAc chargées jusqu'à un certain taux se composent de particules de protéine dispersées dans tout le volume de la matrice comme montré dans la Figure 12. Quand ces matrices sont placées dans un environnement aqueux, les particules à la surface de la matrice peuvent se dissoudre et la protéine commence à être libérée. Puisque les macromolécules ne peuvent pas traverser la phase continue du polymère, et puisque le polymère est hydrophobe et ne gonfle pas dans l'eau, la libération de protéine se produit via des pores créés dans le polymère. Des observations microscopiques de la structure de matrice indiquent un réseau de pores interconnectés dans lesquels les grands pores (diamètres de 100-400 μm) sont connectés par de plus petits pores ou canaux (1-10 μm de diamètre) (Fig. 12b). Ce réseau de pores est en contact avec la surface des matrices et explique la libération de protéine vers l'extérieur de la matrice. Avec un taux d'encapsulation supérieur à 35%, la plupart des particules de protéines sont localisées dans les réseaux qui peuvent atteindre la surface de la matrice. En revanche, avec un faible taux d'encapsulation, la plupart des pores sont déconnectés comme montré dans la Figure 12 [89].

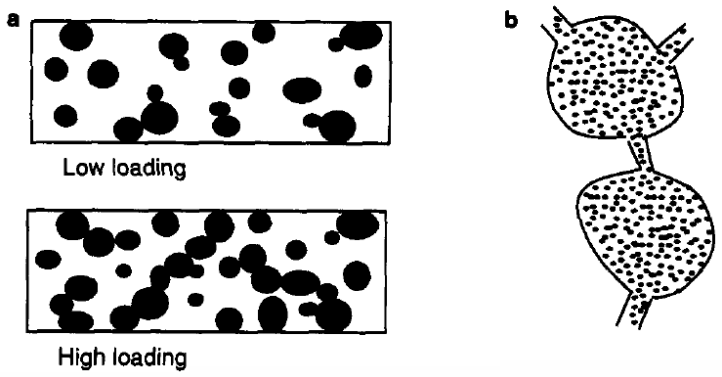


Figure 12: Vue schématique d'une matrice de polymère EVAc chargé en protéine. (a) Vue en coupe des matrices avec deux taux d'encapsulation différents. A des taux élevés, des pores sont reliés, fournissant les chemins continus pour la diffusion de protéine à la surface. (b) Des pores typiques dans la matrice sont agrandis. Les grands pores (diamètres de 100-400 μm) sont reliés par de plus petits canaux (diamètres de 1-10 μm).

II.1.4.2 Systèmes de délivrance osmotiques [90, 91]

Un exemple typique de ce type de système est la technologie Duros® développée par Durect Corporation. Ce type de système présente de nombreux avantages. Par exemple, ces systèmes

montrent une excellente corrélation entre les études *in-vitro/in-vivo*. De plus, avec ce système, la vitesse de libération est indépendante des propriétés physicochimiques des principes actifs, et elle peut être contrôlée précisément.

***Technologie Duros®:**

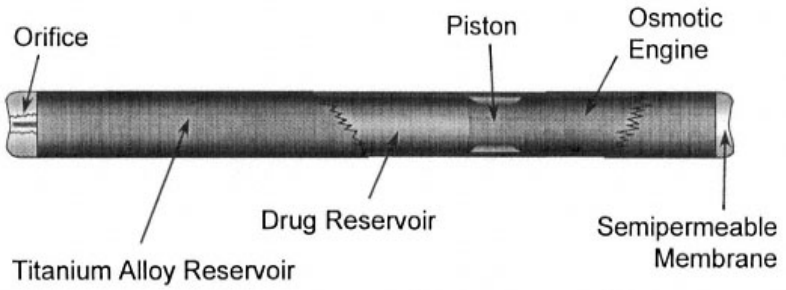


Figure 13: Implant osmotique DUROS® (selon la référence [90])

-Conception du dispositif :

L'implant Duros® fonctionne sur le principe d'osmose. C'est un système de délivrance conçu pour une libération prolongée avec une vitesse constante par voie parentérale. L'implant Duros® se compose d'un cylindre imperméable en titane qui se termine, à une extrémité, par une membrane semi-perméable et à l'autre extrémité, par un orifice qui permet de libérer les principes actifs. L'intérieur de l'implant Duros® contient un piston qui sépare le moteur osmotique du réservoir de principe actif (Figure 13). Ces implants à utiliser une seule fois sont stériles, non-pyrogènes, et non-biodégradables. En ce qui concerne le principe de fonctionnement, l'eau est aspirée via la membrane semi-perméable en réponse à un gradient osmotique entre le moteur osmotique à l'intérieur de l'implant (p = 356 atm) et l'humidité dans le fluide interstitiel (p ~ 7 atm). Le taux d'afflux de l'eau est dicté par les caractéristiques de la membrane semi-perméable. La pression que le moteur exerce sur le piston augmente avec l'entrée de l'eau et permet donc la libération des principes actifs via l'orifice à l'autre extrémité.

La membrane semi-perméable peut être construite à partir d'esters de cellulose, de polyamides, ou de polyuréthanes. Il faut souligner que la fonction de membrane n'est pas influencée par le fluide extracellulaire, et la membrane reste stable dans les conditions physiologiques.

Le moteur osmotique de l'implant Duros® peut être construit à partir de plusieurs solutés différents, mais le chlorure de sodium (>50 % de la masse totale du moteur osmotique), le poly (vinyl-pyrrolidone) ou la carboxyméthylcellulose sodique ont été les plus étudiés.

Une propriété unique du implant Duros®, comparé à d'autres pompes implantables, est sa petite taille, permettant une implantation sous-cutanée facile.

- Implant Duros Leuprolide (Viadur®) [90]:

L'implant de leuprolide Duros® est un des exemples de système conçu pour fournir une alternative aux injections périodiques par dépôt de leuprolide dans le traitement palliatif du cancer de prostate. Ce système est implanté en sous-cutanée à l'intérieur du bras. Après une année, il est retiré et remplacé par un nouveau système. L'implant de leuprolide de Duros® libère du leuprolide de façon continue pendant un an à raison d'environ 120 µg/jour (0.4 µL/jour).

Des études de libération de protéine *in vitro* avec des implants Duros® ont été réalisées dans un tampon phosphate (PBS) à 37°C. Une libération de la protéine avec une vitesse constante a été observée pendant une durée d'une année (Figure 14). En outre, l'analyse par RP-HPLC a indiqué la stabilité chimique du médicament *in vitro* durant la durée d'essai.

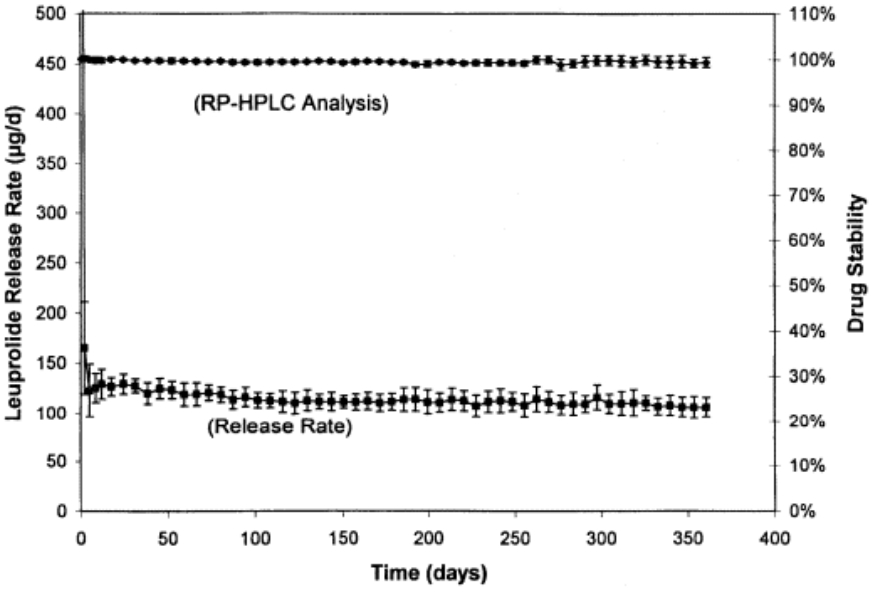


Figure 14: Profil de libération *in vitro* de leuprolide et étude de sa stabilité pendant un an (selon la référence [90]).

II.1.4.3 Systèmes de matrice polymériques dégradable

Avec ces systèmes, la libération des principes actifs est contrôlée par la dégradation des polymères (bio-érosion). Il est nécessaire que les produits issus de la dégradation soient biocompatibles. Un avantage majeur par rapport aux autres systèmes, est l'absence d'interventions chirurgicales pour retirer ces systèmes après implantation ou injection.

II.1.4.3.1 Technologie Atrigel (Atrix Laboratories, Colorado, USA) [92]

Le système Atrigel® est un système de délivrance breveté qui peut être employé pour la voie parentérale. Il se compose d'un polymère biodégradable dissout dans un solvant biocompatible. Lorsque ce système liquide de polymère est injecté dans le corps, il se solidifie au contact du liquide corporel pour former un implant *in situ*. Si un médicament est incorporé dans la solution de polymère, il sera encapsulé dans la matrice de polymère lors de la solidification. Le médicament sera alors libéré progressivement pendant que le polymère se dégrade.

De nombreux polymères biodégradables peuvent être employées dans la technologie d'Atrigel, à savoir, les polyhydroxyacides, les polyanhydrides, les polyorthoesters, les polyesteramides, ... Les plus fréquemment employés sont les copolymères d'acides poly (lactique-co-glycolique) et les copolymères de l'acide lactique et de ε-caprolactone en raison de leurs caractéristiques de dégradation et de leur innocuité reconnue par la FDA [93]. Les solvants utilisés dans le système Atrigel® pour solubiliser les polymères sont des solvants miscibles avec de l'eau tels que le dimethyl sulfoxyde (DMSO), la N-methyl-2-pyrrolidone (NMP), le tetraglycol ou glycofurol, le carbonate de propylène, la triacétine, l'éthyl acétate, le benzoate de benzyle. Le solvant le plus souvent utilisé est le NMP en raison de sa capacité de solubilisation et de sa relative innocuité [92]. Les informations concernant la toxicité du NMP seront présentées et comparées avec d'autres solvants dans la partie "Solvants injectables" (cf. § II.2).

Récemment, le système Atrigel® a été utilisé pour développer une série de produits Eligard® permettant la libération de l'acétate de leuprolide sur une période de 1, 3, et 4 mois dans le traitement du cancer de prostate [94, 95]. Un produit permettant la libération durant six mois est également en développement préclinique (Figure 15).

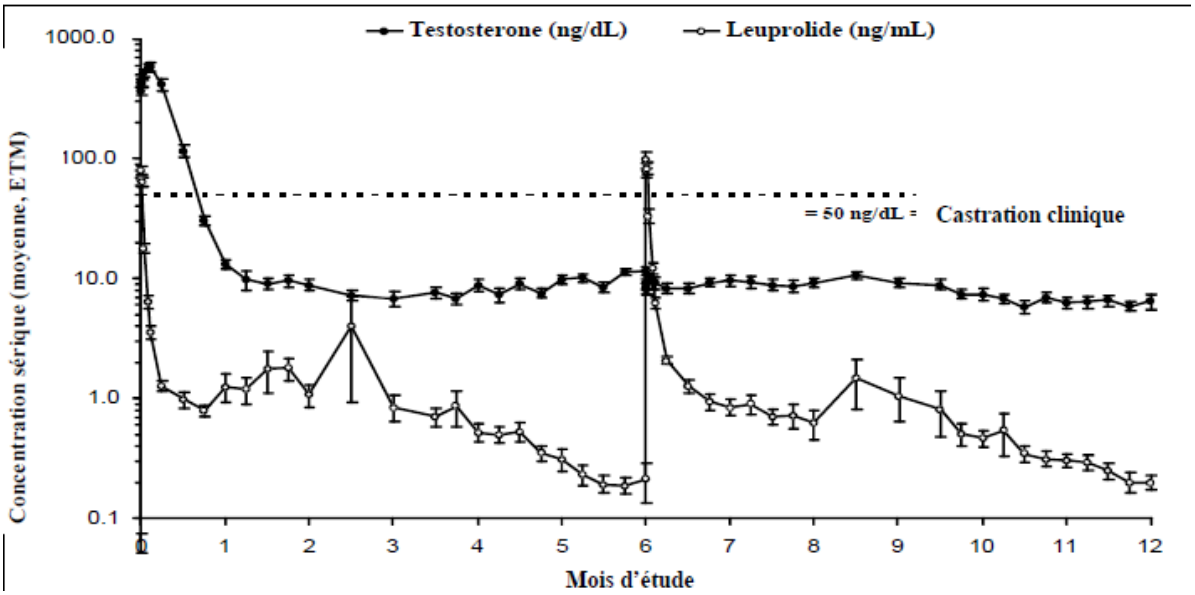


Figure 15: Concentration de leuprolide libéré et de testosterone dans le sang après 2 cycles d'injection d'Eligard-à 0 et 6 mois (source:http://products.sanofi.ca/fr/eligard.pdf).

II.1.4.3.2 Technologie Alzamer® Depot (Alza Corporation, California, USA)[96]

Avec le même concept, Alza Corporation a développé un système dépôt qui permet de former un implant *in-situ* pour la libération prolongée de protéines et peptides. Ce produit utilise un solvant (benzoate de benzyle) qui diffuse lentement dans l'eau afin de diminuer l'effet de « burst » observé souvent avec d'autres systèmes dépôt. Un autre point intéressant de ce système est l'utilisation de protéine densifiée par l'acide stéarique, ce qui permet également d'atténuer la libération rapide de protéines pendant la phase initiale. L'hGH (human growth hormone) et l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1) sont des exemples de protéines incorporées dans ce système. L'influence du solvant sur le profil de libération est montrée sur la Figure 16.

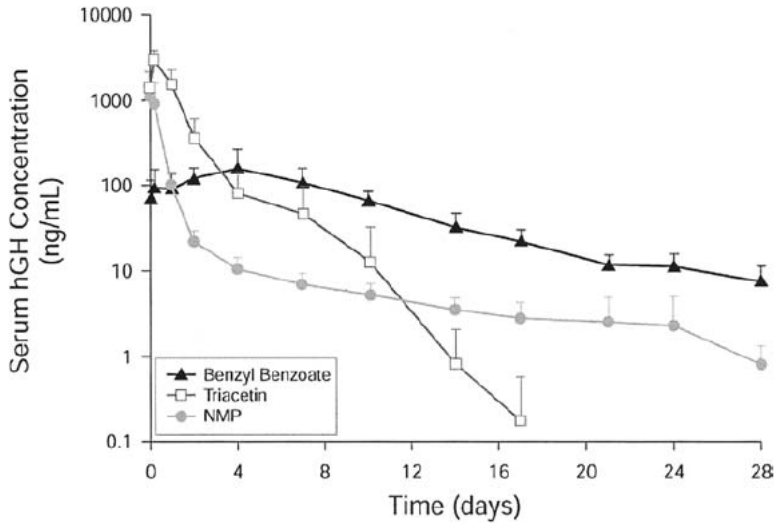


Figure 16: Concentration plasmatique de hGH après une injection montrant l'influence de la nature du solvant sur le profil de libération (selon la référence [96]).

II.1.4.3.3 Technologie Prolease® (Alkermes, Massachusett, USA) -Nutropin Depot [97]

Le système de délivrance ProLease® a été conçu spécifiquement pour surmonter des problèmes liés à l'encapsulation des biomolécules fragiles par les méthodes d'émulsification/extraction-évaporation de solvant. La technologie ProLease® s'appuie sur la meilleure stabilité des protéines lorsqu'elles sont dispersées à l'état solide dans une phase liquide contenant le polymère d'enrobage. Le procédé d'encapsulation de la technologie ProLease® est décrit sur la Figure 17.

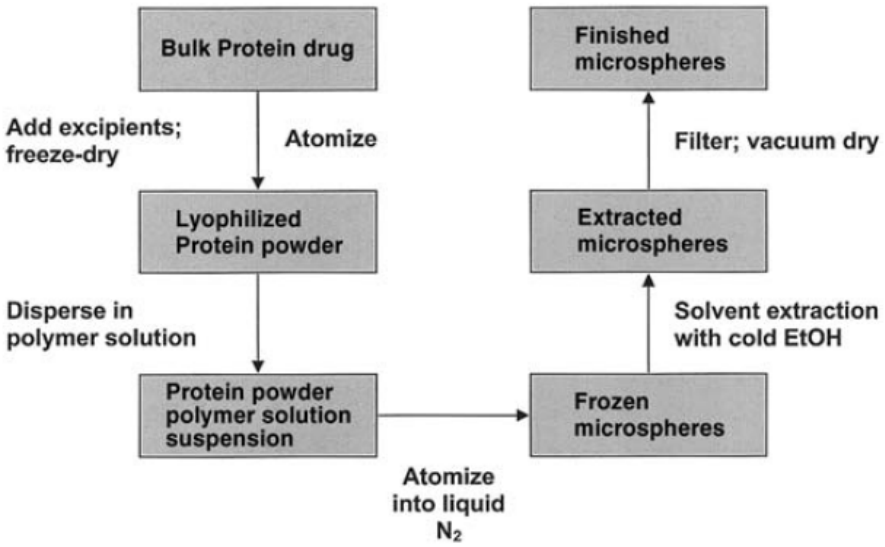


Figure 17: Procédé d'encapsulation de la technologie Prolease® (selon la référence [97]).

La première étape du procédé est la production d'une poudre lyophilisée de protéine. Cette première étape est réalisée par atomisation de la solution de protéine contenant des excipients stabilisants dans l'azote liquide. Les gouttelettes sont gelées instantanément lors de leur contact avec de l'azote liquide. Au laboratoire, la nébulisation se fait via une buse vibrante par action des ultrasons tandis que dans l'industrie, un atomiseur est utilisé. Les gouttelettes gelées sont ensuite lyophilisées pour obtenir une poudre friable. Les conditions de lyophilisation sont choisies pour réduire au minimum la teneur en eau résiduelle et maintenir l'intégrité de la protéine. La poudre lyophilisée est stockée à -80°C jusqu'à la deuxième étape d'encapsulation de protéine dans une matrice de PLGA. Dans cette deuxième étape, le PLGA est dissout dans un solvant tel que le dichlorométhane, l'acétate éthyle, ou un autre bon solvant du polymère. La poudre lyophilisée de protéine est ajoutée à la solution de polymère et dispersée (par ultrason ou homogénéisation haute pression) pour créer une suspension uniforme de protéine dans la solution de polymère. La taille des particules de protéine dans la suspension est une variable importante qui affecte de manière significative la cinétique de libération. La suspension est ensuite pulvérisée pour former des gouttelettes ; ces gouttelettes sont les précurseurs du produit final composé de microsphères. La suspension est pulvérisée dans un récipient contenant de l'éthanol congelé couvert avec de l'azote liquide. Les gouttelettes gèlent dans cet environnement cryogénique et se trouvent sur la couche d'éthanol congelé. L'extraction du dichlorométhane présent dans les microsphères se fait par l'éthanol qui permet également la précipitation du polymère. Les microsphères sont récupérées par filtration et ensuite séchées sous vide pour obtenir la poudre finale.

Les microsphères peuvent être administrées par injection sous-cutanée ou intramusculaire. Juste avant l'administration, la poudre de microsphère est dispersée dans un diluant aqueux visqueux. La première spécialité utilisant cette technologie pour l'encapsulation d'une protéine thérapeutique a été Nutropin®-somatropine (Genentech Inc., San Francisco, USA).

II.1.4.3.4 Lupron® Depot [98]

Préparation des microsphères :

Le schéma de fabrication de microsphères permettant une période de libération d'un mois à l'échelle laboratoire est montré sur la Figure 18. La protéine et la gélatine sont dissoutes dans une phase aqueuse (W1) à environ 60°C. La solution de protéine est vigoureusement homogénéisée avec la solution de PLGA dans du dichlorométhane (O) et l'émulsion est ensuite refroidie à

environ 15°C pour stabiliser l'émulsion primaire W1/O. Dans une deuxième étape, l'émulsion est injectée dans un grand volume de solution d'alcool polyvinylique (PVA) à 0.25% (W2) sous agitation avec un homogénéisateur pour obtenir une émulsion double W1/O/W2. L'agitation est maintenue pendant trois heures pour permettre l'évaporation complète du dichlorométhane. Les particules obtenues sont séchées, puis tamisées et lyophilisées. Du mannitol est ajouté dans la suspension de particules avant la lyophilisation dans le but de faciliter la redispersion de la poudre de particules dans le diluant lors de l'utilisation. Pour la production industrielle, le procédé est réalisé dans des conditions aseptiques et toutes les solutions sont stérilisées par filtration avant l'étape de microencapsulation.

Lupron Depot® a été conçu pour une libération prolongée d'acétate de leuproline pendant une période d'1 à 3 mois. La suspension reconstituée de microparticule est facilement injectée par voie sous cutanée en utilisant une aiguille de 23-26 G puisque les particules sont assez petites (taille moyenne de 20 à 30 µm). Le dépôt de Lupron® est disponible sur le marché sous forme d'une seringue double-compartiment pré-remplie dans laquelle les microparticules lyophilisées stériles se trouvent dans un compartiment et le diluant dans l'autre compartiment.

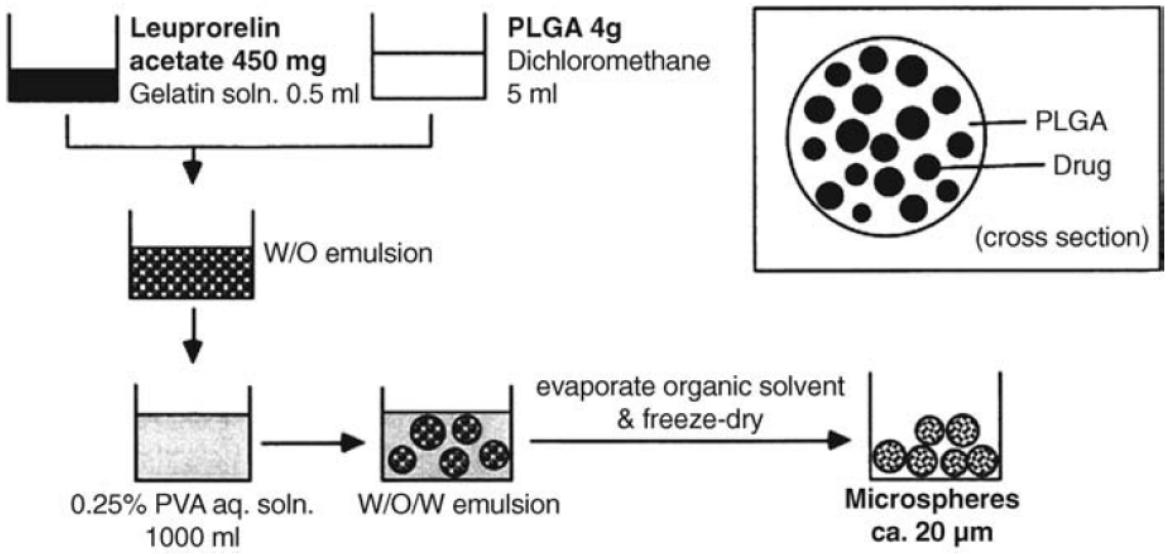


Figure 18: Procédé de formulation du système Lupron Depot® (selon la référence [98])

II.1.4.3.5 Technologie Saber® (Sounthern Biosystems, Alabama, USA) [97]

Le sucrose acetate isobutyrate (SAIB) est un additif (dérivé de sucrose estérifié) bien connu et approuvé par le FDA pour l'utilisation dans l'industrie agroalimentaire (source:

http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn000104.pdf). Sa structure est montrée sur la Figure 19. C'est un liquide très visqueux et hydrophobe.

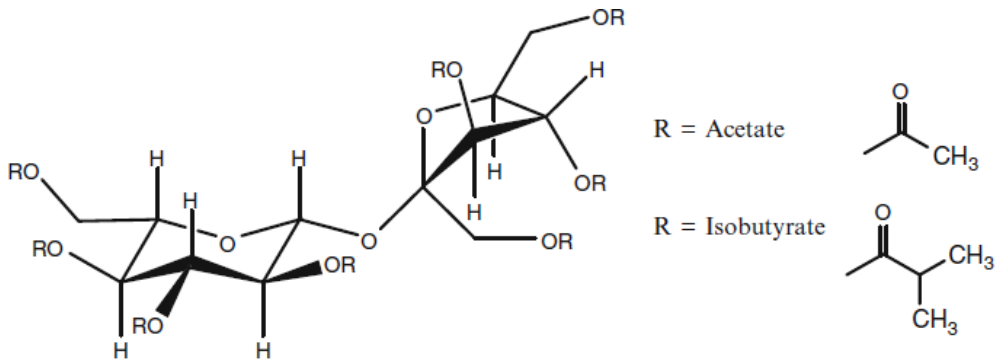


Figure 19: Structure du sucrose acetate isobutyrate (selon la référence [97]).

De part ses propriétés de viscosité et d'hydrophobicité, SAIB a été utilisé pour développer un système de libération prolongée pendant une période qui varie de quelques heures jusqu'à plusieurs semaines. Cette technologie est brevetée sous le nom « High-Viscosity Liquid Controlled-Delivery System » par Southern BioSystems, une filiale de Durect Corporation [99]. En ce qui concerne la formulation de ce système, SAIB est mélangé avec un solvant injectable comme l'éthanol ou le benzoate benzyle pour obtenir un liquide peu visqueux [97]. Le principe actif est ensuite dissout ou dispersé dans cette solution avant que le système soit injecté par voie sous-cutanée ou intramusculaire. Si le co-solvant choisi est hydrophile comme l'éthanol, il sera rapidement extrait du système, ce qui permet la formation d'un dépôt visqueux de SAIB et de principe actif. Le médicament sera libéré progressivement de ce dépôt. Si un co-solvant plus hydrophobe est choisi comme le benzoate de benzyle, la diffusion du solvant sera plus lente et le dépôt sera moins visqueux. La durée de libération est contrôlée par un certain nombre de paramètres tels que le taux d'encapsulation, le type et la quantité du solvant, le type et la quantité d'éventuels additifs. Plusieurs médicaments sont compatibles avec ce système, spécialement pour les applications parentérales dans lesquelles la libération prolongée est désirée. Southern BioSystems a publié des données concernant l'utilisation de ce système avec des agents anticancéreux, des antigènes, des anesthésiques, des stéroïdes, la LHRH, et certaines protéines thérapeutiques [100-102].

II.1.5 Comparaisons et analyse critique des systèmes de délivrance:

L'abondance des publications sur l'encapsulation de protéines avec différentes technologies prometteuses n'est pas corrélée avec le faible nombre de produits à la base de peptides ou protéines sous forme d'un système à libération prolongée mis sur le marché [103]. Dans la plupart des cas, les recherches d'un nouveau procédé s'arrêtent à la preuve de concept à l'échelle laboratoire [83, 103]. Ceci s'explique par la nécessité d'investissements couteux pour des essais cliniques et des études de transposition d'échelle; d'autre part, des limitations intrinsèques à chaque système, comme la toxicité, ou économique, comme le rapport "coût-bénéfice" sont des points importants à prendre en considération lors de l'industrialisation d'un concept académique [83, 103]. Cette partie sera consacrée à comparer les inconvénients des systèmes de délivrance (système conjugué, liposome, hydrogel, microparticules de PLGA ou PLA) dont les caractéristiques pour l'encapsulation de protéines ont été présentés précédemment (Tableau 4).

Tableau 4: Comparaisons des inconvénients des systèmes de délivrance.

Système	Inconvénients
Système pégylé	-diminution de l'activité biologique de protéine[27]. -perte de protéine durant le procédé de pégylation [27, 104]. -induction de la formation d'anticorps contre PEG entraînant l'inefficacité du système chez un sous-groupe de patients [105].
Liposome	-instabilité chimique et physique (hydrolyse des liaisons d'ester, oxydation des chaines lipides insaturées; fuite de médicament vers la phase dispersante, fusion des vésicules). La lyophilisation est nécessaire pour augmenter la durée de stockage des liposomes (e.g., Ambisome™) [106]. -capture par le système réticulo-endothélial [37]. -syndrome CAPRA (C-activation related pseudo-allergy) chez les patients hypersensibles aux Doxil®-like Pegylated liposomes[107, 108].

Hydrogel	-courte durée de libération de protéines par rapport aux systèmes particulaires polymériques (généralement, la durée de libération varie de 24 heures jusqu'à une quinzaine de jours) [83]. -"burst-effect"[83]. -faible résistance mécanique[83].
Microsphère de PLGA ou PLA	-libération incomplète [109, 110]. -désactivation de protéines induite par le microenvironnement acide formé durant la dégradation des particules[109, 110].

Chaque système de délivrance possède ses propres avantages et inconvénients et ceci selon l'application considérée. La sélection d'un système de délivrance pour une voie d'administration définie lors de l'étape de développement et pour un traitement donné dépend des principaux points suivants [111]:

(1) la dose thérapeutique et le profil de libération exigés.

(2) la durée du traitement.

(3) la population ciblée (e.g., IV, infusion pour des patients hospitalisés/système de délivrance chez les patients en sortie de l'hôpital sous traitement chronique)

(4) l'impact des conditions de formulation sur la stabilité des protéines et peptides.

(5) la biodisponibilité des peptides et protéines.

Il faut aussi souligner que l'utilisation d'un médicament pour un traitement est influencée par la politique de remboursement mise en place par les autorités de santé [83]. Une étude de marché des différentes formes galéniques existantes sur le marché est donc indispensable avant de mettre en œuvre un nouveau système de délivrance pour un principe actif défini.

II.1.6 Paramètres physico-chimiques importants à prendre en compte dans les procédés

Concernant les procédé de formulation des microparticules PLGA ou PLA chargées en protéine (partie II.1.4.3) ainsi que ceux publiés dans la littérature, il ressort que les deux méthodes (1) séparation de phase (e.g., technologie Atrigel®, technologie Alzamer Depot®) et (2) émulsification/extraction (e.g., Lupron Depot®) sont les plus utilisées. Dans les paragraphes suivants nous reprenons les principaux paramètres influents pour ces deux méthodes.

II.1.6.1 Séparation de phase [20]

Dans un processus de coacervation induit par l'addition d'un agent de coacervation, trois types d'interactions sont à envisager: interaction entre le polymère et le solvant ($\Delta intE_1$), entre le solvant et l'agent de coacervation ($\Delta intE_2$), et entre le polymère et l'agent de coacervation ΔntE_3), comme illustré sur la Figure 20.

Ce type d'interaction implique les paramètres et constantes indiquées dans l'équation suivante:

$$\Delta_{int}E = -nV_1\delta_{d1}\delta_{d2} - nV_1\delta_{p1}\delta_{p2} - (E_1E_2 + C_1C_2) \qquad \text{(eq 1)}$$

Où δ_d, δ_p sont les paramètres de solubilité de Hansen ; E, C sont les paramètres de Drago ; V est le volume molaire du soluté ; n=1 si les 2 composants sont complètement miscibles, dans le cas contraire, n égal à 2. Une liste de valeurs des paramètres de Hansen peut être trouvée dans l'annexe 2.

Selon l'importance des interactions $\Delta intE_1$, $\Delta intE_2$, et $\Delta intE_3$, la désolvatation du polymère conduit aux états physiques avec les conditions indiquées par les expressions suivantes :

$$\Delta_{int}E_1 \gg \Delta_{int}E_2 + \Delta_{int}E_3 \qquad \text{(eq 2)}$$

$$\Delta_{int}E_1 < \Delta_{int}E_2 + \Delta_{int}E_3 \qquad \text{(eq 3)}$$

$$\Delta_{int}E_1 \ll \Delta_{int}E_2 + \Delta_{int}E_3 \qquad \text{(eq 4)}$$

L'équation 2 reflète un système biphasique avec une faible désolvatation du polymère qui ne mène pas à une phase visqueuse de coacervats. L'équation 3 décrit une désolvatation modérée du polymère qui a pour résultat une phase liquide fortement visqueuse riche en coacervats,

appropriée à la formation de particules. Finalement, l'équation 4 définit la situation d'une forte désolvatation du polymère qui entraîne la précipitation du polymère. Les deux premiers cas sont également décrits comme une démixtion liquide-liquide tandis que, une démixtion solide-liquide a lieu dans le dernier cas.

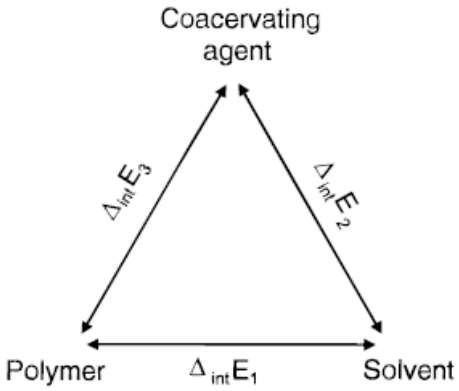


Figure 20: Schéma des interactions entre les différents composants lors d'un procédé basé sur la séparation de phase (selon la référence [20]).

II.1.6.2 Emulsification/extraction [112]

Dans la formulation des microparticules polymériques à libération prolongée, un des paramètres importants qui influence fortement le profil de libération est la taille des particules. Les paramètres opératoires principaux influençant la taille des gouttelettes de la phase dispersée-précurseurs des microparticules pendant l'étape d'émulsification, peuvent être brièvement décrit comme indiqué ci-dessous.

*Viscosité:

L'équation empirique suivante décrit l'impact de la viscosité sur la taille des gouttelettes:

$$d_{32} = A\left(\frac{\mu_d}{\mu_c}\right)^{0.25} \qquad \text{(eq 5)}$$

où d_{32}, μ_d, μ_c sont respectivement le diamètre moyen en surface, la viscosité de la phase dispersée et la viscosité de la phase dispersante.

Dans la littérature, on peut noter qu'il est très commun de faire varier la viscosité de la phase dispersée. La viscosité de la phase dispersante est rarement modifiée bien que l'ajout des additifs puisse augmenter de façon significative la viscosité. La raison réside sur le fait que la récupération des particules à partir d'un liquide visqueux est techniquement compliquée [112].

*Agitation et la prédiction de la taille des gouttelettes:

L'agitation est un des paramètres les plus importants qui permet de faire varier la taille des microsphères. D'autres facteurs liés à l'agitation ont également un impact sur la taille des microsphères comme : la géométrie du réacteur, le nombre de pâles d'agitation, la position de l'agitateur, le rapport de taille entre l'agitateur et le réacteur.

Il existe un grand nombre de corrélations qui permettent de prédire la taille et la distribution de la taille des gouttelettes d'une émulsion formée de deux liquides non-miscibles [113, 114]. Ces corrélations prennent en considération deux aspects:

(1) Les propriétés physiques des matériaux, tels que la densité de la phase continue et la tension interfaciale entre les deux phases.
(2) Les facteurs liés à l'agitation

La corrélation la plus fondamentale et la plus utilisée est basée sur la théorie de Kolmogoroff:

$$\frac{d_{max}}{D} = c_1 \left(\frac{\rho_c N^2 D^3}{\sigma} \right)^{-3/5} \qquad \text{(eq 6)}$$

Dans (eq 6), d_{max} est la taille des gouttelettes les plus grandes qui peuvent exister en régime turbulent, D est le diamètre de l'agitateur (m), ρ_c est la densité de la phase continue (kg/m^3), N est le taux d'agitation (tours/s), σ est la tension interfaciale entre la phase dispersée et la phase continue (N/m) et c_1 est une constante. La valeur de c_1 est expérimentalement déterminée et sa valeur est affectée par les facteurs liés aux conditions d'agitation comme expliqué précédemment. Il existe une corrélation entre le diamètre Sauter-d_{32} (diamètre pondéré en surface) et d_{max} selon l'expression suivante:

$$d_{32} = c_2 d_{max} \qquad \text{(eq 7)}$$

où c_2 est une constante.

D'autres termes peuvent être ajoutés dans (eq 7) pour prendre en considération l'influence d'autres facteurs tels que la fraction de volume de la phase dispersée sur la phase continue ϕ et leur rapport de viscosité [115].

$$\frac{d_{32}}{D} = c_3(1 + c_4\phi)\left(\frac{\rho_c N^2 D^3}{\sigma}\right)^{-3/5} \qquad \text{(eq 8)}$$

$$\frac{d_{32}}{D} = c_5\phi\left(\frac{\rho_c N^2 D^3}{\sigma}\right)^{-3/5}\left(\frac{\mu_d}{\mu_c}\right)^{0.25} \qquad \text{(eq 9)}$$

où c_3, c_4, c_5 sont des constantes. La valeur de $c_5\phi\left(\frac{\rho_c N^2 D^3}{\sigma}\right)^{-3/5}$ correspond au coefficient A mentionné dans l'équation 5.

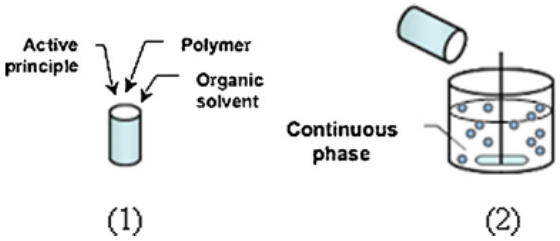


Figure 21: Etape d'émulsification dans la méthode d'émulsification/extraction (selon la référence [112]).

Ce procédé d'émulsification est assez simple à mettre en œuvre et la taille des gouttelettes est facilement contrôlée. Ce procédé peut être mis en œuvre dans le cas de systèmes ternaires eau/huile/eau (w/o/w) ou solide/huile/eau (s/o/w) où l'extraction du solvant se fait par l'utilisation d'une phase aqueuse, ou par l'addition d'autres fluides comme par exemple dans le cas d'une extraction à l'aide de fluide supercritique [12]. Cependant, un point négatif souvent rencontré dans ce procédé lorsqu'il est appliqué à la formulation de particules polymériques de PLGA, est l'utilisation des solvants volatiles toxiques (e.g., dichlorométhane). Des approches alternatives permettant d'éviter l'utilisation de ces solvants sont nécessaires. Ainsi, au sein de notre Unité INSERM U1066, nous cherchons à élaborer de nouveaux procédés basés sur la méthode d'émulsification/extraction et utilisant des solvants non-volatiles et injectables afin d'obtenir des particules de PLGA dont les caractéristiques sont plus adaptées aux applications pharmaceutiques visées.

II.2 .SOLVANTS INJECTABLES

Comme cela a été précisé dans la partie « Introduction », nous nous focalisons sur la formulation de particules formulées à l'aide de polymères de la famille des acides poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) sans faire intervenir ces solvants volatiles, dans le but d'élaborer un système de délivrance pour des protéines thérapeutiques. Ces polymères biocompatibles et biorésorbables, ont été largement utilisés sous forme de fils de suture chirurgicaux et sont approuvés par la FDA (Food and Drug Aministration). Selon les pourcentages d'acide lactique et d'acide glycolique, l'hydrophobicité et les paramètres de solubilité de ces polymères peuvent être modulés (voir annexe 2). Alors que les méthodes décrites dans la littérature utilisent souvent des solvants toxiques volatiles tels que le dichlorométhane, l'acétone,…nous souhaitons développer de nouvelles approches répondant à certaines tendances actuelle de la recherche connues sous les termes "green processes" ou "chimie verte". Ces approches tentent de répondre aux contraintes imposées par les autorités règlementaires afin de préserver l'environnement et améliorer la sécurité des produits formulés. Nous présenterons dans ce chapitre un récapitulatif des informations liées à la toxicité des solvants organiques volatiles qui ont été souvent utilisés dans des procédés classiques et nous insisterons sur les données existantes pour des solvants très peu volatiles en condition atmosphérique et qui ont été, par ailleurs, très peu étudiés pour la formulation de particules de polymère.

Parmi les solvants organiques volatiles utilisés pour solubiliser le PLGA (Tableau 5), on peut trouver le dichlorométhane [116-118], le propylène carbonate, l'acétone, l'acétate d'éthyle [119], le tétrahydrofural [120], l'acétonitrile[121] … Selon la pharmacopée européenne qui définit les solvants pour lesquels la quantité de résidu peut être critique pour une application pharmaceutique, ces solvants appartiennent à la classe 2 ou 3 .

Tableau 5: Classification de quelques solvants organiques selon la Pharmacopée européenne (2005) .

Solvant	Température d'ébullition (ºC)	Classe	PDE* (mg/jour)	Concentration limite (ppm)	DL50** (mg/kg) voie oral, rat[S1]	DL50 (mg/kg)
Acétonitrile	81-82	2	4.1	410	2460	1680 (iv) [S1]
Dichlorométhane	39.6	2	6	600	1600	
Acétone	56-57	3	50	5000	5800	5500 (iv) [S2]
Éthyle acétate	77.1	3	50	5000	5620	
Tetrahydrofural	66	3	50	5000	1650	2900 (ip) [S3]

Classe (2): solvants à limiter; classe (3): les solvants peu toxiques
*: permitted daily exposure.
**: dose létale 50%.
[S1] http://datasheets.scbt.com/sc-207252.pdf
[S2] http://www.hitachi-america.us/supportingdocs /forbus/inkjetprinters/msds/english/ink_types/ hitachi-material-safety-data-sheet-jp-k81-printing-ink.pdf
[S3] http://www.e-zweld.com/webresources/files/msds/pvc_2.pdf

Tableau 6: Paramètres physicochimiques de quelques solvants injectables.

Solvant	Température d'ébullition (ºC)	Densité à 20 ºC (g/ml)	Viscosité (mPa.s)
DMI	236.4	1.167	5.96
Glycofurol	256.2	1.085	12.95
NMP	202-204	1.032	1.83
DMSO	189	1.100	1.88

Parmi les solvants encore peu étudiés pour la formulation des particules de PLGA, nous pouvons citer par exemple la N-methyl 2-pyrrolidone (NMP), le diméthyle sulfoxide (DMSO), le glycofurol (GF), l'isosorbide diméthyle ether (DMI). Ce sont des solvants miscibles avec l'eau et

très peu volatiles (Tableau 6). En ce qui concerne leur toxicité, celle-ci n'est pas encore standardisée dans la Pharmacopée Européenne. Quelques études de toxicité ont été réalisées sur ces solvants et nous fournissent des informations comparatives.

Ainsi, dans une étude portant sur l'activité hémolytique et l'angiotoxicité, 13 solvants miscibles avec l'eau [lactate d'éthyle, diméthyle sulfoxide, tetrahydrofurfuryl alcohol (THFA), N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP), glycérol formal, éthanol, solketal, acétone, diglyme, propylène glycol, polyéthylène glycol 200 (PEG 200), glycofurol, et isosorbide dimethyl ether (DMI)] ont été comparés. Ces solvants ont été injectés dans l'aorte sous-rénale de moutons mâles adultes à différents volumes et les paramètres hémodynamiques ont été estimés par l'enregistrement de la pression artérielle et veineuse et la fréquence cardiaque. Les résultats ont montré que le DMSO possédait un effet hypotenseur tandis que le glycofurol et le DMI ne présentaient pas cette toxicité [122].

Tableau 7: Comparaison de la toxicité cardiovasculaire de solvants organiques miscibles avec l'eau basée sur les changements de la pression artérielle[122]

Réduction de la pression artérielle	Ecart (%)	Solvant
Absent	0-9.9	Sérum physiologique, DMI, Glycofurol, PEG 200, diglyme
Modérée	10.0-19.9	THFA, ethanol, acetone, Solketal®, glycerol formal, DMSO
Notable	>20	Propylene glycol, lactate d'éthyle, NMP

Dans une autre étude, les solvants ont été mélangés avec du sang humain à différents ratios, 1:99, 1:95 et 10:90 afin de mesurer l'activité hémolytique. Le résultat a confirmé qu'avec le mélange 10:90, le DMI ne causait pas d'hémolyse et possédait une faible toxicité alors que le glycofurol était classé dans le groupe modéré et que le DMSO apparaissait comme un solvant très fortement hémolytique [123].

A partir des différentes études sur la toxicité de ces solvants injectables, les données obtenues sont résumées dans le tableau 8.

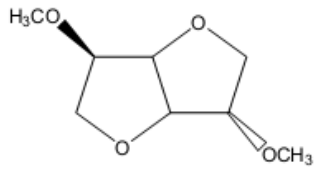
Tableau 8: Données sur la toxicité de solvants miscibles avec l'eau.

Solvant	DL50 (ml/kg) [124]	Activité hémolytique par voie intraveineuse et intra-artériel [125]	Toxicité cardiovasculaire [122]	Angiotoxicité - temps de vasospasme [126]
DMSO	6.9 (iv./m), 7.45 (iv/r), 12.6 (ip./m), 15(po./m)	Très forte	Modérée	19.1
NMP	4.4 (ip./m)	Modérée	Toxicité notable	5 (*)
Glycofurol	3.5 (iv./m)	Modérée	Toxicité négligeable	10.5
DMI	8.54 (iv./r)	Faible	Toxicité négligeable	5.9 (*)
PEG 200	7.6 (iv./m), 12.9 (ip./m), 26 (po./m)	Forte	Toxicité négligeable	–

(*) : le temps du vasospasme est plus bas significativement par rapport à DMSO.

En se basant sur les critères de toxicité résumés ci-dessus, il apparaît que l'isosorbide dimethyl ether est le solvant le moins toxique à ce jour. Nous nous sommes alors intéressés aux propriétés physicochimiques de ce solvant, présentées dans le paragraphe suivant.

*** Isosorbide dimethyl ether:**



Nom INCI: Diméthyl isosorbide

Nom chimique (IUPAC) 1,4:3,6-dianhydro-2,5-di-O-methyl-D-glucitol.

Nº CAS: 5306-85-4

Masse molaire : 174.2 g/mole

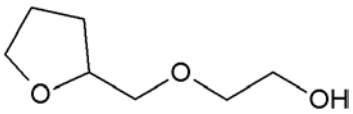
Le DMI, un dérivé de l'isosorbide, est très soluble dans l'eau ($1x10^3$ g/L à 25^oC). Ce solvant peut être utilisé pour solubiliser plusieurs substances actives et ainsi que certaines huiles cosmétiques [127].

C'est un solvant non inflammable, non volatile (point d'ébullition : 236.4 °C à 760 mmHg), ne semblant pas présenter de risques pour la santé humaine ni sur l'environnement. Le DMI, d'après des études toxicologiques, ne présente pas d'effets mutagènes ou génotoxiques[128, 129].

N'étant pas irritant pour la peau, l'œil ou l'oreille, il est utilisé dans les formulations cosmétiques avec pour but d'améliorer l'activité de l'acide férulique [130] et d'augmenter la pénétration de certains ingrédients cosmétiques[131].

En ce qui concerne les applications pharmaceutiques, le DMI est retrouvé dans la formulation de l'aspirine sous forme liquide [132]. Certaines études récentes l'ont utilisé comme solvant pour des biomatériaux emboliques utilisés dans le traitement de l'anévrisme[122, 126]. C'est un solvant injectable par voie intraveineuse ou voie intra-artérielle dans des formulations contenant des composants ayant une faible solubilité dans l'eau [125].

***Glycofurol:**



Nom chimique (IUPAC): α-[(tetrahydro-2-furanyl) methyl]-ω-hydroxy-poly (oxy-1,2-ethanediyl)

Nº CAS:31692-85-0

Dans notre laboratoire INSERM 1066, l'utilisation de glycofurol pour la formulation de particules de PLGA a été décrite en 2004 par A. Aubert-Pouëssel *et al.* [133]. Les données concernant la toxicité et les paramètres physicochimiques de ce solvent injectable sont présentées dans les Tableaux 5, 6, 7.

Le glycofurol est un solvant pour usage parentéral par voie intraveineuse ou intramusculaire pouvant être utilisé jusqu'à une concentration d'environ 50% (v/v). [134]. C'est un composant entrant dans la composition de produits pharmaceutiques [133], notamment comme co-solvant pour solubiliser le diazépam dans une formulation intranasale [135] ; il est également décrit comme un adjuvant de vaccination [136], comme solvant injectable pour des implants polymères [137, 138]. La co-administration de glycofurol améliore et prolonge l'absorption de certaines peptides (par exemple, peptide T par voie intranasale[139]). Récemment, il a été utilisé comme solvant du PLGA pour la formulation de microsphères polymériques [133, 140].

II.3 FORMULATION DE PARTICULES POLYMERIQUES A L'AIDE DES FLUIDES PRESSURISES

Comme indiqué précédemment, nous souhaitons élaborer de nouveaux procédés permettant la génération de particules de PLGA en milieu CO_2 supercritique. Une des principales motivations est d'évaluer le potentiel des solvants injectables miscibles avec l'eau (glycofurol, isosorbide dimethyl ether-DMI) comme solvant du PLGA pour former des particules de façon à mimer le principe de formulation des microsphères de PLGA basé sur la méthode d'émulsification/ extraction. Le caractère non-polaire du fluide CO_2 et ses propriétés d'extraction modulables en fonction de la pression et température nous semblaient particulièrement intéressants à exploiter pour cet objectif. La partie suivante permet de présenter les résultats de la littérature les plus pertinents en lien avec la génération des particules polymériques en milieu CO_2 supercritique.

II.3.1 Rappels sur le fluide CO_2 supercritique

Le dioxyde de carbone supercritique est le fluide le plus couramment utilisé dans les procédés de formulation haute pression . Il possède en effet les propriétés remarquables suivantes:

- Propriétés thermodynamiques: le point critique (Tc=304.2 ºK, Pc=7.38 MPa) est facilement accessible. De plus, le CO_2 est à l'état gazeux dans les conditions ambiantes de pression et de température, ce qui permet ainsi une récupération et un recyclage en fin de procédé.
- Hygiène et sécurité: Le CO_2 est non toxique et non cancérigène. D'autre part, il est non explosif, non inflammable et inodore. Cependant, la valeur limite d'exposition (VLE) au CO_2 est de 3 % sur une durée de 15 minutes. Au delà de cette valeur, les effets sur la santé sont d'autant plus graves que la teneur en CO_2 augmente. Ce dernier point nécessite de placer des capteurs adaptés dans les zones de travail afin d'éviter tout risque d'intoxication pour les opérateurs et de contrôler régulièrement les équipements. De plus le travail à haute pression nécessite de respecter des règles élémentaires de sécurité (port de lunettes, et masques adaptés).
- Propriétés physicochimiques: Le CO_2 supercritique (comme tous les autres fluides supercritiques) présente des propriétés physiques intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz. Le CO_2 supercritique a une densité proche de celle d'un liquide, ce qui lui confère, par exemple, un bon pouvoir solvant. D'autre part, avec un coefficient de

diffusivité proche de celui d'un gaz, le transfert de matière en milieu CO_2 supercritique est rapide ce qui est mis à profit dans les procédés d'extraction.

II.3.2 Procédés de génération de particules

Les procédés de formulation de particules en présence d'un fluide supercritique sont classés par catégorie selon le rôle du fluide dans le procédé, à savoir, comme solvant, anti-solvant, ou soluté. Dans les paragraphes suivants, les points théoriques en lien avec ces procédés seront rappelés et nous présenterons des exemples décrits dans la littérature où l'utilisation du CO_2 pressurisé permet la génération de particules de PLGA ou PLA. Cependant, jusqu'à maintenant, aucun produit sous forme de particules de polymères préparées par les procédés décrits ci-dessous n'est présent sur le marché.

II.3.2.1 Rapid expansion of supercritical solution (RESS)[141]

En utilisant ce procédé, des particules de petite taille peuvent être produites à partir de matériaux qui sont solubles dans les fluides supercritiques. Dans ce procédé, un solide est dissout dans un fluide supercritique (en présence ou absence d'un co-solvant) puis cette solution est rapidement dépressurisée, ce qui entraîne la précipitation du solide. Ce procédé a été appliqué à une large variété de matériaux comprenant des polymères, des colorants, des substances pharmaceutiques ainsi que des systèmes inorganiques.

En faisant varier les paramètres de procédé qui influencent la sursaturation et le taux de nucléation, on peut obtenir des particules très différentes en termes de taille et morphologie. La sursaturation extrêmement élevée peut être obtenue lors du refroidissement par dépressurisation rapide du fluide supercritique. Le calcul du taux de nucléation est basé sur l'équation suivante qui décrit le nombre de nucléi critiques formés en une unité de temps et en unité de volume[142]:

$$I = 2N_{tot}\,\beta\,(\sigma\, v_1^2/k.T)^{0.5}\exp\left[-16\,\pi/3.\left(\sigma\, v_1^{2/3}\right)^3\left(\frac{1}{\ln S} - Ky_1^e(S-1)\right)^2\right] \qquad \text{(eq 10)}$$

où N_{tot} : concentration totale du soluté dans le fluide; β : flux thermique du soluté ; σ : tension interfaciale ; v_1 : volume molaire du soluté ; k : constante de Boltzmann ; S : indice de sursaturation ; K : fonction entre la température et la pression; y_1^e: fraction molaire du soluté en équilibre.

* Critères de conception:

Pour concevoir des expériences RESS, il est recommandé d'étudier la solubilité de la substance cristallisable dans le fluide supercritique afin de choisir les paramètres de procédé (P et T) qui permettent d'obtenir la quantité maximale du solide dissoute dans la solution supercritique en absence de phase liquide.

Dans les procédés RESS mais également PGSS (Particles from Gas Saturated Solution) sont souvent présents des mélanges binaires fortement asymétriques qui contiennent deux substances très différentes au niveau de la masse molaire, de la structure, et des interactions intermoléculaires. Les deux caractéristiques principales de ces systèmes sont [141, 143]:

- la température du point-triple du composant lourd qui est beaucoup plus haute que la température critique du composant léger.

- la solubilité du composant léger dans la phase liquide est très limitée.

La courbe S-L-V (Solide-Liquide-Vapeur) coupe la courbe critique liquide-vapeur en deux points : le point final critique inférieur (LCEP) et le point final critique supérieur (UCEP). Au niveau de ces deux points, les deux phases, liquide et vapeur, se transforment en un seul fluide contenant le solide en excès. Aux températures entre T_{LCEP} et T_{UCEP} on observe un équilibre entre les phase S et V. Il faut noter que la solubilité du composant lourd dans la phase vapeur augmente très rapidement avec la pression au voisinage de l'UCEP [142]. Un autre point important dans ce procédé est le système de nébulisation qui permet la dépressurisation de la solution supercritique. L'élément principal de ce système est une buse (sous forme capillaire ou orifice) dont le diamètre intérieur est généralement compris entre 20 et 100µm. Selon Matsuyama *et al.* [144], la morphologie des particules est plus facilement contrôlée dans le cas des capillaires. Les éléments principaux présents dans le procédé RESS sont montrés dans la Figure 22. Quelques exemples de particules de polymère générées par cette technique sont présentés dans le tableau 9

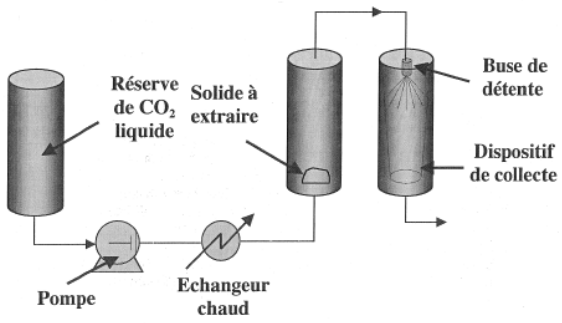


Figure 22: Schéma de procédé RESS (d'après réf [145]).

Tableau 9: Exemples des particules de PLA générées par le procédé RESS.

	Fluide pressurisé/ co-solvant	Pression de pré-expansion (bar)	Température de pré-expansion (°K)	Taille des particules (µm)	Référence
L-PLA	CO_2	170-200	363-388	10-90	[146]
L-PLA	CO_2	210	373-393	1-20	[146]
L-PLA	CO_2	200	328-338	2-5	[147]
PGA	CO_2	180-200	328	10-20	[148]
L-PLA	CO_2	200-250	328		[149]
L-PLA	CO_2	380	333	0.27-0.73	[150]
L-PLA	CO_2/ethanol	200	313	2-50	[144]
L-PLA	CO_2/THF	220-517	343-373	0.03-10	[151]

L-PLA: L-poly-lactique acide.

Différents procédés RESS concernant la formulation de particules de L-PLA ont été développés. On peut observer que la taille des particules varie de quelques dizaines de nanomètres jusqu'à une centaine micromètres. En se basant sur le même principe du RESS, ces procédés diffèrent par la nature du matériau utilisé (différente masse molaire du L-PLA) ou par des détails techniques tels que le rapport longueur/diamètre du buse ou la présence/absence d'un co-solvant. C'est pour cette raison qu'il est assez compliqué d'évaluer l'influence des paramètres opératoires (pression, température) sur la taille des particules en comparant ces procédés entre eux. Pourtant, avec un

procédé défini, la taille des particules de L-PLA diminue généralement avec l'augmentation de la pression de pré-expansion [144, 146]. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'augmentation de la pression de pré-expansion augmente la vélocité du fluide dans la buse et donc le nombre de Weber entraînant ainsi la division plus fine des gouttelettes à la sortie de buse[144].

La solubilité du L-PLA dans le CO_2 augmente avec la pression et la température de pré-expansion [146], ce qui explique la raison pour laquelle le procédé RESS est souvent réalisé à une température assez haute. Ceci est un inconvénient du procédé RESS pour le développement des produits chargés en principes actifs thermosensibles. Afin de surmonter cet obstacle, l'ajout d'un co-solvant pourrait être une solution pour augmenter la solubilité du polymère dans le CO_2[144]. Cependant, la condensation du co-solvant apparaîtra lors de l'étape d'expansion causant la coalescence des particules [144, 151]. Il est donc nécessaire soit de purger la chambre d'expansion avec de l'azote [151], soit de nébuliser la solution supercritique dans une phase aqueuse [144] afin d'obtenir des particules individualisés.

II.3.2.2 Procédé d'anti-solvant [141]

Plusieurs procédés et leurs variants utilisent la propriété anti-solvante du CO_2 pour générer des particules. Les procédés suivants, GASR (“gas anti-solvent recrystallization”), GASP (“gas anti-solvent precipitation”), SAS (“supercritical anti-solvent fractionation”), PCA (“precipitation with a compressed fluid anti-solvent”), SEDS (“solution-enhanced dispersion of solids”) diffèrent par la façon de mettre en contact la solution de soluté et le fluide pressurisé. Le contact entre la solution et le fluide pressurisé peut se faire en pulvérisant le fluide pressurisé dans la solution ou inversement, la solution est pulvérisée dans le fluide pressurisé.

L’utilisation des fluides pressurisés comme anti-solvant est une technique alternative pour le traitement des solides qui sont peu solubles dans ces fluides. Cette méthode exploite la capacité des fluides pressurisés à solubiliser certains solvants organiques, ce qui permet d’abaisser leur pouvoir solvant, entraînant ainsi la précipitation des solides.

En jouant sur les paramètres qui influencent l’indice de sursaturation, le taux de nucléation, et le taux de croissance il est possible de faire varier la taille, la distribution, et la forme des particules dans une large gamme.

Le procédé global de recristallisation, comprenant la nucléation initiale puis la croissance des noyaux, peut être modélisée par l'équation suivante qui décrit le taux de formation des noyaux[152]:

$$J = Z\exp(\frac{\Delta G_{max}}{RT}) \qquad \text{(eq 11)}$$

où : J est la production des noyaux (nombre par une unité de temps et par une unité de volume) ; Z est la fréquence de collision, calculable à partir de la théorie cinétique classique [153]; et ΔG_{max} est l'expression d'énergie libre de Gibbs.

La taille et la distribution de taille peuvent être modulées grâce au mode et au débit d'addition de l'anti-solvant. Les éléments principaux d'un procédé SAS sont montrés dans la Figure 23. Quelques exemples des particules de PLA préparées par ces procédés d'anti-solvant sont présentés dans le Tableau 10.

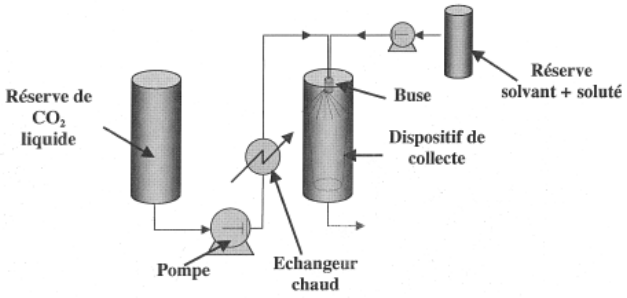


Figure 23: Schéma de procédé SAS (d'après la référence [145])

Tableau 10: Exemples de particules de PLA formées à l'aide du procédé anti-solvant.

Polymère	Solvant	Pression (bar)	Température (°K)	Taille (µm)	Référence
L-PLA	CH_2Cl_2	65-125		7-50	[154],[155]
L-PLA	CH_2Cl_2	85-105	302-304	3.3-3.9	[156]
L-PLA	CH_2Cl_2	62.5-141	279-298	<2	[157]
L-PLA	$CHCl_3$	85.8-101.1	308-313	1.06-3.5	[158, 159]
L-PLA	$CH_2Cl_2/CHCl_3$ (8/92:v/v)	140	307	12.3	[160]

L-PLA	CH_2Cl_2/DMSO (50/50:w/w)	130	295.5-298	0.5-2	[161]
L-PLA	CH_2Cl_2/acétone	80-160	306-312	0.6-6.6	[162]
L-PLA	CH_2Cl_2	150-250	323	≈1	[163]
L-PLA	CH_2Cl_2	113.6-174	328-333	0.77-1.41	[164]
L-PLA	CH_2Cl_2	100-120	308	1-3 irregulière	[165]

Il nous semble difficile de tirer des conclusions à propos de l'influence des paramètres opératoires sur la taille et la morphologie des particules en comparant les procédés présentés ci-dessus car comme cela a été mentionné précédemment, en se basant sur le même principe anti-solvant, les différents procédés tels que GAS, SAS, PCA,... ont été développés avec différentes configurations au niveau de l'appareillage. Le mécanisme de formation de particules n'est donc pas identique pour ces procédés. Par exemple, selon E. Reverchon *et al.*, le mécanisme de formation de particules dans le cas du GAS est la séparation de phase tandis que pour le SAS, il est basé sur l'atomisation et l'extraction du solvant[166]. En comparant seulement des études basées sur le procédé SAS, l'influence des paramètres opératoires (concentration de la solution de polymère, vitesse d'injection, pression, température) sur la taille des particules a été décrit comme suit:

(1) plus la concentration de la solution de polymère était grande, plus la taille des particules était élevée et plus le phénomène d'agglomération était important [162, 167]. Ceci pourrait être expliqué par l'augmentation de la viscosité de la solution qui influence l'efficacité de l'étape d'atomisation [162].

(2) plus la vitesse d'injection de solvant était grande, plus la taille des particules était grande et plus l'agglomération était importante. Ceci pourrait être expliqué par la diminution de l'indice de sursaturation [162].

(3) A.Z. Chen *et al.* a observé une augmentation de taille des particules de PLLA en augmentant la température ou en diminuant la pression. Les auteurs ont expliqué cet effet en raisonnant sur la densité du CO_2 et la tension interfaciale entre le solvant et le CO_2 pressurisé[162]. En revanche,

E. Reverchon *et al.* ont rapporté que dans certains cas, ces deux facteurs n'ont pas eu une influence significative ou pourraient avoir un effet inverse sur la taille des particules [166]. De notre point de vue, il est important d'étudier ces deux paramètres en parallèle et la construction des surfaces de réponses en fonction de ces deux facteurs dans un domaine expérimental fixé pourrait être utile pour mettre en évidence l'influence des facteurs.

Dans un procédé SAS, selon E. Reverchon *et al*., afin d'obtenir des particules sphériques, les conditions opératoires (T=const, pression, fraction molaire du CO_2) devraient être comme suit: $P>P_{mcp}$; $x_{CO2}>x_{mcp}$ (mcp: point critique du mélange) [166].

II.3.2.3 PGSS (Particles from Gas Saturated Solution) [141]

C'est un procédé relativement nouveau dans lequel un fluide compressible est solubilisé dans le matériau à micronniser. Dans une certaine zone de température et de pression, ce mélange se liquéfie et cette solution est ensuite pulvérisée via un système d'atomisation. En raison de l'effet de Joule-Thomson et/ou du phénomène d'expansion-évaporation du gaz, la solution se refroidit, ce qui entraîne à la solidification du matériau et ainsi à la formation des fines particules.

*Les critères de conception :

Dans le PGSS, la connaissance du diagramme P-T (pression-température) de l'équilibre S-L-V du mélange fournit l'information sur la pression nécessaire pour fondre la substance à micronniser à une température donnée.

Quand un fluide supercritique a une solubilité relativement élevée dans la phase lourde, la courbe S-L-V peut avoir une pente dP/dT négative. Dans le deuxième cas, la courbe de S-L-V montre un minimum de la température. Dans le troisième cas où la courbe de S-L-V a une pente dP/dT positive, le fluide supercritique est légèrement soluble dans la phase lourde, et une augmentation de la pression hydrostatique entraînera donc une augmentation de la température de fusion du mélange [168] (Figure 24). Généralement un système pour lequel on observe une pente dP/dT négative et/ou un minimum de température dans la courbe S-L-V peut être considéré comme un bon candidat pour le procédé PGSS [168].

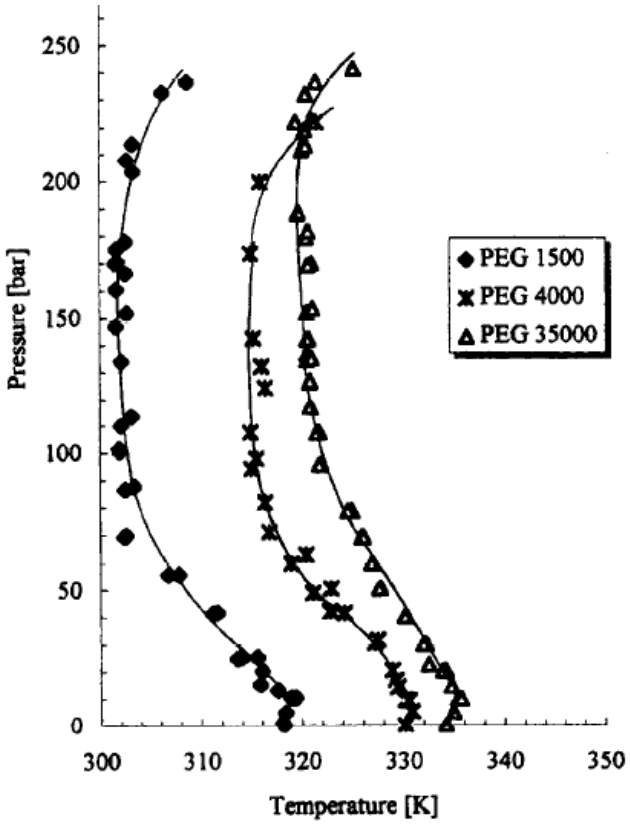


Figure 24: Diagramme P-T du système polyethylèneglycol-CO_2 (d'après [168]). De 1 à 10 bar, la diminution de la température de liquéfaction n'a pas été observé (dP/dT>0). Au delà de 10 bar, la température de transition diminuait avec l'augmentation de la pression (dP/dT<0)

Le procédé PGSS a été utilisé pour la génération des particules à partir d'une large gamme de polymères comme par exemple le poly-ethylène glycol, le poly-methacrylate, ou le polyetherurethane. En ce qui concerne les PLGA, les études de L. Casettari *et al.* [169]; J. Hao *et al.* [170], M. J. Whitaker *et al.* [171] démontrent l'intérêt du procédé pour ces polymères. Les conditions de température et pression utilisées sont respectivement dans la gamme 35-40 °C et 320-138 bar ;. La taille des particules obtenue est aux alentours de 100µm. Le procédé de génération des particules à partir du procédé PGSS est résumé dans la Figure 25.

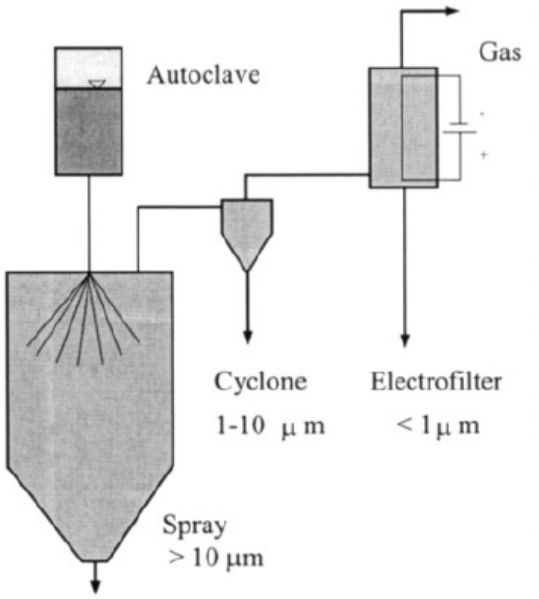


Figure 25: Schéma du procédé PGSS (d'après la référence [141]).

II.3.2.4 Remarques concernant les procédés de génération des particules de PLA, PLGA utilisant le fluide CO_2 pressurisé

La technologie du fluide CO_2 pressurisé est prometteuse pour la génération de particules de polymères de type PLA ou PLGA. L'application de cette technologie permet d'obtenir de très fines particules et de contrôler la taille des particules. A côté de ces avantages, chaque procédé présenté ci-dessus possède ses propres inconvénients résumés dans le Tableau 11 [141, 171].

Tableau 11:Avantages et inconvénients des procédés de génération de particules à l'aide de fluide pressurisé.

Procédé	Avantages	Inconvénients
RESS	-très fines particules -taille contrôlable -absence de solvant	-haut rapport gaz/polymère dû à la faible solubilité du polymère dans le CO_2 (l'utilisation d'un co-solvant est parfois nécessaire) -haute pression, haute température - équipement lourd
Anti-solvant	- particules fines -taille contrôlable	-utilisation de solvant organique volatile (CH_2Cl_2,...) -nécessité d'avoir une étape de séparation des particules du solvant

PGSS	-pression et température modérées -consommation modérée de fluide -absence de solvant organique	-forme des particules irrégulière entraînant la difficulté de contrôler la libération des principes actifs[171]

A ce jour, il existe très peu d'études concernant l'encapsulation de protéine dans des particules polymériques préparées par les procédés présentés ci-dessus. Quelques rares études d'encapsulation de protéine en milieu CO_2 sont récapitulées dans le Tableau 12. Il a été démontré que ces procédés permettaient de maintenir l' activité biologique des protéines.

Tableau 12: Recapitulatif des examples concernant l'encapsulation de protéines en milieu CO_2 pressurisé.

Protéine/polymère	Procédé	Rendement d'encapsulation	Référence
Lysozyme/L-PLA, PLGA	Anti-solvant	Non-disponible*	[172]
Lysozyme, lipase/L-PLA, PLGA	RESS	Non-disponible	[173]
Insuline/L-PLA	Anti-solvant	78.6-90.3%	[161]
Insuline/L-PLA	Anti-solvant	84.6%	[174]
Lysozyme, insuline, calcitonine/ PLGA	PGSS	92.4% (Lysozyme)	[171]

*: la présence du lysozyme est montrée qualitativement par l'analyse élémentaire.

La morphologie des particules de PLGA ou PLA chargées de protéines préparées par ces méthodes en milieu CO_2 pressurisé est présentée à titre d'exemple dans la figure 26.

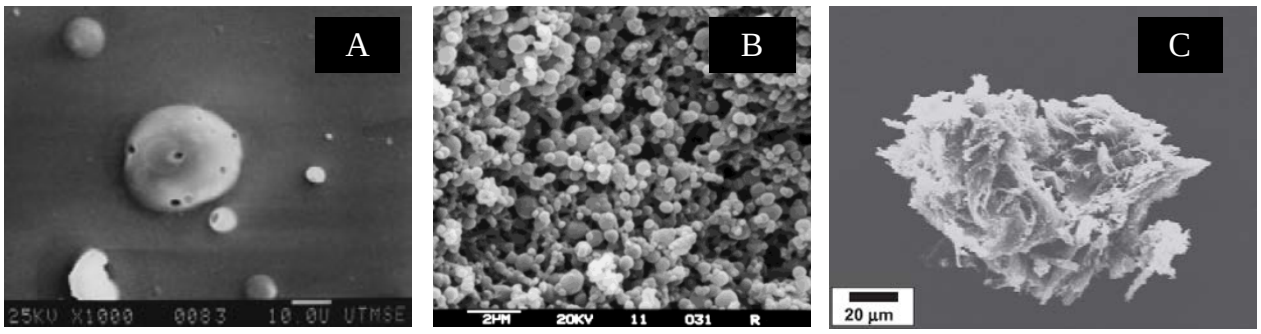


Figure 26: Image de particules de PLGA ou PLA chargées de protéine et préparées en milieu CO_2 pressurisé. (A): par le procédé SAS, taille moyenne des particules de 5-60µm [172];(B): par le procédé SAS, taille moyenne des particules environ 600 nm [161]; (C): par le procédé PGSS, taille moyenne des particules environ 150 µm[171].

III .PRINCIPES DE METHODOLOGIE

III.1 .MESURES D'EQUILIBRE DE PHASE

En travaillant avec le fluide CO_2 pressurisé, il est essentiel d'obtenir des données sur les équilibres de phases de nos systèmes. Cette partie consiste donc à résumer brièvement les techniques de mesures d'équilibres de phases présentées dans la littérature afin de justifier leur utilisation dans la partie comprenant nos résultats expérimentaux. Ces études d'équilibre de phase impliquent souvent des modélisations thermodynamiques de la solubilité du CO_2 en utilisant une équation d'état. Dans cette partie, nous décrirons également les principaux modèles utilisés.

III.1.1 Méthodes de mesures d'équilibres de phase

A ce jour, de nombreuses techniques de mesures d'équilibres de phases ont été mises au point, notamment pour déterminer la solubilité de composés en milieu supercritique. Ces techniques sont décrites de façon très détaillé dans la littérature [175, 176] et sont classées en deux catégories : les méthodes synthétiques et les méthodes analytiques.

III.1.1.1 Méthodes synthétiques

Le principe de ces méthodes est de préparer un mélange de composition connue et d'observer l'évolution des phases du système étudié en fonction des paramètres thermodynamiques (pression, température). Une cellule à volume variable est chargée avec une quantité connue de solvant. Puis, une quantité connue de gaz est introduite dans la cellule. La composition du mélange est désormais connue. Le système est laissé s'équilibrer dans des conditions de température et de pression suffisantes pour que le mélange soit diphasique au début de la mesure. Dès que l'équilibre est atteint, la pression est ajustée à l'aide du piston de la cellule jusqu'à l'observation d'une seule phase. La détection de ce changement de phase se fait par visualisation au travers de la fenêtre en saphir de la cellule. Ainsi la solubilité est déterminée facilement car la composition du mélange est initialement connue.

Ce type de méthode est très utilisé pour la caractérisation d'équilibres de phases de mélanges binaires. Par contre, l'utilisation de ces méthodes est peu recommandée dans le cas où l'observation du changement de phase est difficilement observée due à la faible différence d'indice de réfraction entre les phases.

III.1.1.2 Méthodes analytiques

Le principe de ces méthodes consiste à prélever un échantillon des phases et à déterminer la composition par différentes méthodes : chromatographie, spectroscopie (IR ou UV-Visible), analyse gravimétrique. Cette dernière méthode adaptée pour l'étude de mélanges binaires, consiste à séparer les constituants puis à quantifier par pesée un des constituants. On déduit ainsi facilement par différence, la quantité initialement dissoute de l'autre constituant. Par ailleurs, il est possible de déterminer *in situ* et par conséquent sans prélèvement, la composition des phases par analyse infrarouge [177, 178].

III.1.2 Corrélation des données dans une situation d'équilibre liquide- vapeur en utilisant une équation d'état

La modélisation de la solubilité du CO_2 dans un solvant en utilisant des équations d'état offre un grand avantage par rapport à l'utilisation du coefficient d'activité, puisque ces modèles s'adaptent aux conditions supercritiques. De plus, par cette approche, diverses grandeurs telles que les densités, les enthalpies et autres paramètres thermodynamiques importants de composés purs ou en mélanges peuvent être calculées par l'intermédiaire des fonctions résiduelles [179].

Un grand nombre d'articles décrivent des modèles, des méthodes et des résultats permettant les calculs d'équilibre de phase (liquide-vapeur) ; ils utilisent généralement un même modèle d'équation d'état pour les deux phases [179].

La modélisation est basée sur les coefficients de fugacité de deux phases-liquide et vapeur [180]:

$$f_i^V = y_i \phi_i^V P = x_i \phi_i^L P = f_i^L \qquad \text{(eq 12)}$$

Le facteur K souvent utilisé dans les calculs programmés à l'aide de simulateurs de processus est alors relié aux coefficients de fugacité [180]:

$$K_i = \frac{y_i}{x_i} = \frac{\phi_i^L}{\phi_i^V} \qquad \text{(eq 13)}$$

Pour obtenir la grandeur ϕ_i^V, on doit connaître la composition et le volume molaire de la phase vapeur. De même, pour calculer ϕ_i^L, la composition et le volume molaire de la phase liquide

doivent être connus. Pour obtenir les informations sur le volume molaire des deux phases, la relation PvT peut être résolue à l'aide des équations d'état [180]:

$$P = P(T, v^V, y) = P(T, v^L, x) \qquad \text{(eq 14)}$$

En principe, pour le calcul des équilibres vapeur-liquide, n'importe quelle équation d'état adaptée pour décrire le comportement PvT de la phase vapeur et de la phase liquide peut être utilisée. Par exemple, les équations d'état cubiques, l'équation des coefficients du viriel, ou des équations d'état de Helmholtz sont décrites dans la littérature. Le modèle le plus utililisé dans l'industrie chimique fait appel aux équations d'état cubiques dérivées de l'équation d'état de Van der Waals. La forme générale pour cette équation d'état cubique est [181]:

$$P = \frac{RT}{v - b} - \frac{\Theta (v - \eta)}{(v - b)(v^2 + \delta V + \varepsilon)} \qquad \text{(eq 15)}$$

Où $\Theta(T) = a\,\alpha(T)$ et $\alpha(T_C) = 1$. Les paramètres $\Theta, b, \eta, \delta, \varepsilon$ qui correspondent aux différentes équations d'état cubiques sont résumés dans le Tableau 13 et les fonctions alpha correspondantes sont récapitulées dans le Tableau 14.

Tableau 13: Des paramètres dans différentes équations d'état cubiques.

Equation	Δ	E	Θ	Nombre de paramètres
Van der Waals (1890)	0	0	A	2: a, b
Redlich-Kwong (1949)	B	0	$a\alpha(T_r)$	2: a, b
Peng-Robinson (1976)	2b	$-b^2$	$a\alpha(T_r)$	3: a, b, α(1)
Mathias, et al. (1989)	2b+3c	$2c^2-b^2$	$a\alpha(T_r)$	6: a, b, c, α(3)
Soave (1993)	B	0	$a\alpha(T_r)$	3-4: a, b, α(1-2)
Twu, et. Al (1995)	2b	$-b^2$	$a\alpha(T_r)$	3: a, b, α(1)
Zabaloy-Vera (1998)	2b	$-b^2$	$a\alpha(T_r)$	6-8:a, b, α(4-6)

Tableau 14: Expressions de la fonction alpha utilisée dans différentes équations d'état cubiques.

Equation	$\alpha(T_r)$
Van der Waals (1890)	1
Redlich-Kwong (1949)	$1/T_r^{0.5}$
Peng-Robinson (1976)	$[1+(0.37464+1.54226\,\omega-0.2699\,\omega^2)(1-T_r^{0.5})]^2$
Mathias, et al. (1989)	$[1+c_1(1-T_r^{0.5})+c_2(1-T_r^{0.5})^2+c_3(1-T_r^{0.5})^3]^2$
Soave (1993)	$1+(2.756m-0.7)(1-T_r^{0.5})^2+m(1-T_r)$ $m=0.484+1.515\,\omega-0.44\,\omega^2$
Twu, et. Al (1995)	$T_r^{-0.171813}\exp[0.125283(1-T_r^{1.77634})]$ $+\,\omega\{T_r^{-0.607352}\exp[0.511614(1-T_r^{2.20517}]$ $-T_r^{-0.171813}\exp[0.125283(1-T_r^{1.77634})]\}$
Zabaloy-Vera (1998)	$1+C_1T_r\ln T_r+C_2(T_r-1)+C_3(T_r-1)$

-Règle de mélange: [179]

Pour les équations d'état cubiques, il existe des règles de mélange empiriques décrites dans la littérature et disponibles pour déterminer les coefficients a et b en vue d'étudier la relation PvT d'un mélange. Parmi les plus utilisées, une règle de mélange de type quadratique en concentration appliquée pour le terme d'attraction a est décrite comme suit:

$$a=\sum_i\sum_j z_i z_j a_{ij} \qquad \text{(eq 16)}$$

$$a_{ij}=\left(a_i a_j\right)^{0.5}\left(1-k_{ij}\right) \qquad \text{(eq 17)}$$

Concernant le coeffcient b:

$$b=\sum_i z_i b_i \qquad \text{(eq 18)}$$

où a_i , a_j , b_i sont les paramètres des corps purs dont l'estimation est basée sur les valeurs de pression critique et température critique, z_i est la composition molaire du substance i dans le mélange.

Ces règles de mélange sont valables pour les deux phases-liquide et vapeur en utilisant l'équation suivante[182]:

$$\ln\phi_i = \frac{1}{RT}\int_{\infty}^{V}\left[\frac{RT}{V} - \left(\frac{\partial P}{\partial n_i}\right)_{T,V,n_{j\neq i}}\right]dV - \ln z \quad (19)$$

La fugacité peut être évaluée avec une équation d'état, par exemple, l'équation de Soave-Redlich-Kwong[182]:

$$\ln\phi_i = \ln\frac{v}{v-b} - \frac{2\sum_i z_i a_i}{RTb}\ln\frac{v+b}{v} + \frac{b_i}{v-b} - \ln\frac{Pv}{RT} + \frac{ab_i}{RTb^2}\left(\ln\frac{v+b}{v} - \frac{b}{v+b}\right) \quad (20)$$

Les règles de mélange mentionnées ci-dessus peuvent être appliquées précisément pour des systèmes non-polaire ou peu polaire. Pour des systèmes polaires, il est recommandé d'utiliser des règles de mélange plus poussées qui sont basées sur des modèles prenant en compte l'excès d'énergie de Gibbs (par exemple, les règles de mélange de Huron-Vidal ou Wong-Sandler) [179, 183].

Un exemple de la procédure de calcul de l'équilibre de phase dans le cas iso-thermique est présenté ci-dessous :

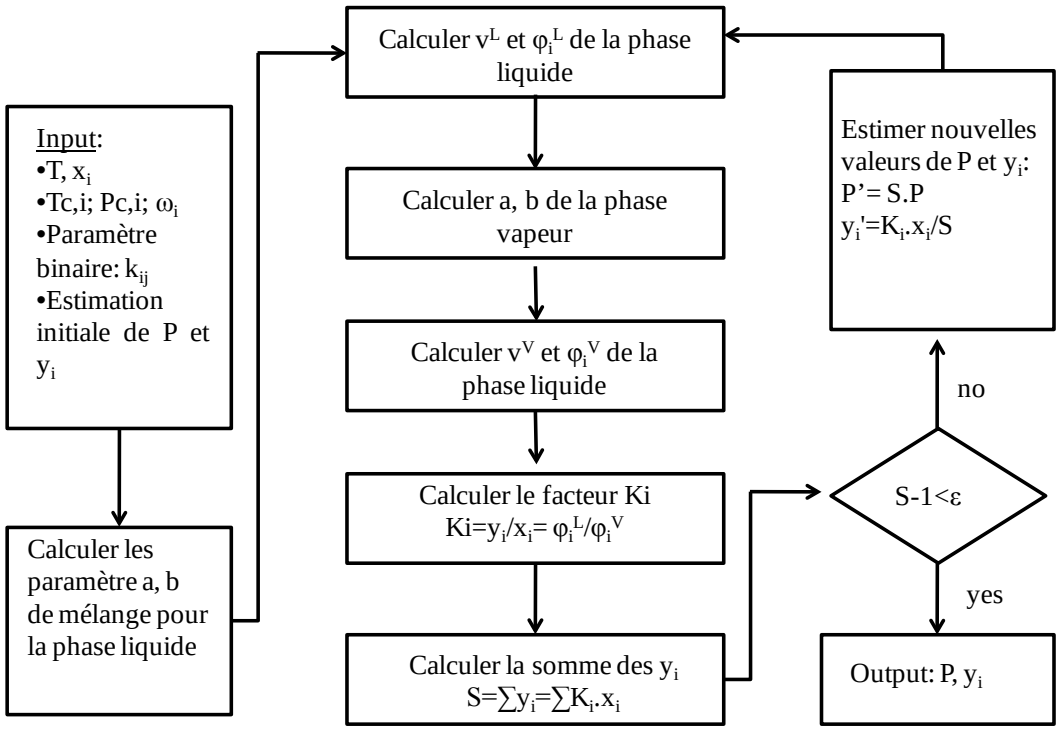


Figure 27: Procédure de calcul de l'équilibre liquide-vapeur dans la condition isothermique en utilisant une équation d'état.

III.2 .METHODOLOGIE DU PLAN D'EXPERIENCE [184-186]

Dans le cadre de cette thèse, il nous est arrivé souvent d'utiliser des plans d'expérience afin d'optimiser le procédé de formulation des particules de PLGA et l'adapter pour l'encapsulation d'une protéine modèle. Nous résumons dans cette partie les notions principales nécessaire à la réalisation d'un plan d'expérience.

III.2.1 Introduction :

En fonction de l'objectif, il est important de choisir la stratégie expérimentale la plus adaptée. On peut regrouper les méthodologies selon les points suivantes :

*Criblage :

Au début d'une étude, nous ne connaissons généralement pas les facteurs qui ont une influence sur les réponses étudiées. Souvent, il existe un ensemble important de facteurs potentiellement influents et il est nécessaire de rechercher ceux qui le sont effectivement dans un domaine expérimental fixé. Il s'agit donc d'effectuer lors d'une ou plusieurs étapes préliminaires un criblage des facteurs pour nous permettre de retenir dans les étapes ultérieures les facteurs les plus importants. Le risque d'écarter un facteur qui se serait révélé intéressant ultérieurement existe donc, mais il est inévitable. Ces plans de criblage permettent donc de diminuer ce risque.

Cette stratégie repose sur l'hypothèse d'additivité, ce qui signifie que la réponse en question est représentée sous forme d'un polynôme du premier degré de la forme:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \cdots + \beta_k X_k \qquad \text{(eq 21)}$$

où: βk est le coefficient représentant le poids du facteur k.

Un exemple typique de ce type de stratégie est l'étude suivante concernant une formulation d'émulsions huile/eau (Tableau 15) [187]. Les auteurs souhaitaient réaliser un criblage parmi un ensemble de facteurs potentiellement influents sur la taille des gouttelettes d'une émulsion qu'ils cherchaient à rendre plus petite.

Tableau 15: Récapitulatif des facteurs

Facteurs	Niveau (-)	Niveau (+)
Phase huileuse	10%	20%
Principe actif	0.5%	1%
Tensioactif	0.5%	1%
pH avant stérilisation	6	8
Durée de la 1ère homogénéisation	3 minutes	7 minutes
Concentration en lipoïd/stearylamine	1%	2%
Durée de l'homogénéisation haute pression	5 minutes	10 minutes

Dans cette étude, la stratégie de criblage a permis aux auteurs de mettre en évidence l'influence significative de 3 facteurs (phase huileuse, concentration en lipoïd/stearylamine, tensioactif) sur la taille des gouttelettes.

*Etude quantitative des facteurs :

Dans le cas où le nombre de facteurs n'est pas trop élevé, l'expérimentateur peut vouloir étudier la possibilité d'existence d'une dépendance (ou d'une interaction) entre les effets (Figure 28). Lorsque les facteurs influents sont connus, nous pouvons dans une deuxième étape les étudier d'une façon plus précise. L'hypothèse d'additivité dans l'étape de criblage sera abandonnée et les interactions entre les facteurs seront prises en compte dans le modèle mathématique suivant:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \cdots + \beta_k X_k$$

$$+ \beta_{12} X_1 X_2 + \cdots + \beta_{k-1,k} X_{k-1} X_k +$$

....

$$+ \beta_{12\ldots k} X_1 X_2 \ldots X_k \qquad \text{(eq 22)}$$

où $\beta_{12\ldots k}$ est l'effet d'interaction du ordre k.

Le modèle mathématique utilisé ci-dessus permet d'obtenir une précision optimale sur les effets calculés. En revanche, l'estimation de tous les effets du modèle complet s'avère couteuse en expériences en raison du grand nombre de coefficients. Si seulement les effets principaux et les interactions d'ordre faible sont recherchés, les matrices d'expériences factorielles fractionnaires seront utiles. Une approche détaillé des plans d'expérience factorielles fractionnaires est décrite par G.A Lewis [184] ou D.C. Montgomery[186].

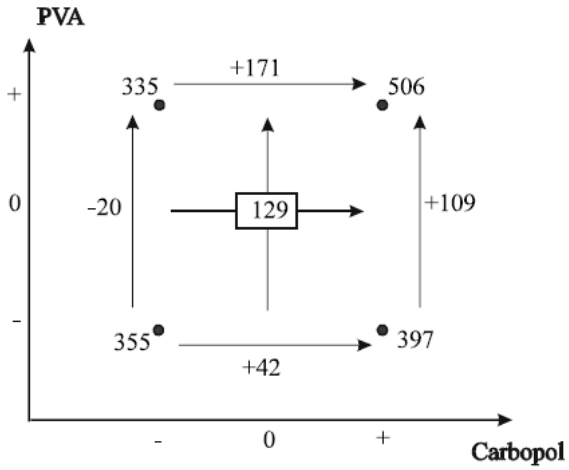


Figure 28: Exemple d'une étude sur l'interaction des facteurs.
La figure montre l'effet d'interaction entre Carbopol et PVA (polyvinyl-alcohol) sur la taille des particules PLGA(nm). On peut observer que lorsque le Carbopol était au niveau (+), l'augmentation de la concentration du PVA a augmenté la taille des particules, ce qui n'a pas été observé lorsque le Carbopol était au niveau (-) (selon [188]).

*Optimisation dans un domaine expérimental :

Après avoir déterminé les facteurs influents ainsi que l'importance des interactions, la suite logique consiste à rechercher l'optimum d'une ou plusieurs réponses expérimentales. Pour cela, les relations existant entre les facteurs et les réponses doivent être déterminées, comme cela est illustré sur la figure 29, dans une étude portant sur l'amélioration du rendement d'encapsulation d'une protéine dans des microsphères de PLGA produites par un procédé d'émulsification/ extraction de solvant. Cet approche est appelée « Méthodologie des surfaces de réponses » et inclut généralement une modélisation mathématique du phénomène étudié[189-191]. Il existe un grand nombre de modèles dont le choix dépend du type de problème étudié : modèles linéaires ou

non linéaires, équations différentielles,…Cependant, les modèles les plus utilisés sont de type polynômes car ils permettent une démarche séquentielle.

L'expérimentation a donc pour but de déterminer la forme de ces relations et les valeurs de coefficients. Mais une prévision n'a guère d'intérêt si on n'en connaît pas la précision. Pour un modèle donné, la précision de la valeur calculée par le modèle dépend de la précision avec laquelle les coefficients ont été obtenus. La valeur des coefficients dépend des résultats expérimentaux, en revanche leur variance ne dépend que de la précision de la mesure expérimentale, de la structure de la matrice d'expériences et du modèle mathématique postulé ; elle est totalement indépendante des résultats expérimentaux. La qualité d'une matrice d'expériences repose, au choix, sur la précision des prévisions dans un domaine donné, ou sur la précision avec laquelle les coefficients seront connus.

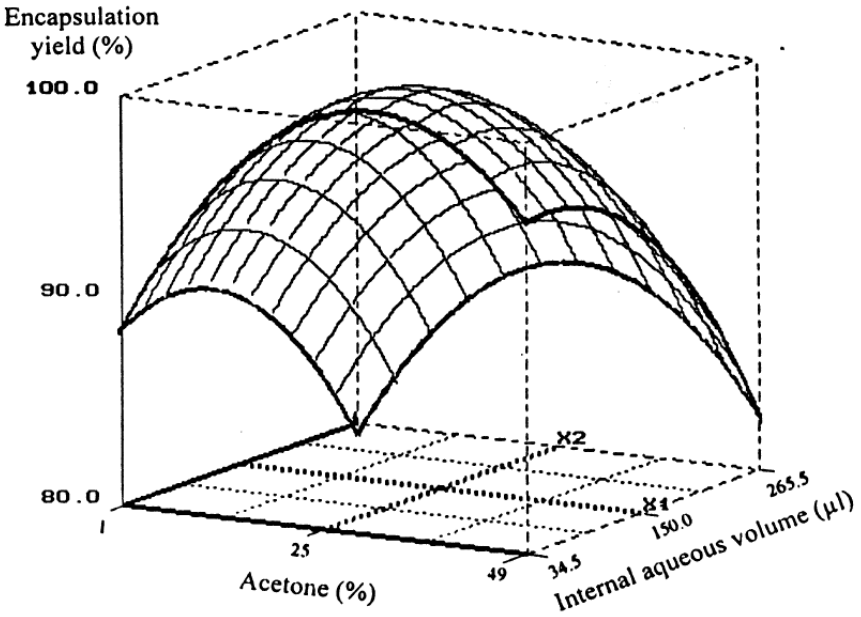


Figure 29: Exemple d'une étude utilisant la méthodologie de surfaces de réponses. La figure montre la relation entre les facteurs influents et la réponse étudiée - le rendement d'encapsulation de HSA dans des particules de PLGA (selon [192])

III.2.2 Critères pour la construction d'une matrice d'expériences dans un domaine d'étude préalablement fixé

Actuellement, il existe des outils puissants qui permettent de construire, selon un problème posé, les stratégies expérimentales les plus informatives possibles. Généralement, on se trouve face à deux situations :

-il existe des matrices d'expériences déjà construites pour les cas dits « classiques », par exemple, composite design, Doehlert, Box-Benken…

-il n'existe pas de matrice d'expériences déjà construits en raison de la spécificité du problème posé, par exemple, le domaine expérimental est non symétrique, le nombre d'expériences est fixé ou le modèle mathématique postulé est particulier,…

Dans la deuxième situation, il est obligé de construire une matrice d'expériences particulière pour tenir compte de toutes les contraintes. Dans cette partie, nous présenterons la méthode qui permet de construire une matrice particulière. Les outils de construction de matrices d'expériences non classiques sont maintenant bien connus et le plus utilisé est basé sur des algorithmes d'échange (« point-exchange algorithm» et « coordinate-exchange algorithm" [185]). Ces algorithmes cherchent les points expérimentaux selon les critères de qualité que l'on souhaite obtenir avec le modèle postulé. Il existe plusieurs critères qui permettent de caractériser la qualité des informations apportées par une matrice d'expérience comme D, I, A, E, G… On peut les regrouper en deux classes suivantes:

-ceux qui permettent d'obtenir une bonne qualité au niveau des coefficients du modèle : D, A,…

-ceux qui permettent d'obtenir une bonne qualité de la prévision apportée par un modèle validé: G, I,…

Pour énoncer ces critères, prenons l'exemple d'un modèle polynomial linéaire :

Posons :

Y: vecteur colonne des réponses expérimentales y_i,

η: vecteur colonne des réponses théoriques,

X: matrice du modèle ou matrice des effets,

β: vecteur colonne des paramètres à estimer β_i,

b: vecteur des estimateurs de β,

ε: vecteur colonne des erreurs expérimentales e_i

Dans une notation matricielle classique, on peut écrire :

$$\eta = X\beta \qquad \text{(eq 23)}$$

$$Y = Xb + \varepsilon \qquad \text{(eq 24)}$$

Si le nombre des expériences est supérieur au nombre des paramètres à estimer, la méthode des moindres carrés permet de calculer les estimations des coefficients du polynôme, c'est-à-dire l'estimation du vecteur β.

La méthode des moindres carrés ne nécessite aucune hypothèse sur la distribution des réponses. Cependant, elle possède certaines propriétés intéressantes sous réserve que les conditions soient satisfaites :

-l'erreur expérimentale doit être distribuée suivant la loi Normale de moyenne 0 et de variance σ^2, ce qui peut s'écrire :

$$\mathrm{E}(e_i) = 0 \qquad \text{(eq 25)}$$

$$\mathrm{var}(e_i) = \sigma^2 \qquad \text{(eq 26)}$$

-les erreurs expérimentales doivent être indépendantes, ce qui signifie :

$$\mathrm{cov}(e_i, e_j) = \sigma^2 \qquad \text{(eq 27)}$$

Ces conditions étant posées, on démontre que le vecteur b, estimateur de β, est obtenu par la formule suivante :

$$\mathrm{b} = (\mathrm{X'X})^{-1}\mathrm{X'Y} \qquad \text{(eq 28)}$$

La qualité de l'estimation b peut être calculée comme suit:

$$\mathrm{var(b)} = (\mathrm{X'X})^{-1}.\ \sigma^2 \qquad \text{(eq 29)}$$

A partir du vecteur b des estimateurs des coefficients, on peut calculer la variance de la réponse en un point quelconque x_i du domaine expérimental :

$$\mathrm{var}(y_i) = f'(x_i)(X'X)^{-1}f(x_i).\ \sigma^2 \qquad \text{(eq 30)}$$

$$\mathrm{var}(y_i) = d(x_i).\ \sigma^2 \qquad \text{(eq 31)}$$

Il convient de souligner que les critères de qualité liés à l'estimation des coefficients sont basés sur l'équation (29) tandis que les critères liés à la prédiction des réponses dans un domaine expérimental fixé avant sont issus de l'équation (31) qui permet d'évaluer la capacité prévisionnelle du modèle [184, 193].

REFERENCES

[1] C. Stevenson, C. Rhodes, S. Prestrelski, Delivery of Peptides and Proteins via Long Acting Injections and Implants, in: J.C. Wright, D.J. Burgess (Eds.) Long Acting Injections and Implants, Springer US, 2012, pp. 409-427.

[2] C.F. van der Walle, O. Olejnik, Chapter 1 - An Overview of the Field of Peptide and Protein Delivery, in: W. Chris Van Der (Ed.) Peptide and Protein Delivery, Academic Press, Boston, 2011, pp. 1-22.

[3] S. Mao, D. Cun, Y. Kawashima, Novel Non-Injectable Formulation Approaches of Peptides and Proteins, in: Delivery Technologies for Biopharmaceuticals, John Wiley & Sons, Ltd, 2009, pp. 29-67.

[4] I. Gonda, Inhalation therapy with recombinant human deoxyribonuclease I, Advanced Drug Delivery Reviews, 19 (1996) 37-46.

[5] V. Torchilin, Anti-Cancer Proteins and Peptides in Liposomes, in: Delivery of Protein and Peptide Drugs in Cancer, pp. 155-182.

[6] W.M. Saltzman, Drug Delivery:Engineering Principles for Drug Therapy, Oxford University Press, USA, 2001.

[7] J.S. Kent, D.H. Lewis, L.M. Sanders, T.R. Tice, Microencapsulation of water soluble active polypeptides, Syntex (U.S.A.) Inc. (Palo Alto, CA), U.S. patent 4,675,189, 1987.

[8] J.C. Wright, A.S. Hoffman, Historical Overview of Long Acting Injections and Implants, in: J.C. Wright, D.J. Burgess (Eds.) Long Acting Injections and Implants, Springer, 2012.

[9] A. Aubert-Pouëssel, M.-C. Venier-Julienne, A. Clavreul, M. Sergent, C. Jollivet, C.N. Montero-Menei, E. Garcion, D.C. Bibby, P. Menei, J.-P. Benoit, In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres, Journal of Controlled Release, 95 (2004) 463-475.

[10] T. Morita, Y. Sakamura, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant, Journal of Controlled Release, 69 (2000) 435-444.

[11] C. Thomasin, H.P. Merkle, B.A. Gander, Physico-chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation, International Journal of Pharmaceutics, 147 (1997) 173-186.

[12] J. Kluge, F. Fusaro, N. Casas, M. Mazzotti, G. Muhrer, Production of PLGA micro- and nanocomposites by supercritical fluid extraction of emulsions: I. Encapsulation of lysozyme, The Journal of Supercritical Fluids, 50 (2009) 327-335.

[13] B. Gander, P. Johansen, H. Nam-Trân, H.P. Merkle, Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly(D,L-lactide) by spray drying, International Journal of Pharmaceutics, 129 (1996) 51-61.

[14] Z. Knez, E. Weidner, Precipitation of solids with dense gases, in: A. Bertucco, G. Vetter (Eds.) High Pressure Process Technology: Fundamentals and Applications, Elsevier Science Limited, 2001.

[15] G.S. Kwon, Improving the Stability of PLGA-encapsulated proteins., in: Polymeric drug delivery systems, Taylor & Francis, 2005, pp. 381-416.

[16] V.-T. Tran, J.-P. Karam, X. Garric, J. Coudane, J.-P. Benoît, C.N. Montero-Menei, M.-C. Venier-Julienne, Protein-loaded PLGA–PEG–PLGA microspheres: A tool for cell therapy, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 45 (2012) 128-137.

[17] S.P. Schwendeman, M. Tobío, M. Joworowicz, M.j. Alonso, R. Langer, New strategies for the microencapsulation of tetanus vaccine, Journal of Microencapsulation, 15 (1998) 299-318.

[18] K.G. Carrasquillo, A.M. Stanley, J.C. Aponte-Carro, P. De Jésus, H.R. Costantino, C.J. Bosques, K. Griebenow, Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein, Journal of Controlled Release, 76 (2001) 199-208.

[19] P. Kinam, Y. Yoon, Microencapsulation of Protein Drugs, in: Tissue Engineering And Novel Delivery Systems, CRC Press, 2003, pp. 315.

[20] C. Thomasin, H. Nam-Trân, H.P. Merkle, B. Gander, Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 1. Overview and theoretical considerations, Journal of Pharmaceutical Sciences, 87 (1998) 259-268.

[21] J.L. Zaro, W.-C. Shen, J. Wang, Modifying the Physicochemical Nature of Biodrugs by Reversible Lipidization, in: Biodrug Delivery Systems: Fundamentals, Applications, and Clinical Development, 2010, pp. 309-322.

[22] F.M. Veronese, Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions, Biomaterials, 22 (2001) 405-417.

[23] F.M. Veronese, J.M. Harris, Introduction and overview of peptide and protein pegylation, Advanced Drug Delivery Reviews, 54 (2002) 453-456.

[24] P. Caliceti, F.M. Veronese, Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)–protein conjugates, Advanced Drug Delivery Reviews, 55 (2003) 1261-1277.

[25] N.V. Katre, The conjugation of proteins with polyethylene glycol and other polymers: Altering properties of proteins to enhance their therapeutic potential, Advanced Drug Delivery Reviews, 10 (1993) 91-114.

[26] U.B. Kompella, V.H.L. Lee, Pharmacokinetics of peptide and protein drugs, in: V.H.L. Lee (Ed.) Peptide Protein Drug Delivery, Dekker, 1991.

[27] S. Salmaso, P. Caliceti, Chapter 11 - Peptide and Protein Bioconjugation: A Useful Tool to Improve the Biological Performance of Biotech Drugs, in: W. Chris Van Der (Ed.) Peptide and Protein Delivery, Academic Press, Boston, 2011, pp. 247-290.

[28] T. Yamaoka, Y. Tabata, I. Ikada, Fate of water-soluble polymers administered via different routes, J Pharm Sci., (1995) 349-354.

[29] B. Chen, K. Jerger, J.M.J. Fréchet, F.C. Szoka Jr, The influence of polymer topology on pharmacokinetics: Differences between cyclic and linear PEGylated poly(acrylic acid) comb polymers, Journal of Controlled Release, 140 (2009) 203-209.

[30] M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, Pharmacokinetic Consequences of Pegylation, Drug Delivery, 13 (2006) 399-409.

[31] Y. Yabe, M. Nishikawa, A. Tamada, Y. Takakura, M. Hashida, Targeted Delivery and Improved Therapeutic Potential of Catalase by Chemical Modification: Combination with Superoxide Dismutase Derivatives, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 289 (1999) 1176-1184.

[32] U.K. Narta, S.S. Kanwar, W. Azmi, Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia, Critical Reviews in Oncology/Hematology, 61 (2007) 208-221.

[33] P. Glue, J.W.S. Fang, R. Rouzier-Panis, C. Raffanel, R. Sabo, S.K. Gupta, M. Salfi, S. Jacobs, PEGinterferon-a2b: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and preliminary efficacy data, Clin. Pharmacol. Ther., (2000) 556-567.

[34] M. Silva, J. Poo, F. Wagner, M. Jackson, D. Cutler, M. Grace, R. Bordens, C. Cullen, J. Harvey, M. Laughlin, A randomised trial to compare the pharmacokinetic, pharmacodynamic, and antiviral effects of peginterferon alfa-2b and peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C (COMPARE), Journal of Hepatology, 45 (2006) 204-213.

[35] F. Sierra, Peginterferon alfa-2b vs. peginterferon alfa-2a in the treatment of hepatitis C, is there any difference?, Journal of Hepatology, 46 (2007) 349.

[36] M. Modi, M. Lamb, M. Shiomi, Peginterferon alfa-2a (40KD): A Potent Long-Acting Form of Interferon alfa-2a for the Treatment of Hepatitis C, in: H. Maeda, A. Kabanov, K. Kataoka, T. Okano (Eds.) Polymer Drugs in the Clinical Stage, Springer US, 2004, pp. 59-67.

[37] T. Musacchio, V.P. Torchilin, Lipid-Based Delivery Systems: Liposomes and Lipid-Core Micelles—Properties and Applications, in: Biodrug Delivery Systems: Fundamentals, Applications, and Clinical Development, 2010, pp. 260-292.

[38] G. Gregoriadis, Liposome Technology: Liposome Preparation and Related Techniques, Volume 1, CRC PressINC, 2007.

[39] V. Torchilin, V. Weissig, Liposomes: A Practical Approach, OUP Oxford, 2003.

[40] T. Vladimir, Liposomal Delivery of Protein and Peptide Drugs, in: Biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids, CRC Press, 2004.

[41] B.L. Asselin, The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia, Adv Exp Med Biol, 457 (1999) 621-629.

[42] M.L. Jeffrey F. Ellena, David S. Cafiso, Rosa M. Solis, Melissa Langston, Mantripragada B. Sankaram, Distribution of Phospholipids and Triglycerides in Multivesicular Lipid Particles, Drug Delivery, 6 (1999) 97-106.

[43] W.J. Lambert, K. Los, DepoFoam® Multivesicular Liposomes for the Sustained Release of Macromolecules, in: Modified-Release Drug Delivery Technology, 2003, pp. 207-214.

[44] S. Mantripragada, A lipid based depot (DepoFoam® technology) for sustained release drug delivery, Progress in Lipid Research, 41 (2002) 392-406.

[45] J.R. Philippot, F. Schuber, Liposomes As Tools in Basic Research and Industry, Taylor & Francis Group, 1995.

[46] S. Kim, Cyclodextrin liposomes encapsulating pharmacologic compounds and methods for their use, in, US patent 5,759,573, 1998.

[47] S.K. MB Sankaram, Multivesicular liposomes with controlled release of encapsulated biologically active substances, in, US patent 5,766,627, 1998.

[48] R. Willis, Method for utilizing neutral lipids to modify in vivo release from multivesicular liposomes, in, US patent 5,891,467, 1999.

[49] S.K. MB Sankaram, Preparation of multivesicular liposomes for controlled release of encapsulated biologically active substances, in, US patent 5,993,850, 1999.

[50] M.S. Q Ye, Method for producing liposomes with increased percent of compound encapsulated., in, US patent 5,997,899, 1999.

[51] N.K. Q Ye, MB Sankaram, Modulation of drug loading in multivesicular liposomes., in, US patent 6,106,858, 2002.

[52] Q. Ye, J. Asherman, M. Stevenson, E. Brownson, N.V. Katre, DepoFoam™ technology: a vehicle for controlled delivery of protein and peptide drugs, Journal of Controlled Release, 64 (2000) 155-166.

[53] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, Advanced Drug Delivery Reviews, 54 (2002) 3-12.

[54] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50 (2000) 27-46.

[55] K.T. Nguyen, J.L. West, Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications, Biomaterials, 23 (2002) 4307-4314.

[56] T. Kissel, Y. Li, F. Unger, ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins, Advanced Drug Delivery Reviews, 54 (2002) 99-134.

[57] K.S. Anseth, A.T. Metters, S.J. Bryant, P.J. Martens, J.H. Elisseeff, C.N. Bowman, In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery, Journal of Controlled Release, 78 (2002) 199-209.

[58] K.Y. Lee, D.J. Mooney, Hydrogels for Tissue Engineering, Chemical Reviews, 101 (2001) 1869-1880.

[59] W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, Advanced Drug Delivery Reviews, 64, Supplement (2012) 223-236.

[60] G.S. Kwon, Polymeric Drug Delivery Systems, Taylor & Francis, 2005.

[61] H.-C. Chiu, G.-H. Hsiue, Y.-P. Lee, L.-W. Huang, Synthesis and characterization of pH-sensitive dextran hydrogels as a potential colon-specific drug delivery system, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 10 (1999) 591-608.

[62] H. Brøndsted, C. Andersen, L. Hovgaard, Crosslinked dextran — a new capsule material for colon targeting of drugs, Journal of Controlled Release, 53 (1998) 7-13.

[63] O. Franssen, R.D. van Ooijen, D. de Boer, R.A.A. Maes, W.E. Hennink, Enzymatic Degradation of Cross-Linked Dextrans, Macromolecules, 32 (1999) 2896-2902.

[64] T.K.L. Meyvis, S.C. De Smedt, J. Demeester, W.E. Hennink, Rheological monitoring of long-term degrading polymer hydrogels, Journal of Rheology, 43 (1999) 933-950.

[65] O. Franssen, O.P. Vos, W.E. Hennink, Delayed release of a model protein from enzymatically-degrading dextran hydrogels, Journal of Controlled Release, 44 (1997) 237-245.

[66] W.N.E. van Dijk-Wolthuls, S.K.Y. Tsang, J.J. Kettenes-van den BoschW.E. Hennink, A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer, Polymer, 38 (1997) 6235-6242.

[67] W.N.E. van Dijk-Wolthuis, J.A.M. Hoogeboom, M.J. van Steenbergen, S.K.Y. Tsang, W.E. Hennink, Degradation and Release Behavior of Dextran-Based Hydrogels, Macromolecules, 30 (1997) 4639-4645.

[68] J.A. Cadée, M. De Kerf, C.J. De Groot, W. Den Otter, W.E. Hennink, Synthesis, characterization of 2-(methacryloyloxy)ethyl-(di-) l-lactate and their application in dextran-based hydrogels, Polymer, 40 (1999) 6877-6881.

[69] J.A. Cadée, M.J.A. van Luyn, L.A. Brouwer, J.A. Plantinga, P.B. van Wachem, C.J. de Groot, W. den Otter, W.E. Hennink, In vivo biocompatibility of dextran-based hydrogels, Journal of Biomedical Materials Research, 50 (2000) 397-404.

[70] J.A. Cadée, L.A. Brouwer, W. den Otter, W.E. Hennink, M.J.A. van Luyn, A comparative biocompatibility study of microspheres based on crosslinked dextran or poly(lactic-co-glycolic)acid after subcutaneous injection in rats, Journal of Biomedical Materials Research, 56 (2001) 600-609.

[71] O. Franssen, L. Vandervennet, P. Roders, W.E. Hennink, Degradable dextran hydrogels: controlled release of a model protein from cylinders and microspheres, Journal of Controlled Release, 60 (1999) 211-221.

[72] R.H. Stenekes, O. Franssen, E.G. van Bommel, D.A. Crommelin, W. Hennink, The Preparation of Dextran Microspheres in an All-Aqueous System: Effect of the Formulation Parameters on Particle Characteristics, Pharmaceutical Research, 15 (1998) 557-561.

[73] S.J. de Jong, S.C. De Smedt, M.W.C. Wahls, J. Demeester, J.J. Kettenes-van den Bosch, W.E. Hennink, Novel Self-assembled Hydrogels by Stereocomplex Formation in Aqueous Solution of Enantiomeric Lactic Acid Oligomers Grafted To Dextran, Macromolecules, 33 (2000) 3680-3686.

[74] D.W. Lim, S.H. Choi, T.G. Park, A new class of biodegradable hydrogels stereocomplexed by enantiomeric oligo(lactide) side chains of poly(HEMA-g-OLA)s, Macromolecular Rapid Communications, 21 (2000) 464-471.

[75] S. Li, M. Vert, Synthesis, Characterization, and Stereocomplex-Induced Gelation of Block Copolymers Prepared by Ring-Opening Polymerization of l(d)-Lactide in the Presence of Poly(ethylene glycol), Macromolecules, 36 (2003) 8008-8014.

[76] S.J. de Jong, B. van Eerdenbrugh, C.F. van Nostrum, J.J. Kettenes-van den Bosch, W.E. Hennink, Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: degradation and protein release behavior, Journal of Controlled Release, 71 (2001) 261-275.

[77] G.M. Zentner, R. Rathi, C. Shih, J.C. McRea, M.-H. Seo, H. Oh, B.G. Rhee, J. Mestecky, Z. Moldoveanu, M. Morgan, S. Weitman, Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs, Journal of Controlled Release, 72 (2001) 203-215.

[78] B. Jeong, S.W. Kim, Y.H. Bae, Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels, Advanced Drug Delivery Reviews, 54 (2002) 37-51.

[79] C.K. Han, Y.H. Bae, Inverse thermally-reversible gelation of aqueous N-isopropylacrylamide copolymer solutions, Polymer, 39 (1998) 2809-2814.

[80] B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof, Journal of Biomedical Materials Research, 50 (2000) 171-177.

[81] B. Jeong, Y.H. Bae, D.S. Lee, S.W. Kim, Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems, Nature, (1997) 860-862.

[82] S. Choi, S. Kim, Controlled Release of Insulin from Injectable Biodegradable Triblock Copolymer Depot in ZDF Rats, Pharmaceutical Research, 20 (2003) 2008-2010.

[83] T. Vermonden, R. Censi, W.E. Hennink, Hydrogels for Protein Delivery, Chemical Reviews, 112 (2012) 2853-2888.

[84] Y. Kwon, S. Kim, Biodegradable Triblock Copolymer Microspheres Based on Thermosensitive Sol-Gel Transition, Pharmaceutical Research, 21 (2004) 339-343.

[85] L.W. Tammy, W.M. Saltzman, Protein Delivery from Nondegradable Polymer Matrices, in: L.M. Sanders, R.W. Hendren (Eds.) Protein Delivery: Physical Systems, Springer, 1997.

[86] M.L. Frank, A.N. Poindexter, M.L. Johnson, L. Bateman, Characteristics and attitudes of early contraceptive implant acceptors, Family Planning Perspect, (1992) 208.

[87] M.L. Radomsky, K.J. Whaley, R.A. Cone, W.M. Saltzman, Controlled vaginal delivery of antibodies in the mouse, Biology of Reproduction, 47 (1992) 133-140.

[88] J.K. Sherwood, R.B. Dause, W.M. Saltzman, Controlled Antibody Delivery Systems, Nat Biotech, 10 (1992) 1446-1449.

[89] W.M. Saltzman, A microstructural approach for modelling diffusion of bioactive macromolecules in porous polymers, in: MIT Division of Health Sciences and Technology, Harvard University, Massachusetts Institute of Technology, 1987.

[90] C.L. Stevenson, F. Theeuwes, J.C. Wright, Osmotic Implantable Delivery Systems, in: D.L. Wise (Ed.) Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology, Marcel Dekker, 2000.

[91] J.c. Wright, J. Culwell, Long-Term Controlled Delivery of Therapeutic Agents by the Osmotically Driven DUROS® Implant, in: Modified-Release Drug Delivery Technology, 2003, pp. 143-149.

[92] E.J. Dadey, The Atrigel® Drug Delivery System, in: Modified-Release Drug Delivery Technology, 2003, pp. 183-190.

[93] M. Chasin, R.S. Langer, Biodegradable Polymers As Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, 1990.

[94] H.B. Ravivarapu, K.L. Moyer, R.L. Dunn, Parameters affecting the efficacy of a sustained release polymeric implant of leuprolide, International Journal of Pharmaceutics, 194 (2000) 181-191.

[95] H.B. Ravivarapu, K.L. Moyer, R.L. Dunn, Sustained suppression of pituitary-gonadal axis with an injectable, in situ forming implant of leuprolide acetate, Journal of Pharmaceutical Sciences, 89 (2000) 732-741.

[96] G. Chen, G. Junnarkar, ALZAMER® Depot™ Bioerodible Polymer Technology, in: Modified-Release Drug Delivery Technology, 2003, pp. 215-226.

[97] O.L. Johnson, P. Herbert, J.C. Wright, Long-acting Protein Formulations-Prolease Technology, in: Modified-Release Drug Delivery Technology, 2003, pp. 671-677.

[98] H. Okada, Depot Injectable Microcapsules of Leuprorelin Acetate (Lupron Depot), in: Biodrug Delivery Systems: Fundamentals, Applications, and Clinical Development, 2010, pp. 370-383.

[99] A.J. Tipton, R.J. Holl, High-viscosity liquid controlled-delivery system, in, US, 1998.

[100] J.E. Nally, S. Artiushin, A.S. Sheoran, P.J. Burns, B. Simon, R.M. Gilley, J. Gibson, S. Sullivan, J.F. Timoney, Induction of mucosal and systemic antibody specific for SeMF3 of Streptococcus equi by intranasal vaccination using a sucrose acetate isobutyrate based delivery system, Vaccine, 19 (2000) 492-497.

[101] P.J. Burns, J.J. Fleury, J. Gibson, S. Sullivan, A. Tipton, Evaluation of the saber™ delivery system for the controlled release of deslorelin acetate for advancing ovulation in the mare: Effects of formulation & dose, Theriogenology, 49 (1998) 256.

[102] L.O.J. JL Cleland, S Darling, AJ Tipton, GM Zentner, SA Sullivan, JW Gibson, FW Okumu, Depot delivery of proteins in the new millennium: from microspheres to injectable gels, in: 6th European Symposium on Controlled Drug Delivery, The Netherlands, April 12, 2000.

[103] M.v.d. Weert, Delivery Technologies for Biopharmaceuticals: A Critical Assessment, in: Delivery Technologies for Biopharmaceuticals, John Wiley & Sons, Ltd, 2009, pp. 405-412.

[104] K. Reddy, Controlled-release, pegylation, liposomal formulations: new mechanisms in the delivery of injectable drugs, The Annals of Pharmacotherapy, 34 (2000) 915-923.

[105] J. Armstrong, The occurrence, induction, specificity and potential effect of antibodies against poly(ethylene glycol), in: F. Veronese (Ed.) PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications, Birkhäuser Basel, 2009, pp. 147-168.

[106] M. Sipai Altaf Bhai, Y. Vadana, Y. Mamatha, V. Prasanth V, Liposomes:an overview, Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation, 1 (2012).

[107] J. Szebeni, F. Muggia, A. Gabizon, Y. Barenholz, Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: Prediction and prevention, Advanced Drug Delivery Reviews, 63 (2011) 1020-1030.

[108] J. Szebeni, P. Bedőcs, R. Urbanics, R. Bünger, L. Rosivall, M. Tóth, Y. Barenholz, Prevention of infusion reactions to PEGylated liposomal doxorubicin via tachyphylaxis induction by placebo vesicles: A porcine model, Journal of Controlled Release, 160 (2012) 382-387.

[109] U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 59 (2005) 375-388.

[110] A. Giteau, M.C. Venier-Julienne, A. Aubert-Pouëssel, J.P. Benoit, How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?, International Journal of Pharmaceutics, 350 (2008) 14-26.

[111] A. Rawat, D.J. Burgess, Parenteral Delivery of Peptides and Proteins, in: Biodrug Delivery Systems: Fundamentals, Applications, and Clinical Development, 2010, pp. 50-68.

[112] M. Li, O. Rouaud, D. Poncelet, Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches, International Journal of Pharmaceutics, 363 (2008) 26-39.

[113] S. Kumar, R. Kumar, K.S. Gandhi, A simplified procedure for predicting dmax in stirred vessels, Chemical Engineering Science, 48 (1993) 3092-3096.

[114] Y.-F. Maa, C. Hsu, Microencapsulation reactor scale-up by dimensional analysis, Journal of Microencapsulation, 13 (1996) 53-66.

[115] E.G. Chatzi, C.J. Boutris, C. Kiparissides, On-line monitoring of drop size distributions in agitated vessels. 1. Effects of temperature and impeller speed, Industrial & Engineering Chemistry Research, 30 (1991) 536-543.

[116] H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, Y. Kawashima, Preparation of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method, International Journal of Pharmaceutics, 187 (1999) 143-152.

[117] A. Fernández-Carballido, R. Herrero-Vanrell, I.T. Molina-Martínez, P. Pastoriza, Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration: Effect of Labrafil addition on release in vitro, International Journal of Pharmaceutics, 279 (2004) 33-41.

[118] N. Faisant, J. Siepmann, J.P. Benoit, PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 15 (2002) 355-366.

[119] K.C. Song, H.S. Lee, I.Y. Choung, K.I. Cho, Y. Ahn, E.J. Choi, The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 276 (2006) 162-167.

[120] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, Polymers, 3 (2011) 1377-1397.

[121] D. Blanco, M.a.J. Alonso, Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 45 (1998) 285-294.

[122] M.F. Laurent A, Chapot R, Zhang JQ, Jordan O, Rüfenacht DA, Doelker E, Merland JJ, Cardiovascular effects of selected water-miscible solvents for pharmaceutical injections and embolization materials: a comparative hemodynamic study using a sheep model, PDA J Pharm Sci Technol., 61 (2007 Mar-Apr) 64-74.

[123] S.M. Mottu F, Rüfenacht DA, Doelker E, Comparative hemolytic activity of undiluted organic water-miscible solvents for intravenous and intra-arterial injection, PDA J Pharm Sci Technol., 55 (2001) 16-23.

[124] P.-E. Le Renard, O. Jordan, A. Faes, A. Petri-Fink, H. Hofmann, D. Rüfenacht, F. Bosman, F. Buchegger, E. Doelker, The in vivo performance of magnetic particle-loaded injectable, in situ gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia, Biomaterials, 31 (2010) 691-705.

[125] Mottu F, Stelling MJ, Rüfenacht DA, D. E., Comparative hemolytic activity of undiluted organic water-miscible solvents for intravenous and intra-arterial injection, PDA J Pharm Sci Technol, 55 (2001) 16-23.

[126] Dudeck O, Jordan O, Hoffmann KT, Okuducu AF, Tesmer K, Kreuzer-Nagy T, Rüfenacht DA, Doelker E, F. R., Organic solvents as vehicles for precipitating liquid embolics: a comparative angiotoxicity study with superselective injections of swine rete mirabile, AJNR Am J Neuroradiol, 27 (2006) 1900-1906.

[127] D. Morgan, Y. ZHU, M. Valérie, F. Thierry, A. Jean-Marie, Solubilizing and Hydrotropic Properties of Isosorbide Monoalkyl- and Dimethyl-Ethers, Journal of surfactants and detergents, 12 (2009) 371-378.

[128] M. Durand, A. Mouret, V. Molinier, T. Féron, J.-M. Aubry, Bitumen fluxing properties of a new class of sustainable solvents: The isosorbide di-alkyl ethers, Fuel, 89 (2010) 2729-2734.

[129] Arlasolve DMI in, National industrial chemicals notification and assessment scheme 2004.

[130] C.B. Andrew, A.P. Znaiden, A. Johnson, Activity enhancement of ferulic acid with dimethyl isosorbride in cosmetic compositions, in, Japan, 1998.

[131] Otto A, Wiechers JW, Kelly CL, Hadgraf, Effect of Penetration Modifiers on the Dermal and Transdermal Delivery of Drugs and Cosmetic Active Ingredients, Skin Pharmacol Physiol, 21 (2008) 326-334.

[132] L.A. Luzzi, J. K, Dimethyl isosorbide in liquid formulation of aspirin, in, 1980.

[133] A. Aubert-Pouëssel, M.-C. Venier-Julienne, P. Saulnier, M. Sergent, J.-P. Benoît, Preparation of PLGA Microparticles by an Emulsion-Extraction Process Using Glycofurol as Polymer Solvent, Pharmaceutical Research, 21 (2004) 2384-2391.

[134] Raymond C Rowe, Paul J Cheskey, M.E. Quinn, Handbook of pharmaceutical excipients 327-328.

[135] V.D. Ivaturi, J.R. Riss, R.L. Kriel, R.A. Siegel, J.C. Cloyd, Bioavailability and tolerability of intranasal diazepam in healthy adult volunteers, Epilepsy Research, 84 (2009) 120-126.

[136] S. Gizurarson, G. Georgsson, H. Aggerbeck, H. Thorarinsdottir, I. Heron, Evaluation of local toxicity after repeated intranasal vaccination of guinea-pigs, Toxicology, 107 (1996) 61-68.

[137] R. Eliaz, D. Wallach, J. Kost, Delivery of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor from In-Situ Forming PLGA Implants: In-Vivo, Pharmaceutical Research, 17 (2000) 1546-1550.

[138] Eliaz RE, S.F. Jr, Robust and prolonged gene expression from injectable polymeric implants, Gene Ther, 9 (2002) 1230-1237.

[139] M.A. Bagger, H.W. Nielsen, E. Bechgaard, Nasal bioavailability of peptide T in rabbits: absorption enhancement by sodium glycocholate and glycofurol, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 14 (2001) 69-74.

[140] D. Allhenn, A. Lamprecht, Microsphere Preparation Using the Untoxic Solvent Glycofurol, Pharmaceutical Research, 28 (2010) 563-571.

[141] Z. Knez, E. Weidner, Precipitation of solids with dense gases, in: A. Bertucco, G. Vetter (Eds.) High Pressure Process Technology: fundamentals and applications: fundamentals and applications, Elsevier Science, 2001.

[142] P.G. Debenedetti, Homogeneous nucleation in supercritical fluids, AIChE Journal, 36 (1990) 1289-1298.

[143] Mamata, Mukhopadhyay, Phase Equilibrium in Solid-Liquid-Supercritical Fluid Systems, in: Supercritical Fluid Technology for Drug Product Development, Informa Healthcare, 2004.

[144] K. Matsuyama, Z. Donghui, T. Urabe, K. Mishima, Formation of l-poly(lactic acid) microspheres by rapid expansion of CO2 saturated polymer suspensions, The Journal of Supercritical Fluids, 33 (2005) 275-281.

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

[146] J.-H. Kim, T.E. Paxton, D.L. Tomasko, Microencapsulation of Naproxen Using Rapid Expansion of Supercritical Solutions, Biotechnology Progress, 12 (1996) 650-661.

[147] J.W. Tom, P.G. Debenedetti, R. Jerome, Precipitation of poly(l-lactic acid) and composite poly(l-lactic acid)-pyrene particles by rapid expansion of supercritical solutions, The Journal of Supercritical Fluids, 7 (1994) 9-29.

[148] J.W. Tom, P.G. Debenedetti, Formation of Bioerodible Polymeric Microspheres and Microparticles by Rapid Expansion of Supercritical Solutions, Biotechnology Progress, 7 (1991) 403-411.

[149] W. Tom Jean, G.-B. Lim, G. Debenedetti Pablo, K. Prud'homme Robert, Applications of Supercritical Fluids in the Controlled Release of Drugs, in: Supercritical Fluid Engineering Science, American Chemical Society, 1992, pp. 238-257.

[150] M. Imran ul-haq, A. Acosta-Ramírez, P. Mehrkhodavandi, R. Signorell, Influence of polydispersity of poly(lactic acid) on particle formation by rapid expansion of supercritical CO2 solutions, The Journal of Supercritical Fluids, 51 (2010) 376-383.

[151] A. Sane, M.C. Thies, Effect of material properties and processing conditions on RESS of poly(l-lactide), The Journal of Supercritical Fluids, 40 (2007) 134-143.

[152] P.M. Gallagher, M.P. Coffey, V.J. Krukonis, N. Klasutis, Gas Antisolvent Recrystallization: New Process To Recrystallize Compounds Insoluble in Supercritical Fluids, in: Supercritical Fluid Science and Technology, American Chemical Society, 1989, pp. 334-354.

[153] The Boltzmann Equation, Fluid Dynamics, and Irreversibility, in: Kinetic Theory, Springer New York, 2003, pp. 137-277.

[154] B. Subramaniam, R.A. Rajewski, K. Snavely, Pharmaceutical processing with supercritical carbon dioxide, Journal of Pharmaceutical Sciences, 86 (1997) 885-890.

[155] T.W. Randolph, A.D. Randolph, M. Mebes, S. Yeung, Sub-Micrometer-Sized Biodegradable Particles of Poly(L-Lactic Acid) via the Gas Antisolvent Spray Precipitation Process, Biotechnology Progress, 9 (1993) 429-435.

[156] M. Rantakylä, M. Jäntti, O. Aaltonen, M. Hurme, The effect of initial drop size on particle size in the supercritical antisolvent precipitation (SAS) technique, The Journal of Supercritical Fluids, 24 (2002) 251-263.

[157] L.S. Tu, F. Dehghani, N.R. Foster, Micronisation and microencapsulation of pharmaceuticals using a carbon dioxide antisolvent, Powder Technology, 126 (2002) 134-149.

[158] T. Martin, N. Bandi, R. Shulz, C. Roberts, U. Kompella, Preparation of budesonide and budesonide-PLA microparticles using supercritical fluid precipitation technology, AAPS PharmSciTech, 3 (2002) 16-26.

[159] O. Boutin, E. Badens, E. Carretier, G. Charbit, Co-precipitation of a herbicide and biodegradable materials by the supercritical anti-solvent technique, The Journal of Supercritical Fluids, 31 (2004) 89-99.

[160] C. Bitz, E. Doelker, Influence of the preparation method on residual solvents in biodegradable microspheres, International Journal of Pharmaceutics, 131 (1996) 171-181.

[161] N. Elvassore, A. Bertucco, P. Caliceti, Production of Protein-Loaded Polymeric Microcapsules by Compressed CO2 in a Mixed Solvent, Industrial & Engineering Chemistry Research, 40 (2001) 795-800.

[162] A.-Z. Chen, X.-M. Pu, Y.-Q. Kang, L. Liao, Y.-D. Yao, G.-F. Yin, Study of poly(l-lactide) microparticles based on supercritical CO2, J Mater Sci: Mater Med, 18 (2007) 2339-2345.

[163] C.G. Kalogiannis, C.M. Michailof, C.G. Panayiotou, Microencapsulation of Amoxicillin in Poly(l-lactic acid) by Supercritical Antisolvent Precipitation, Industrial & Engineering Chemistry Research, 45 (2006) 8738-8743.

[164] M.Y. Kim, Y.W. Lee, H.-S. Byun, J.S. Lim, Recrystallization of Poly(l-lactic acid) into Submicrometer Particles in Supercritical Carbon Dioxide, Industrial & Engineering Chemistry Research, 45 (2005) 3388-3392.

[165] O. Boutin, C. Maruejouls, G. Charbit, A new system for particle formation using the principle of the SAS process: The Concentric Tube Antisolvent Reactor (CTAR), The Journal of Supercritical Fluids, 40 (2007) 443-451.

[166] E. Reverchon, R. Adami, G. Caputo, I. De Marco, Spherical microparticles production by supercritical antisolvent precipitation: Interpretation of results, The Journal of Supercritical Fluids, 47 (2008) 70-84.

[167] Y. Wang, R. Pfeffer, R. Dave, R. Enick, Polymer encapsulation of fine particles by a supercritical antisolvent process, AIChE Journal, 51 (2005) 440-455.

[168] E. Weidner, V. Wiesmet, Ž. Knez, M. Škerget, Phase equilibrium (solid-liquid-gas) in polyethyleneglycol-carbon dioxide systems, The Journal of Supercritical Fluids, 10 (1997) 139-147.

[169] L. Casettari, E. Castagnino, S. Stolnik, A. Lewis, S. Howdle, L. Illum, Surface Characterisation of Bioadhesive PLGA/Chitosan Microparticles Produced by Supercritical Fluid Technology, Pharmaceutical Research, 28 (2011) 1668-1682.

[170] J. Hao, M.J. Whitaker, B. Wong, G. Serhatkulu, K.M. Shakesheff, S.M. Howdle, Plasticization and spraying of poly (DL-lactic acid) using supercritical carbon dioxide: control of particle size, Journal of Pharmaceutical Sciences, 93 (2004) 1083-1090.

[171] M.J. Whitaker, J. Hao, O.R. Davies, G. Serhatkulu, S. Stolnik-Trenkic, S.M. Howdle, K.M. Shakesheff, The production of protein-loaded microparticles by supercritical fluid enhanced mixing and spraying, Journal of Controlled Release, 101 (2005) 85-92.

[172] T.J. Young, K.P. Johnston, K. Mishima, H. Tanaka, Encapsulation of lysozyme in a biodegradable polymer by precipitation with a vapor-over-liquid antisolvent, Journal of Pharmaceutical Sciences, 88 (1999) 640-650.

[173] K. Mishima, K. Matsuyama, D. Tanabe, S. Yamauchi, T.J. Young, K.P. Johnston, Microencapsulation of proteins by rapid expansion of supercritical solution with a nonsolvent, AIChE Journal, 46 (2000) 857-865.

[174] P. Caliceti, S. Salmaso, N. Elvassore, A. Bertucco, Effective protein release from PEG/PLA nano-particles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques, Journal of Controlled Release, 94 (2004) 195-205.

[175] M. Christov, R. Dohrn, High-pressure fluid phase equilibria: Experimental methods and systems investigated (1994–1999), Fluid Phase Equilibria, 202 (2002) 153-218.

[176] B. Calvignac, Mise au point de méthodes de caractérisation de binaires en milieu supercritique et modélisation des propriétés physiques et thermodynamiques mesurées, in, L'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris, 2009.

[177] N.M.B. Flichy, C.J. Lawrence, S.G. Kazarian, Rheology of Poly(propylene glycol) and Suspensions of Fumed Silica in Poly(propylene glycol) under High-Pressure CO2, Industrial & Engineering Chemistry Research, 42 (2003) 6310-6319.

[178] T. Guadagno, S.G. Kazarian, High-Pressure CO2-Expanded Solvents: Simultaneous Measurement of CO2 Sorption and Swelling of Liquid Polymers with in-Situ Near-IR Spectroscopy, The Journal of Physical Chemistry B, 108 (2004) 13995-13999.

[179] J. Gmehling, B. Kolbe, M. Kleiber, J. Rarey, Phase equilibria in fluid systems, in: J. Gmehling, B. Kolbe, M. Kleiber, J. Rarey (Eds.) Chemical Thermodynamics for Process Simulation, Wiley, 2012.

[180] B.E. Poling, J.M. Prausnitz, J.P. O'Connell, Fluid Phase Equilibria in Multicomponent Systems, in: The properties of gases and liquids, McGraw-Hill, 2001.

[181] B.E. Poling, J.M. Prausnitz, J.P. O'Connell, Pressure Volume Temperature relationships of pure gases and liquids, in: The properties of gases and liquids, McGraw-Hill, 2001.

[182] J. Gmehling, B. Kolbe, M. Kleiber, J. Rarey, Properties of Mixture, in: Chemical Thermodynamics for Process Simulation, Wiley, 2012.

[183] B.E. Poling, J.M. Prausnitz, J.P. Connell, Pressure Volume Temperature Relationships of Mixture, in: The Properties of Gases and Liquids, McGraw-Hill New York, 2001.

[184] G.A. Lewis, D. Mathieu, R.T.L. Phan, Pharmaceutical experimental design, Marcel Dekker Incorporated, 1999.

[185] W.F. Smith, Experimental Design for Formulation, Society for Industrial and Applied Mathematics, 2005.

[186] D.C. Montgomery, Design and Analysis of Experiments, John Wiley & Sons, 2008.

[187] P. Wehrle, D. Korner, S. Benita, Sequential Statistical Optimization of a Positively-Charged Submicron Emulsion of Miconazole, Pharmaceutical Development and Technology, 1 (1996) 97-111.

[188] J. Vandervoort, A. Ludwig, Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study, International Journal of Pharmaceutics, 238 (2002) 77-92.

[189] J.A. Cornell, The Canonical Polynomials, in: Experiments with Mixtures: Design, Models, and the Analysis of Mixture Data., John Wiley & Sons, Inc., 2002, pp. 25-30.

[190] M.J. Anderson, P.J. Whitcomb, RSM simplified: optimizing processes using response surface methods for design of experiments, Productivity press, 2005.

[191] G.A. Lewis, D. Mathieu, and Roger Tan Luu Phan, Response Surface Methodology, in: Pharmaceutical experimental design, Marcel Dekker, New York, 1998, pp. 218-230.

[192] J.M. Péan, M.C. Venier-Julienne, R. Filmon, M. Sergent, R. Phan-Tan-Luu, J.P. Benoit, Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles, International Journal of Pharmaceutics, 166 (1998) 105-115.

[193] W. F.Smith, Designs for Non-Simplex-Shaped Region., in: Experimental Design for Formulation, Society for Industrial and Applied Mathematics, 2005, pp. 61-93.

IV .TRAVAIL EXPERIMENTAL

IV.1 CHAPITRE 1: Encapsulation du Lysozyme dans des particules de PLGA et $CaCO_3$ en milieu CO_2 supercritique

Dans cette première partie du travail expérimental, nous allons montrer l'utilité du CO_2 pressurisé pour l'élaboration de nouvelles stratégies en vue de l'encapsulation des protéines et peptides dans des systèmes de délivrance sans avoir recours aux solvants volatiles toxiques. Deux types de systèmes de libération seront présentés: des particules polymériques de PLGA et des particules inorganiques $CaCO_3$. Nous avons choisi de regrouper ces deux systèmes dans cette étude du fait que les deux procédés décrits sont basés sur une étape d'émulsification en milieu CO_2 pressurisé qui joue le rôle de phase dispersante.

En ce qui concerne la formulation des particules de PLGA, le glycofurol, un solvant injectable déjà étudié dans notre laboratoire et connu pour sa faible toxicité, est utilisé pour la solubilisation de PLGA. Toutes les étapes de développement du procédé (détermination de la zone expérimentale, optimisation de l'étape d'émulsification,…) seront présentées en détails. L'optimisation de l'encapsulation d'une protéine modèle (lysozyme) a été réalisée en utilisant la méthodologie de plans d'expérience. La méthodologie des surfaces de réponses a été choisie afin d'étudier la relation entre différents facteurs (pression, température,…) et la réponse quantifiée par la mesure du rendement d'encapsulation du lysozyme. L'intérêt de cette méthodologie est son approche séquentielle qui permet de réaliser dans un premier temps, une analyse factorielle fournissant des informations liées à l'influence des facteurs choisis sur la réponse, puis, dans un deuxième temps, de construire des surfaces de réponses dans le domaine expérimental.

Les résultats présentés dans cette première partie du travail sont issus de l'article « Lysozyme Encapsulation Within PLGA and $CaCO_3$Microparticles Using Supercritical CO_2Medium" publié dans "Journal of Supercritical Fluids".

LYSOZYME ENCAPSULATION WITHIN PLGA AND $CACO_3$MICROPARTICLES USING SUPERCRITICAL CO_2MEDIUM

M-K. Tran[1, 2, †], L.N. Hassani[1, 2, †], B.Calvignac[1, 2], T.Beuvier[3], F.Hindré[1, 2], F.Boury[1, 2*]

[1]LUNAM Université, Angers, France

[2] INSERM U1066, Micro et Nanomedécines Biomimétiques, IBS, 4 rue Larrey, F-49933 Angers Cedex 9, France

[3]Université du Maine, CNRS UMR 6087-Laboratoire de Physique de l'Etat Condensé, 72085 Le Mans Cedex9, France

[†]These authors equally contributed to this work.

[*]Corresponding author:frank.boury@univ-angers.fr

ABSTRACT

This study is part of a global project which aims at conceiving and characterizing implantable synthetic extracellular matrices seeded with multifunctional particles for bone and cartilage tissue engineering. To date, protein encapsulation remains a challenge in the field of microencapsulation. The aim of this work is to use supercritical CO_2 to generate polymeric and inorganic particles for protein encapsulation. Poly(lactic-co-glycolic) (PLGA) and calcium carbonate ($CaCO_3$) microparticles were chosen to be investigated. In both cases, spherical particles were successfully obtained based on the formation of an emulsion in CO_2 media. Most importantly, only non-toxic solvents or aqueous solution were used for the formulation of microparticles. Encapsulation experiments were carried out to provide a proof of concept. Lysozyme was chosen as a protein model and experimental designs were made in order to better understand the system and to better predict the encapsulation yield. The encapsulation yield can reach about 60% in both cases. The mechanism of particle formation and lysozyme encapsulation will also be discussed in detail.

Keywords. Supercritical CO_2, emulsification, non-toxicsolvent, protein encapsulation, microparticles.

INTRODUCTION

Thanks to advances in biotechnology, many therapeutic peptides and proteins have been discovered. Owing to the many benefits that it can offer to patient comfort and therapeutic efficiency, protein encapsulation has been drawing the attention of researchers for decades [1, 2], and it is still the subject of many publications in recent years[3, 4]. The literature shows that numerous types of carriers, polymeric and inorganic, with different methods have been developed and used for protein encapsulation[5, 6].

Concerning polymeric carrier systems, many encapsulation methods have been developed and among them can be cited the double-emulsion water/oil/water (W/O/W) method [7], the solid/oil/water (S/O/W) method [8], simple coacervation [9] and other derivative methods[10, 11].The negative aspect in the double emulsion method is the inevitable adsorption of proteins at the water/oil interface, which is deleterious for proteins, even though many suggestions have been made to improve protein stability[12, 13]. Consequently, the solid/oil/water (S/O/W) method in which proteins in the solid-state are dispersed in the oil phase was developed. In this case, proteins are not in molecular form, so the stability of proteins when put in contact with the oil phase is enhanced. The negative aspect is the preparation of protein particles obtained traditionally by spray-drying or freezing which potentially might be harmful for protein stability [14, 15]. Simple coacervation is very well known, has been widely used to entrap peptides and protein drugs, and has been the subject of several patent applications[1, 16]. The common point of the methods mentioned above is the use of volatile solvents, which are considered toxic for the body and the environment. Nowadays, the use of volatile solvents is being regulated, and the residual amount of these solvents is strictly limited. Hence, it is of great importance to find ways of avoiding the use of these solvents in the encapsulation process. Much research has been undertaken to achieve this goal. One of these pieces of research was an interesting approach based on the PGSS (Particle Gas Saturated Solution) technique which allows PLGA microparticles to be formed in CO_2 medium without using any organic solvents [17]. Moreover, it was reported that there was no significant loss of activity of proteins encapsulated by this technique. However, according to the authors, it is difficult to control the size, shape and drug release kinetics of this type of PLGA microparticles. Therefore, this technique requires further

improvement to prove its utility in controlled protein release. In this paper, we will present our preparation method for the formation of PLGA particles in CO_2 medium.

Concerning inorganic carriers, protein encapsulation has mostly been performed on porous materials. To date, different types of biocompatible porous material have been developed, for instance, mesoporous silicas[18], halloysite nanotubules[19] and calcium carbonate ($CaCO_3$) particles[20, 21]. In most cases, the encapsulation of proteins or enzymes in the systems was achieved via an adsorption phenomenon [18, 19] and can involve a layer-by-layer assembly of polyelectrolytes to form composite materials[22].Calcium carbonate is widely present on earth and is industrially prepared from calcium hydroxide slurry or slaked lime [23, 24], but it is also a by-product of sodium hydroxide production [25]. $CaCO_3$possess high loading capacity, thus it is an effective materials for drug and protein encapsulation. In the literature, one can find reports on the loading of $CaCO_3$with various molecules, including low-molecular weight drugs [26-28], DNA [29, 30], enzymes and proteins. Proteins could be entrapped into $CaCO_3$ using different loading modes, the most effective one being the active loading or co-precipitation, whereby molecules of interest are entrapped during the process of $CaCO_3$crystal growth resulting from the mixing of two aqueous solutions, $CaCl_2$ and Na_2CO_3 [31-33]. By contrast, in passive loading or impregnation, the molecules of interest are adsorbed from the solution onto preformed $CaCO_3$ [26, 33, 34]. Many other loading modes have been described such as chemical adsorption [35], phase transition [36] and interfacial reaction [29]. In the past we developed a process based on supercritical CO_2 for the synthesis of $CaCO_3$ particles. In our previous work we mainly focused on the synthesis and characterization of unloaded $CaCO_3$ particles [37]. It was shown that $CaCO_3$ microspheres of about 5µm, were constituted of an assembly of vaterite nanograins (approximatively 40 nm width) that exhibited a specific surface of $16 m^2.g^{-1}$ with a mesoporosity of around 11% [38].

In this work, protein encapsulation in PLGA particles and in $CaCO_3$ particles will be presented. In both cases, the preparation method was based on the formation of an emulsion in CO_2. Concerning the preparation of PLGA particles, a non-toxic solvent, glycofurol, was used for the formulation. To the best of our knowledge, glycofurol is a safe injectable water-miscible solvent with a consistently low toxicity, as demonstrated by many studies [39-42]. The optimization of protein encapsulation using experimental design and discussions on the mechanism of particle formation will be the focus of this part. Concerning $CaCO_3$ particles, the

preparation was carried out in an aqueous medium, thus avoiding recourse to any use of organic solvents. Results presented in this paper follow our previous work which mainly focused on characterizing $CaCO_3$ particles using XRD, SEM, TEM, AFM, and nitrogen adsorption/desorption techniques [37]. Experiments on protein encapsulation and *in-vitro* release will be shown. Comparisons between the protein-loaded system and the unloaded system were also investigated. The optimization of protein encapsulation in $CaCO_3$ particles involved in a study of surface functionalization will be presented in another publication.

This study is involved in a global project which aims at conceiving implantable synthetic extracellular matrices seeded with multifunctional particles for bone and cartilage tissue engineering. However, the application of the carriers can be extended to any field requiring protein encapsulation.

MATERIAL AND METHODS

1. Material

Lysozyme (chicken egg-white), *Micrococcus lysodeikticus*, glycofurol (tetraglycol or α-[(tetrahydro-2-furanyl) methyl]-ω-hydroxy-poly(oxy-1,2-ethandiyl), isosorbide dimethyl ether, glycin, calcium hydroxide, and hyaluronic acid were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier,France). Uncapped 75/25 PLGA provided by Phusis (Saint-Ismier, France) had a mean molecular weight of 21,000 $g.mol^{-1}$ (polydispersity index I=1.8) as determined by size-exclusion chromatography (standard: polystyrene). The information about polydispersity index was provided by the supplier. Micro-BCA protein assay reagent kit was purchased from Pierce (Bezons, France). Non-ionic surfactant Lutrol F68 (poloxamer 188) was purchased from BASF (Laserson, France).

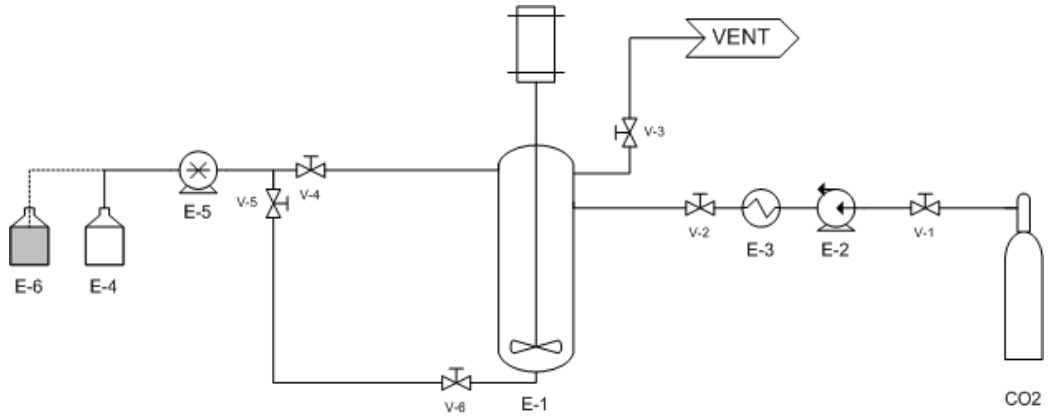


Figure 1. Schematic diagram of the experimental setup for the formulation of PLGA particles.

2. Methods

2.1. Preparation of PLGA particles

2.1.1. Protein precipitation

The protein precipitation method had been optimized by A.Giteau using experimental design. In fact, a Doehlert matrix was used to study the influence of ionic strength, aqueous volume, and protein quantity on the activity yield of protein precipitates [43]. The condition of precipitation of experiment number 12, which is one of the optima found by the author,was chosen to perform the precipitation step. Precisely, 0.9 mg of lysozyme was dissolved in 46 µL of 0.3 M NaCl solution. This solution was then mixed into 954 µL of glycofurol, which played a role of an anti-solvent, to obtain a suspension of precipitated protein for further use (suspension 1).

2.1.2. Preparation of polymer solution

A stock solution of 15% (wt./v) PLGA in glycofurol was firstly prepared. In fact, after adding PLGA to glycofurol, the mixture was left under stirring for about 48 hours and was then left to stand for at least 7 days. Before any further use, the solution was filteredthrough a 0.2 µm pore size filter (Minisart RC 25, Sartorius Stedim).

2.1.3. Preparation procedure of PLGA particles in CO_2 medium

A scheme of the experimental setup used for microparticle preparation is shown in Figure 1. 0.3 mL of a polymer solution or a suspension of lysozyme precipitates in polymer solution was first introduced into a 14 mL view-cell (E1) which was kept at the operating temperature by a thermostated water bath. The suspension of lysozyme precipitates in polymer solution was prepared by mixing the suspension 1 (cf 2.1.1 part) and the stock solution at 1/2 (v/v) ratio. In this work, unless otherwise stated, the final concentration of polymer was 10% (wt./v). CO_2 was

then delivered to the cell by means of a membrane pump (E2). Once the desired pressure was reached, the mixture of these two phases was stirred at 1500 rpm. The impeller is in the form of a cylindrical spindle. A certain amount of ethanol (E4) was then injected into the cell by an HPLC pump (E5). Thereafter, the HPLC circuit was washed with distilled water and 1% Lutrol F68 solution before 2 mL of 1% Lutrol F68 solution (E6) was added into the cell to extract glycofurol. The stirring was maintained for 25 minutes before a depressurizing step (20-30 bar/min). A suspension of microparticles was collected and then added dropwise into 15 ml of glycin buffer solution pH 10 (0.00125 M). This final suspension was left to stand at ambient temperature (≈25°C) overnight. Thereafter, the suspension was centrifuged at 2000 rpm (1000g) for 15 minutes, which allows the particles to be collected. The particles were washed once with distilled water before being freeze-dried.

2.1.4. Experimental design

To better understand the system and to define the optimum conditions of the process, an experimental design was used. The encapsulation yields of total protein and of active protein were chosen as responses to be measured, and three parameters (temperature, pressure and injected volume of ethanol) were chosen to study their influence on the responses. The range of pressures and temperatures included in this experimental design were chosen based on a preliminary experiment in which the ability of the polymer solution to be dispersed in CO_2 media had been tested. The experimental procedure can be briefly summarized as follows: at a constant temperature, 0.3 mL of the polymer solution was added into the 14 mL view cell; pressure was then increased progressively under mechanical stirring until the polymer solution began to rest at the bottom of the cell and could not be dispersed in the cell. The pressure value was then noted and it was called P_{max}. P_{max} values at different temperatures are summarized in Figure 2.The temperature was chosen to not exceed 40°C to make sure the activity loss of protein was not caused by excessive heat. Therefore, in order to explore the entire constrained region of process operability, a face-centered composite design was chosen rather than a classical central composite design [44].

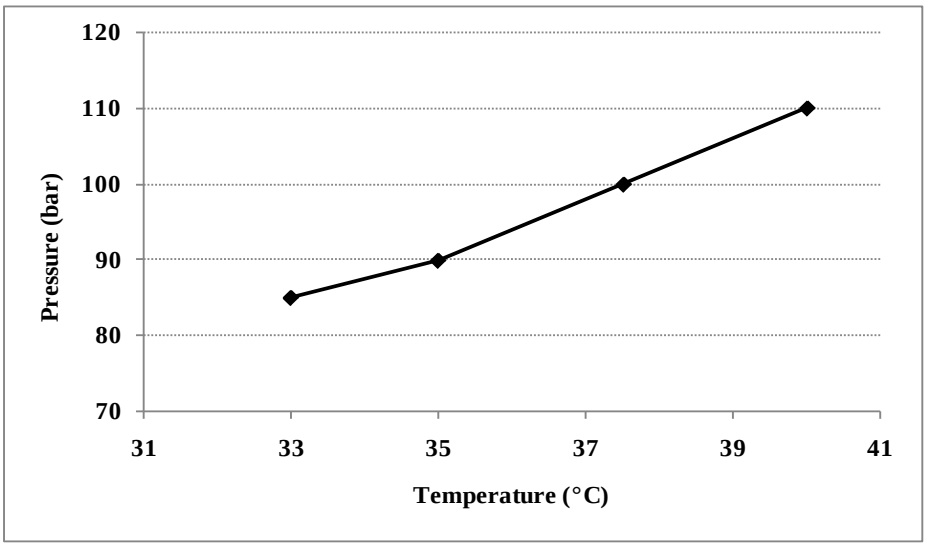


Figure 2. Pmax values according to temperature.

In our first attempt to fit a model to data, we studied the encapsulation yield of total protein over the three parameters within the ranges: A-temperature (33-40°C), B-pressure (80-100bar) and C-volume of ethanol (0.2-1 mL). A face-centered composite design was built up and it was divided into 2 blocks:

-Block 1: 12 runs composed of 8 two-level factorial combinations and 4 center points.

-Block 2: 8 runs composed of 6 axial points (α= 1) and 2 center points.

After conducting the experiments, data collected were then analyzed using Design-Expert software (Stat-Ease, Minneapolis, U.S.). Predictive models were built based on an analysis process called the "sequential model sum of squares". While keeping the hierarchy of the selected model, model terms might be selected or rejected based on the p value with 95% confidence level using ANOVA analysis.

2.2. Preparation of $CaCO_3$ particles

2.2.1. Carbonation reaction media

$CaCO_3$ microparticles were obtained by a supercritical CO_2 process as described in our previous work [37]. This process, which is based on the formation of an emulsion of water in Sc-CO_2 (W/C), was developed in our laboratory and patent applications were filed [45]. Aqueous microdroplets act as microreactors where several reactions succeed. In this case, Sc-CO_2 is a continuous (or external) phase and acts as reactant for the synthesis of $CaCO_3$ particles. The fast dissolution of CO_2 molecules into a basic aqueous solution leads to the formation of ionic species

such as HCO_3^- and CO_3^{2-}. Sc-CO_2 is dissolved in the aqueous solution ($CO_{2\ (aq)}$) leading to the formation of carbonic acid H_2CO_3, ionic species such as hydrogenocarbonate(HCO_3^-) and carbonate (CO_3^{2-}) according to equations 1 to 3. Then, the CO_3^{2-} ions react with Ca^{2+} ions to form calcium carbonate (Eq. 4) which may crystallize into different polymorphs.

$$CO_{2(aq)} + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \quad \text{(Eq.1)}$$

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H+ \quad \text{(Eq.2)}$$

$$HCO_3^- \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H+ \quad \text{(Eq.3)}$$

$$CO_3^{2-} + Ca^{2+} \rightleftharpoons CaCO_3 \quad \text{(Eq.4)}$$

2.2.2. Preparation of aqueous solution

Calcium hydroxide (1 % wt./v) was added in glycin buffer (NaCl 0.62 M, glycin 0.62 M) and filtered through a 0.45 µm filter. Then the pH was readjusted to 10 by adding dropwise 6 M HCl solution. The pH was measured using a MicropH2001 pH-meter (Crison Instruments, Paris, France). Hyaluronic acid was then added (0.1 % wt./v). Hyaluronic acid plays a role of an anionic biopolymer directing the polymorphism of $CaCO_3$ particles. For the synthesis of loaded microspheres, lysozyme (1mg/mL) was dissolved in the aqueous solution right before encapsulation experiment was carried out.

2.2.3. Experimental set-up and procedure

A schematic diagram of the device used for $CaCO_3$ synthesis is shown in Figure 3. The stainless autoclave (1) with a capacity of 500 mL is heated at 40.0 ± 0.1 °C and pressurized with CO_2 at 200 ± 1 bar. Liquid CO_2 is pumped with a high pressure membrane pump (2) and preheated by a heat exchanger (3) before feeding the autoclave equipped with a mechanical stirring device. The axis of the magnetic stirrer is equipped with an anchor stirrer, and the stirring speed is 1200 rpm. Once equilibrium is reached (temperature and pressure constant), 25 mL of previously prepared aqueous solution are injected by means of an HPLC pump (4). The injection flow is fixed at 10 mL/min. Once addition is achieved, the final pressure is 240 ± 5 bar and stirring is maintained at 1200 rpm for 5 min. Thereafter, stirring is stopped and the autoclave depressurized at a rate of 40-50 bar/min.

Suspension of $CaCO_3$ microparticles is collected and centrifuged at 2400 g for 10 minutes. Finally, microparticles are washed with 50 mL of ultrapure water, centrifuged and freeze-dried to obtain a dry powder of $CaCO_3$.

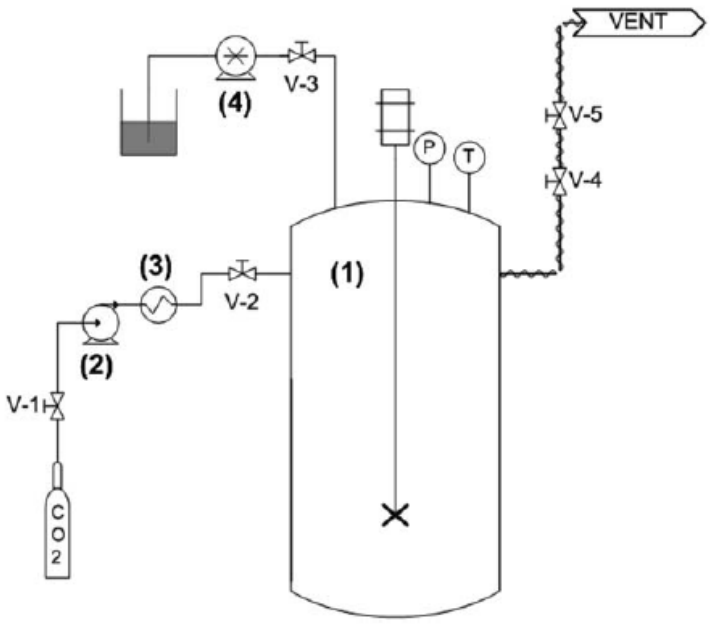


Figure 3. Experimental setup for the formulation of $CaCO_3$ particles.

2.3.Microparticle characterization

2.3.1 Morphology, size and zeta potential

The surface morphology of the microparticles was investigated by scanning electron microscopy (SEM) (JSM 6310F, JEOL, Paris, France). Freeze-dried microparticles were mounted onto metal stubs using double-sided adhesive tape and then vacuum-coated with a film of carbon using a MED 020 (Bal-Tec, Balzers, Lichtenstein).

The average particle size was determined using a Coulter Multisizer® (Coultronics, Margency, France). Suspensions of particles in distilled water before being freeze-dried were used for these analyses. XRD analysis was carried out using an X-pertdiffractometer (CuK$\alpha_1\alpha_2$ doublet, λ=1.54056A° from 2θ = 10 to 70° in continuous mode with a step size of 0.07°). A Nanosizer ZS (Malvern Instruments, Orsay, France) was used to assess the zeta potential of the microparticles. Microparticles were redispersed in distilled water and vortexed prior to every measurement. The zeta cell was washed with ultrapure water between every sample. Results are presented as the average of 3 measurements.

2.3.2 Encapsulation yield of protein

Encapsulation yield is defined as the percentage of encapsulated protein compared to the initial amount of protein.

2.3.2.1 Active protein

The biologically active entrapped protein was determined using *Micrococcus lysodeikticus*[3, 43]. 30 mg of *M. Lysodeikticus* were placed in 200 mL TRIS NaCl buffer (pH 7.4) and incubated at 37°C for one hour. In the case of $CaCO_3$, 5 mg of protein-loaded microspheres were dissolved by contact with 1.5 mL 0.1 M HCl for 10 minutes and diluted in TRIS NaCl buffer to reach a lysozyme concentration of 0.06 to 0.3 µg/mL. 100 µl of samples or standards (0.06 to 0.3 µg/mL of lysozyme) in triplicate were mixed with 2.9 mL of *M. Lysodeikticus* suspension in glass tubes (Kimble, Thermo Fisher Scientific) and incubated for at least 4 hours at 37°C. Turbidity was finally assessed by measuring the absorbance at 450 nm (Kontron Uvikon 922, Northstar Scientific, Leeds, UK). For protein-loaded PLGA particles, the same quantification method was used except that lysozyme-loaded PLGA microparticles obtained after formulation were dissolved in 0.9 mL of DMSO and then after 1 hour, 3 mL of 0.01M HCl was added. The solution was left to stand for 1 more hour and then diluted to an appropriate range of concentration. The amount of encapsulated active protein was calculated using a standard curve after subtraction of the control value of a blank sample. The blank sample was prepared in the same conditions as the protein-loaded sample in the absence of protein precipitates. It should be pointed out that the blank sample did not show any lysis effect on *M. lysodeikticus*.

2.3.2.2 Total protein

The total protein was quantified by using a micro-BCA protein assay according to the manufacturer's guidelines. Briefly, a volume of sample (100 µL) or lysozyme standard was mixed with BCA reagent at the same volume (100 µL) in a 96 microwell plate (Nunc, Thermo-Fisher Scientific) and incubated at 37 °C for 2 hours away from any light. Absorbance was finally measured at 580 nm (Multiskan Labsystems, PA). The amount of protein was calculated using a standard curve. The standard curve was created in the range of 5-100 µg/mL. The experiment was triplicated for each batch of particles.

2.3.3Protein release kinetics

$CaCO_3$ microparticles(10 mg) were dispersed in 10 mL phosphate buffer (PBS, prepared according to the European pharmacopea, Ed 6), at either pH 4.5, 6.0 or 7.4 and incubated in a water bath at 37°C under agitation (75 rpm). Samples were taken at 30, 60, 90, 120, 150, 180 min and 24 hours. At each sampling time, the buffer was totally removed; the microparticles were washed once with ultrapure water (Millipore) before replacing the buffer for sink conditions. The

samples were diluted to obtain a final concentration of 0.06 - 0.3 µg/mL of lysozyme. The quantification of active lysozyme was performed using a *Micrococcus lysodeikticus* assay as described previously in section 2.3.2.1. Release profiles were performed in triplicate for each condition.

RESULTS AND DISCUSSION

1. PLGA particles

1.1. Particle formation

The preparation procedure in this work was designed to follow the emulsification/extraction method, which requires the formation of an emulsion followed by an extraction step. In this procedure, the polymer solution was emulsified in CO_2 fluid. It was observed that the presence of a certain quantity of ethanol enhanced mixing between the liquid phase and the CO_2 fluid, and hence, enhanced emulsion formation. In fact, under fixed conditions of pressure and temperature, optimal amounts of ethanol were determined by progressively injecting ethanol into the cell followed by observations via the view-cell (Figure 4). In our definition, the optimal amount of ethanol under a predefined condition of pressure and temperature is the minimal amount of ethanol which allows the obtained emulsion with a white appearance to be dispersed along the whole length of the view cell.

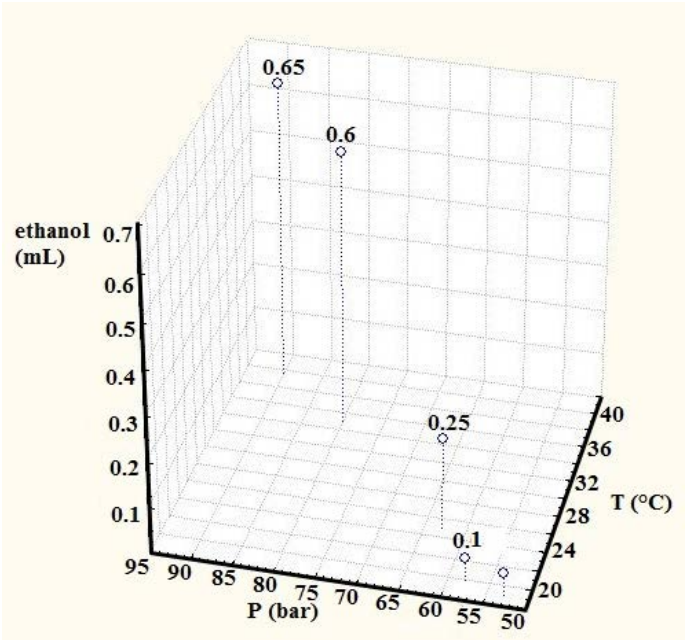


Figure 4. Optimal amount of ethanol according to temperature and pressure.

In the extraction step, an aqueous solution of Lutrol was used to extract the polymer solvent. As mentioned earlier, glycofurol is a water-miscible solvent. Therefore, a hydrophilic non-solvent of PLGA such as glycerol, or polyethylene glycol can be used for extraction [46]. In this work, we did not study the influence of different external phases on particle formation. An aqueous phase was chosen because of its safety and its ability to dissolve surfactant agents. Figure 5.a is an image of particles prepared under an optimal amount of ethanol (temperature=39.5°C, pressure=90 bar, C_2H_5OH=0.65mL). It can be seen that the particles look spherical and are well separated from one another. The mean average size of particles is about 2.1 µm (Figure 5b).

In this study, PLGA particles were used for protein encapsulation and lysozyme was chosen as a protein model. The encapsulation yield of lysozyme in PLGA particles prepared under supercritical CO_2 was studied and optimized using experimental design. Three factors chosen to study their influence on encapsulation yield were: temperature, pressure, and ethanol volume.

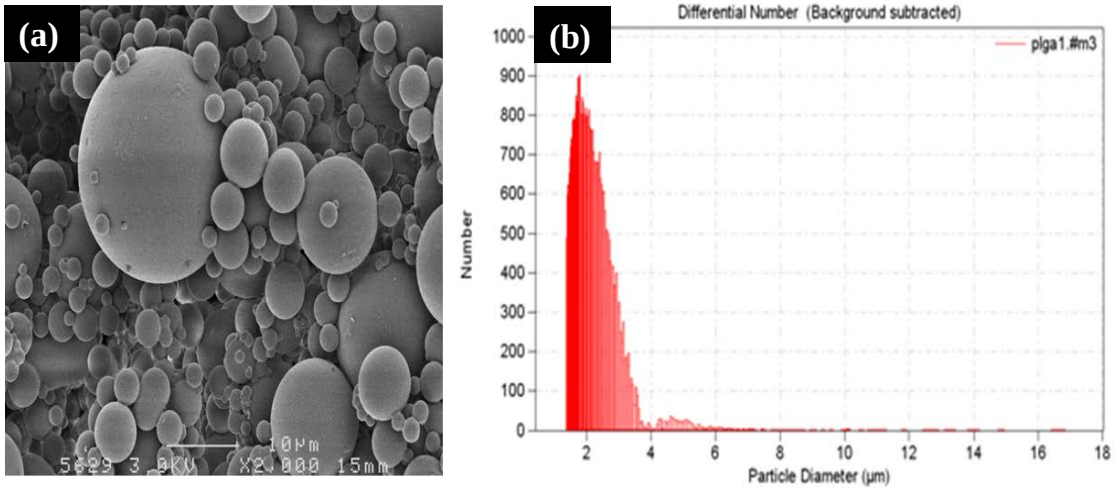


Figure 5. SEM images of PLGA particles (a) and size distribution measured using Coulter sizer (b).

1.2. Experimental design

Within the previously defined domain of key inputs, an experimental design was built up and the total protein yield chosen as output was quantified (Table 1). Response surface analysis was then carried out in order to fit the model to data. The chosen model was a two factors interaction model (2FI) using the sequential sum of squares approach. Analysis of variance (ANOVA) was performed to test the significance of model coefficients (Table 2). It was shown that temperature (A), pressure (B), and ethanol volume (C) had a significant effect on

Table 1. Experimental data showing total protein yield in function of experimental conditions.

Std	Run	Block	A-temperature (°C)	B-pressure (bar)	C-C_2H_5OH volume (mL)	encapsulation yield (%)
4	1	Block 1	40.0	100	0.2	88
2	2	Block 1	40.0	80	0.2	20
10	3	Block 1	36.5	90	0.6	70
7	4	Block 1	33.0	100	1.0	0
9	5	Block 1	36.5	90	0.6	56
8	6	Block 1	40.0	100	1.0	40
12	7	Block 1	36.5	90	0.6	55
1	8	Block 1	33.0	80	0.2	84
11	9	Block 1	36.5	90	0.6	58
5	10	Block 1	33.0	80	1.0	26
3	11	Block 1	33.0	100	0.2	89
6	12	Block 1	40.0	80	1.0	0
17	13	Block 2	36.5	90	0.2	89
16	14	Block 2	36.5	100	0.6	86
19	15	Block 2	36.5	90	0.6	66
20	16	Block 2	36.5	90	0.6	71
13	17	Block 2	33.0	90	0.6	85
14	18	Block 2	40.0	90	0.6	15
15	19	Block 2	36.5	80	0.6	41
18	20	Block 2	36.5	90	1.0	39

Table 2. ANOVA for the applied response surface model.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Block	770.133	1	770.133			
Model	13524.375	6	2254.063	9.697	0.0005	Significant
A-temperature	1464.100	1	1464.100	6.298	0.0274	Significant
B-pression	1742.400	1	1742.400	7.496	0.0180	Significant
C-C2H5OH	7022.500	1	7022.500	30.211	0.0001	Significant
AB	2080.125	1	2080.125	8.949	0.0112	Significant
AC	780.125	1	780.125	3.356	0.0919	
BC	435.125	1	435.125	1.871	0.1963	
Residual	2789.291	12	232.441			
Lack of Fit	2632.041	8	329.005	8.368	0.0283	Significant
Pure Error	157.250	4	39.3125			
Cor Total	17083.800	19				
Final equation (coded factors)	Yield= 55.17 -12.1A + 13.2B – 26.5C + 16.12AB + 9.88AC -7.38BC (Eq.5)					

the encapsulation yield. Although the final equation shows a lack of fit, which means it cannot be used for the prediction of response in the chosen ranges of factors, we better understand the system and the way the factors interact with each other to affect the output. Indeed, based on the sign of the top three significant terms C, AB, B in the equation, it should be pointed out that C should be at its low level; A and B should be at the same time either at their high or low levels while B should be at its high level for further optimization studies. Moreover, the results of the ANOVA analysis about the interaction between temperature and pressure corroborate our observation presented in Figure 2. Effectively, when temperature is at its low level, pressure

should not be at its high level since it will be greater than the Pmax value, which means the ability of the polymer solution to be dispersed in CO_2 fluid would be very limited.

At this stage of response surface modeling, it would be reasonable to narrow down the experimental domain for prediction and optimization purposes. As pointed out earlier, B should be at its high level and A, B should be at the same levels. Therefore, another face-centered composite design was built up to inspect the active protein and total protein yield over the following ranges of the three factors: A-temperature (36.5-39.5°C), B-pressure (90-100 bar), and C-volume of ethanol (0.15-0.75 mL). Experimental points and their outputs are shown in Table 3. The ANOVA table shows the chosen model is the three factor interaction (3FI) one (Table 4). A particularly useful characteristic of central composite design is the fact that this type of design allows experimenters to take a sequential approach. In fact, a factor analysis was first carried out to analyze data collected in block 1. This analysis permitted us to discover the significance of the ABC term, normally neglected by the analysis process in central composite design which is not conceived to support the estimation of a 3^{rd} degree term. Indeed, the p-value of the ABC term shown in Table 4 is highly significant. Hence, it seems fair for us to add this term into the model. Besides, it was observed that the final equation does not show a lack of fit, which allows the response to be predicted within the chosen ranges of the parameters. To illustrate this equation, active protein yield was mapped over the experimental domain (Figure 6A). The highest yield of 87% was found at 39.5°C, 90 bar and 0.15 mL of ethanol.

With the intention of using (Eq.6) (cf. Table 4) to find the maximum of active protein yield, an extrapolation was carried out in the periphery of the previously chosen experimental domain. The tested condition calculated based on a desirability function was at 40°C, 90 bar, 0.1 mL of ethanol where the temperature was moved upward 0.5°C and the ethanol volume was moved downward 0.05 mL from their extremes in the experimental domain. The active protein yield was found to be about 75 %, which is lower than the previously obtained maximal value of encapsulation yield. Hence, it would be reasonable to stay inside the previously chosen experimental domain.

Table 3. Experimental conditions and results in the second experimental design.

Std	Run	Block	A-temperature (°C)	B-pressure (bar)	C-C_2H_5OH volume (mL)	activity yield (%)	total protein yield (%)
6	1	1	39.5	90	0.75	41.1	60.0
2	2	1	39.5	90	0.15	87.8	88.9
7	3	1	36.5	100	0.75	63.3	73.3
8	4	1	39.5	100	0.75	28.9	48.9
10	5	1	38.0	95	0.45	58.9	78.9
4	6	1	39.5	100	0.15	45.6	56.7
12	7	1	38.0	95	0.45	58.9	78.9
3	8	1	36.5	100	0.15	67.8	75.6
1	9	1	36.5	90	0.15	34.4	42.2
9	10	1	38.0	95	0.45	51.1	77.8
11	11	1	38.0	95	0.45	58.9	71.7
5	12	1	36.5	90	0.75	64.4	80.0
15	13	2	38.0	90	0.45	46.7	65.9
18	14	2	38.0	95	0.75	25.6	43.3
13	15	2	36.5	95	0.45	48.9	68.9
14	16	2	39.5	95	0.45	41.1	60.0
19	17	2	38.0	95	0.45	57.8	78.9
16	18	2	38.0	100	0.45	44.4	63.3
17	19	2	38.0	95	0.15	57.8	56.7
20	20	2	38.0	95	0.45	53.3	73.3

Table 4. ANOVA showing the significance of the chosen model and lack-of-fit test in the second experimental design.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob> F	
Block	318.176	1	318.176			
Model	3118.661	7	445.523	9.756	0.0006	significant
A-temperature	117.649	1	117.649	2.576	0.1368	
B-pressure	59.536	1	59.536	1.303	0.2778	
C-C_2H_5OH	491.401	1	491.401	10.760	0.0073	significant
AB	939.611	1	939.611	20.575	0.0008	significant
AC	987.901	1	987.901	21.633	0.0007	significant
BC	2.531	1	2.531	0.055	0.8182	
ABC	520.031	1	520.031	11.387	0.0062	
Residual	502.328	11	45.666			
Lack of Fit	446.573	7	63.796	4.576	0.0802	not significant
Pure Error	55.755	4	13.938			
Cor Total	3939.165	19				
Final equation (codedfactors)	Yield= 51.02 - 3.43A - 2.44B - 7.01C - 10.84AB - 11.11AC - 0.56BC + 8.06ABC (Eq.6)					

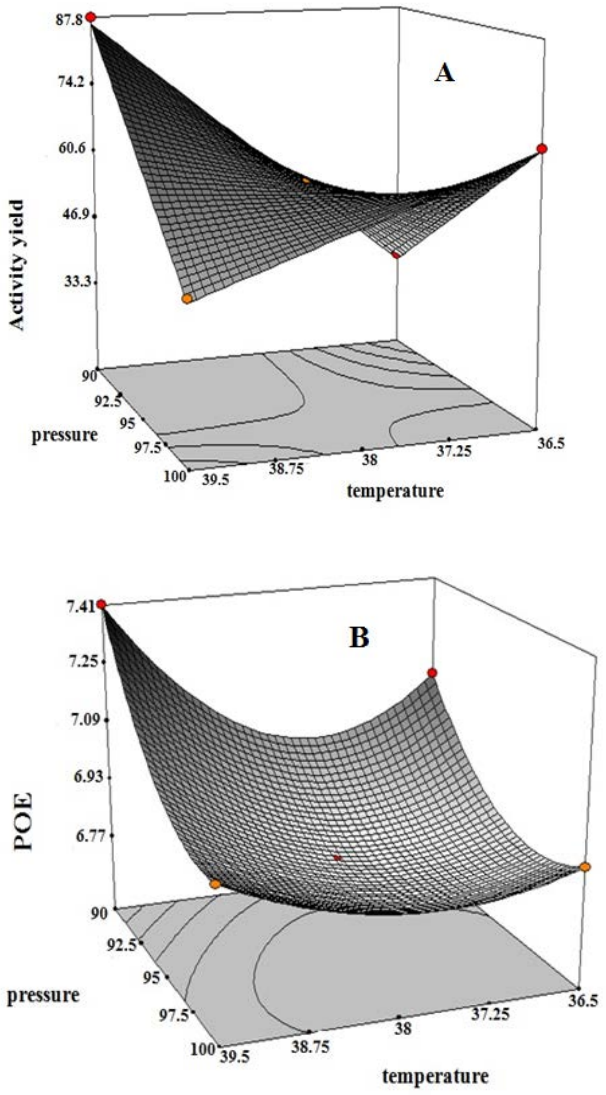


Figure 6. Illustration of activity yield and propagation error (POE) of activity in the chosen ranges of variables (Vethanol=0.15 mL).

1.3. Propagation of error

This part consists of calculating the transmitted variation of responses via the noise of input factors. The idea is to seek out the region where responses do not get affected much by variations in factor settings [44]. The propagation of error of active protein yield is shown in Figure 6B. Unfortunately, the highest error was found to be at 39.5°C, 90 bar, and 0.15 mL of ethanol where the best value of active protein yield was obtained. Therefore, at this condition of formulation, we may obtain the highest yield but at the same time the lowest robustness due to variations in the input factors.

1.4. Influence of ethanol on encapsulation yield and discussion on the mechanism of particle formation

Analyzing results obtained from the two mentioned experimental designs reveals that encapsulation yields are always better when the injected volume of ethanol stays at its low level, which does not coincide with our observation of the optimal volume of ethanol needed for a good mixture of polymer solution in the CO_2 phase. Center points in the first design and run number 1 in the second design were intentionally placed at conditions where optimal emulsification would happen, but it turned out that encapsulation yield obtained at these points were not the best by far. The encapsulation yield of total protein was about 60%. This fact suggests that there was another underlying mechanism involved in the particle formation and the subsequent process of protein encapsulation. To our knowledge, it might involve a phase separation phenomenon of the polymer solution when put in contact with an aqueous solution. In fact, our results about the encapsulation process using phase separation without the use of CO_2 show a high level of encapsulation efficiency [47], which indicates that phase separation might be the underlying mechanism of particle formation generated under low quantity of ethanol.

When going further in active protein versus total protein ratio, it can be seen that increasing the volume of ethanol decreases this ratio. It could be supposed that ethanol has a harmful effect on protein activity at its medium and high level. It should be pointed out that the process described hereby was used for protein encapsulation, but it can serve as well for the encapsulation of other drugs, such as lipophilic anti-cancer agents.

2. $CaCO_3$ particles

2.1. $CaCO_3$ microparticles formation in supercritical CO_2 medium

Generally, calcium carbonate is obtained by simple mixing of calcium and carbonate salts, only few research groups used supercritical CO_2 for the synthesis of calcium carbonate, and none described drugs or protein encapsulation [48-51]. During the formulation process, we speculate that the water droplets emulsified within supercritical CO_2 act as microreactors to prepare $CaCO_3$ microparticles able to encapsulate proteins such as lysozyme, while the CO_2 has a double role: it acts as an external phase for the emulsion and as a CO_3^{2-} provider inside the water droplets.

The mechanism of formation of calcium carbonate is complex to determine. Just after the injection of the basic aqueous solution in the pressurized autoclave, it is assumed that the fast dissolution of CO_2 molecules into the aqueous solution leads to the formation of several ionic

species, mainly CO_3^{2-} and HCO_3^- due to the used basic pH. Then, CO_3^{2-} ions react with Ca^{2+} ions, resulting in $CaCO_3$ particles which crystallize into the vaterite phase (Figure 7) as previously shown by our research group[37], but the mechanism of the formation is still unclear.

Moreover, the addition of hyaluronic acid and lysozyme can have an impact on the $CaCO_3$ particles. By comparison with the work of Zhang *et al* [52] showing $CaCO_3$ precipitation in the presence of a polyanionic matrix (polyaspartic acid), these species may interact with $CaCO_3$ particles via electrostatic interactions and as a consequence may influence the morphology, the size or the surface of $CaCO_3$ particles.

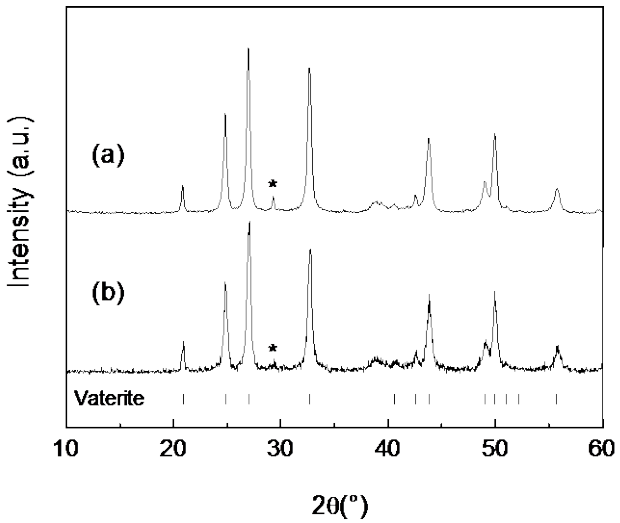


Figure 7. X-ray diffractograms of (a) unloaded and (b) lysozyme loaded $CaCO_3$ microparticles. They demonstrated that protein encapsulation within $CaCO_3$ microspheres did not modify $CaCO_3$ polymorphism. Bragg reflexions of vaterite (ICSD 15879) are indicated with vertical markers below the profile. Bragg reflexions of Calcite are labeled as *.

2.2. Morphology, size and zeta potential of $CaCO_3$ microparticles

Lysozyme-loaded $CaCO_3$ particles were characterized and compared to the unloaded ones. It is important to note that adding lysozyme has no influence on $CaCO_3$ polymorphism (Figure 7). Indeed, polymorphic composition (molar) is unchanged with around 98 % of vaterite and 2 % of calcite. Moreover, as shown on the SEM images (Figure 8), the spherical shape and the mean diameter of around 5µm are not modified by the presence of lysozyme. However a careful analysis reveals that lysozyme-loaded microparticles show a more stratified surface in the SEM images (Figure 8.c,d) compared to the unloaded microparticles (Figure 8.a,b). It is supposed that the presence of lysozyme induces surface structural changes of $CaCO_3$ particles as observed by Jimenez-Lopez *et al.*[53] and L. Yang *et al.*[54]. To confirm this assumption, zeta potentials were

measured. The unloaded particles bear a zeta potential of -20.8 ± 2.5 mV against -6.7 ± 2.2 mV for lysozyme loaded microparticles). Lysozyme-loaded particles are more positively charged compared to the unloaded ones which can be attributed to the presence on the surface of positively charged lysozyme (isoelectric point pHi≈ 11). The size of $CaCO_3$ microparticles ranged from 1 to 10 µm and exhibited a unimodal distribution with a mean diameter of 4.9 ± 0.1 µm for unloaded microparticles, whereas lysozyme loading slightly increased microparticle size (4.5 ± 0.5 µm). There was almost no microparticle with a diameter higher than 10 µm.

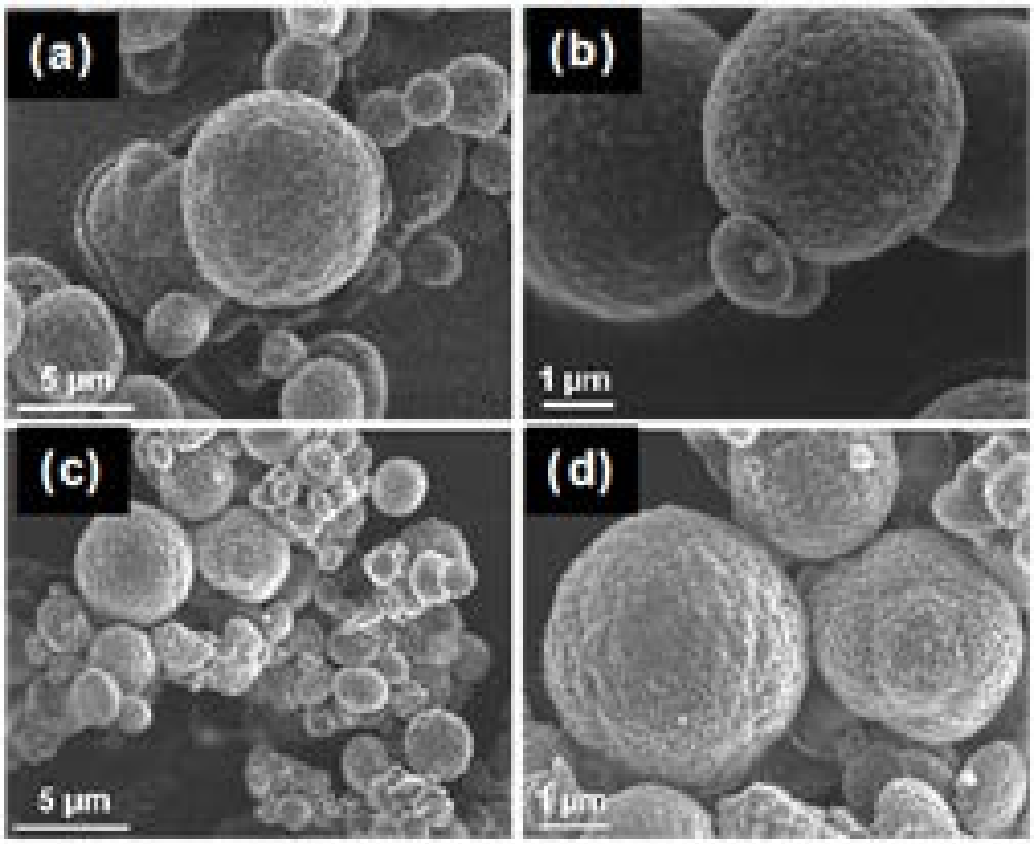


Figure 8. SEM observation of non-loaded particles (a),(b) and of lysozyme-loaded particles (c),(d).

2.3. Lysozyme encapsulation into $CaCO_3$microparticles

The preparation and characterization of unloaded $CaCO_3$microparticles have been studied and reported in our previous work [37]. In this study, we focused on the encapsulation of proteins into $CaCO_3$ microparticles to demonstrate their utility in the microencapsulation field. Lysozyme was chosen as model protein to provide a proof of concept. We successfully obtained $CaCO_3$ microspheres with a high protein loading (quantified amount of lysozyme/ amount of $CaCO_3$microparticles) and encapsulation yield (total amount of encapsulated lysozyme/ initial

amount of lysozyme in calcium solution). The highest lysozyme loading we could obtain was 7.1 ± 0.5 % corresponding to an encapsulation yield of about 64.4 ± 4.1 %, at a lysozyme starting concentration of 1 mg/mL, as quantified by µBCA assay. These results were confirmed by *Micrococcus lysodeikticus* assay, active lysozyme loading was 6.4 ± 0.1 % suggesting that above 90% of the encapsulated lysozyme remains active.

These preliminary results are much higher than those obtained by co-precipitation [32], interfacial reaction [29] or phase transition method [36]. If we compare different loading modes it can be noticed that lysozyme was scarcely encapsulated into $CaCO_3$microparticles. In the case of co-precipitation (encapsulation yield < 0.01 %) this could be explained by the repulsion of lysozyme during $CaCO_3$ crystal growth, due the fact that lysozyme and $CaCO_3$ (pHi= 8) were both positively charged [32]. Fujiwara *et al.* described the interfacial encapsulation method to encapsulate various proteins of increasing molecular weight such as BSA, ovalbumin and papain within $CaCO_3$ microcapsules [29, 36]. It is noteworthy to mention that the molecular weight of the protein to be encapsulated was proportional with the encapsulation yield. Thus, no inclusion of lysozyme, the smallest protein, into vacant $CaCO_3$ microcapsules was observed (encapsulation yield < 0.01 %). However, the same research group later used phase transition from vaterite to calcite method to encapsulate lysozyme; the obtained loading was about 0.2 % with an encapsulation yield of about 17 % [36]. An impregnation (or physical adsorption) process of proteins onto preformed $CaCO_3$ microspheres has been studied by Volodkin*et al.*[20]. These authors demonstrated that protein adsorption is not only depending on protein molecular weight, but also on the charge of the protein and the microparticles. Due to the diffusion limitation, large molecules such as Dextran (2000 k.Da) could not diffuse deeply inside $CaCO_3$ microspheres. Protein adsorption is governed by the electrostatic interactions; the pH of the medium plays an important role since proteins can bear positive or negative charges according to their isoelectric point. The comparison of physical adsorption and co-precipitation methods was performed by Petrov*et al*[31]., it was demonstrated that co-precipitation-protein capture into $CaCO_3$ microspheres was five times more effective than the physical adsorption. Besides, α-chymotrypsine recovered 85% of its native activity after being captured during $CaCO_3$ growth. Interestingly, a study described the encapsulation of small molecules as well as proteins within $CaCO_3$ nanoparticles, using both co-precipitation and absorption methods, but no loading nor encapsulation efficiency data were available in the case of the studied proteins[33].

In our strategy, we successfully obtained a high encapsulation efficiency of lysozyme into $CaCO_3$microparticles. In addition, the SC-CO_2 process offers optimal conditions [55] in terms of protein stability and integrity and permitted to retention of 90 % of the biological activity of lysozyme as proved by the *Micrococcus lysodeikticus* assays, which is in prefect agreement with a review from Wimmer *et al.* describing the effect of supercritical CO_2 on enzymes, which may even enhance the stability under denaturing conditions [56].

2.4. Discussion on the mechanism of lysozyme encapsulation into $CaCO_3$microparticles

In our previous work, $CaCO_3$ particles were fully characterized [37]. It was demonstrated that $CaCO_3$ particles were formed from an aggregation of nanograins with an average diameter of 40 nm [37], which gave $CaCO_3$ particles a porous structure, and thus an available space for drug loading. As mentioned earlier, the zeta potential of $CaCO_3$ measured in distilled water is negative, which suggests that zeta potentials of $CaCO_3$ particles and $CaCO_3$nanograins would also be negative in the basic synthesis medium which is buffered by glycin-NaOH. On the other hand, lysozyme is positively charged in the synthesis medium due to the fact that the pHi of lysozyme is about 11. Therefore, it is believed that during the formation of $CaCO_3$ particles in the basic medium, there is electrostatic interaction between lysozyme and $CaCO_3$nanograins, which allows lysozyme to attach themselves to the surface of $CaCO_3$nanograins, leading to the subsequent encapsulation of lysozyme within $CaCO_3$ particles. By now, *in-situ* pH measurements and *in-situ* X-ray diffraction experiments in CO_2 media have been carried out by our team to help us get more insight into the understanding of the mechanisms of particle formation and the dynamics of protein encapsulation within $CaCO_3$ particles. This is beyond the scope of this study, and the results will be presented in another paper.

2.5. Kinetic release of Lysozyme

This study was carried out at three different pH values: 7.4; 6.0; 4.5. A burst release was observed during the first 30 minutes of release, followed by a more progressive release that started to stabilize after 3 hours (Figure 9). The amount of released protein increased while lowering the pH, due to the faster degradation of $CaCO_3$ microspheres under acidic pH, and a maximum release of 89 % was obtained after 24 hours at pH 4.5. This degradation was observed at 24 hours of kinetic release using scanning electron microscopy. It can be noted that after 24 hours at pH 4.5, particles were totally dissolved and could not be observed anymore. It should be

pointed out that one of the applications of $CaCO_3$ particles we intend to use is to incorporate them into an implantable hydrogel system for bone and cartilage tissue engineering. Therapeutic protein will be encapsulated in $CaCO_3$ particles and undoubtedly will be released much more slowly in such conditions.

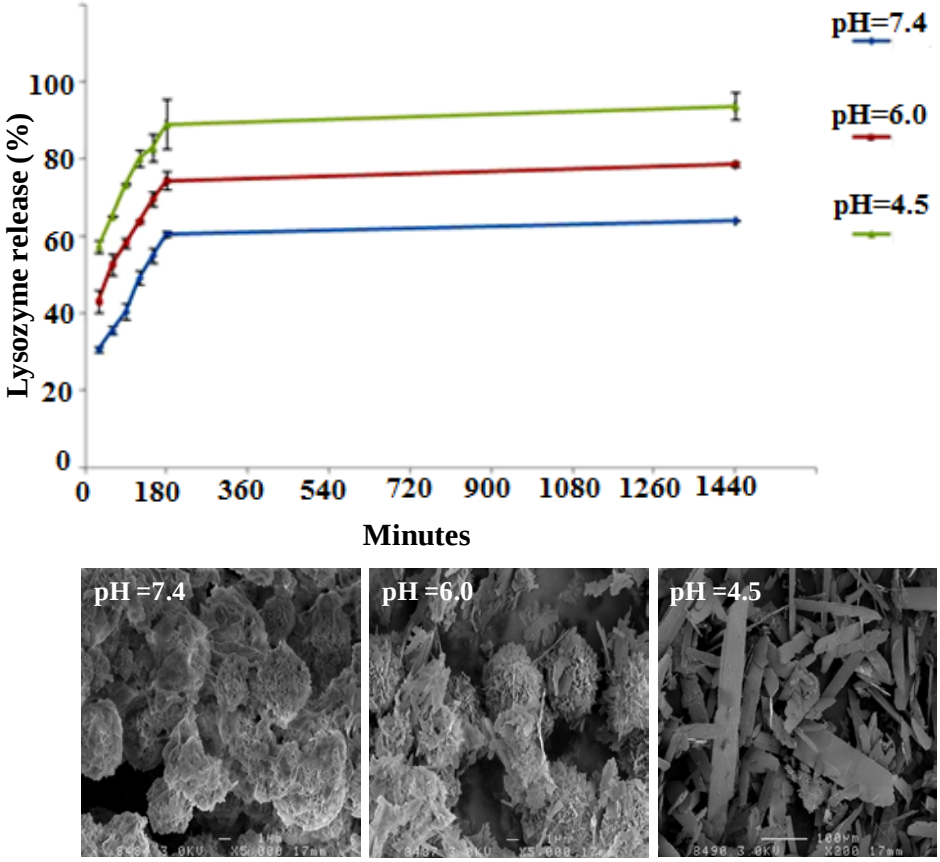


Figure 9. Lysozyme kinetic release profiles and the corresponding SEM observations of microparticles after release.

CONCLUSION

In the present study, two protein encapsulation methods were designed based on the emulsification of a polymer solution or an aqueous solution in CO_2 media. Two types of particles, polymeric PLGA and inorganic $CaCO_3$, were successfully generated. The encapsulation yields in both cases can reach 60%. The mechanism of particle formation in the case of PLGA particles appears to be complex. It might involve an emulsification/extraction process or a phase separation phenomenon depending on the experimental conditions. This work can serve as an alternative for classic methods which use volatile toxic solvents. The mechanism of $CaCO_3$ formation in the CO_2 media and the mechanism of lysozyme encapsulation within $CaCO_3$ particles were also discussed. Details about the mechanism of $CaCO_3$ formation will be presented

in the next publication by introducing results of *in-situ* experiments in CO_2 media. Lysozyme release profiles were also carried out in the case of $CaCO_3$ particles. The release profile of lysozyme from $CaCO_3$ particles reveals it to be pH-dependent. Further efforts will be provided for process optimization, particle characterization, encapsulation of therapeutic proteins, *in-vitro* and *in-vivo* release, and particle surface modification as necessary steps for the development of the final product in the form of hybrid biomaterials.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors welcome the financial support of ANR (France—Project ANR-09-PIRI-0004-01), the regional research program (Pays de Loire, France—Bioregos program) and the French ministry of education. We would like to thank the SCIAM ("Service Commund'Imagerie et d'AnalyseMicroscopique") of Angers for scanning electron microscopy images and Mark J. Anderson, author of the book "RSM simplified-Optimizing processes using response surface methods for design of experiments", for reviewing the data analysis.

REFERENCES

[1] J.S. Kent (Cupertino, CA), Lewis, Danny H. (Birmingham, AL), Sanders, Lynda M. (Palo Alto, CA), Tice, Thomas R. (Birmingham, AL), Microencapsulation of water soluble active polypeptides, in, Syntex (U.S.A.) Inc. (Palo Alto, CA), U.S. patent 4,675,189 (1987).

[2] F.G. Hutchinson, B.J.A. Furr, Biodegradable carriers for the sustained release of polypeptides, Trends in Biotechnology, 5 (1987) 102-106.

[3] V.-T. Tran, J.-P. Karam, X. Garric, J. Coudane, J.-P. Benoît, C.N. Montero-Menei, M.-C. Venier-Julienne, Protein-loaded PLGA–PEG–PLGA microspheres: A tool for cell therapy, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 45 (2012) 128-137.

[4] K. Andreas, R. Zehbe, M. Kazubek, K. Grzeschik, N. Sternberg, H. Bäumler, H. Schubert, M. Sittinger, J. Ringe, Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: Investigation for cartilage tissue engineering, Acta Biomaterialia, 7 (2011) 1485-1495.

[5] E. Ruiz-Hitzky, K. Ariga, Y.M. Lvov, Bio-inorganic Hybrid Nanomaterials: Strategies, Syntheses, Characterization and Applications, John Wiley & Sons, 2008.

[6] G.S. Kwon, Polymeric Drug Delivery Systems, Taylor & Francis, 2005.

[7] A. Aubert-Pouëssel, M.-C. Venier-Julienne, A. Clavreul, M. Sergent, C. Jollivet, C.N. Montero-Menei, E. Garcion, D.C. Bibby, P. Menei, J.-P. Benoit, In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres, Journal of Controlled Release, 95 (2004) 463-475.

[8] T. Morita, Y. Sakamura, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant, Journal of Controlled Release, 69 (2000) 435-444.

[9] C. Thomasin, H.P. Merkle, B.A. Gander, Physico-chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation, International Journal of Pharmaceutics, 147 (1997) 173-186.

[10] J. Kluge, F. Fusaro, N. Casas, M. Mazzotti, G. Muhrer, Production of PLGA micro- and nanocomposites by supercritical fluid extraction of emulsions: I. Encapsulation of lysozyme, The Journal of Supercritical Fluids, 50 (2009) 327-335.

[11] B. Gander, P. Johansen, H. Nam-Trân, H.P. Merkle, Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly(D,L-lactide) by spray drying, International Journal of Pharmaceutics, 129 (1996) 51-61.

[12] J.M. Péan, M.C. Venier-Julienne, R. Filmon, M. Sergent, R. Phan-Tan-Luu, J.P. Benoit, Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles, International Journal of Pharmaceutics, 166 (1998) 105-115.

[13] J.-M. Péan, F. Boury, M.-C. Venier-Julienne, P. Menei, J.-E. Proust, J.-P. Benoit, Why Does PEG 400 Co-Encapsulation Improve NGF Stability and Release from PLGA Biodegradable Microspheres?, Pharmaceutical Research, 16 (1999) 1294-1299.

[14] I.J. Castellanos, W.L. Cuadrado, K. Griebenow, Prevention of structural perturbations and aggregation upon encapsulation of bovine serum albumin into poly(lactide-co-glycolide) microspheres using the solid-in-oil-in-water technique, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 53 (2001) 1099-1107.

[15] I.J. Castellanos, G. Flores, K. Griebenow, Effect of cyclodextrins on α-chymotrypsin stability and loading in PLGA microspheres upon S/O/W encapsulation, Journal of Pharmaceutical Sciences, 95 (2006) 849-858.

[16] G.G.Lapka (Belleville, IL), Mason, Norbert S. (Clayton, MO), Thies, Curt (Ballwin, MO), Process for preparation of microcapsules, in, The Washington University (St. Louis, MO), U.S. patent 4,622,244 (1986).

[17] M.J. Whitaker, J. Hao, O.R. Davies, G. Serhatkulu, S. Stolnik-Trenkic, S.M. Howdle, K.M. Shakesheff, The production of protein-loaded microparticles by supercritical fluid enhanced mixing and spraying, Journal of Controlled Release, 101 (2005) 85-92.

[18] A. Vinu, N. Gokulakrishnan, T. Mori, K. Ariga, Immobilization of Biomolecules on Mesoporous Structured Materials, in: Bio-inorganic Hybrid Nanomaterials, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, pp. 113-157.

[19] Y.M. Lvov, R.R. Price, Halloysite Nanotubules, a Novel Substrate for the Controlled Delivery of Bioactive Molecules, in: Bio-inorganic Hybrid Nanomaterials, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, pp. 419-441.

[20] D.V. Volodkin, N.I. Larionova, G.B. Sukhorukov, Protein Encapsulation via Porous CaCO3 Microparticles Templating, Biomacromolecules, 5 (2004) 1962-1972.

[21] G.B. Sukhorukov, D.V. Volodkin, A.M. Gunther, A.I. Petrov, D.B. Shenoy, H. Mohwald, Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds, J. Mater. Chem., 14 (2004) 2073-2081.

[22] Y. Wang, F. Caruso, Bioinspired Porous Hybrid Materials via Layer-by-Layer Assembly, in: Bio-inorganic Hybrid Nanomaterials, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, pp. 209-238.

[23] C. Domingo, E. Loste, J. Gómez-Morales, J. García-Carmona, J. Fraile, Calcite precipitation by a high-pressure CO2 carbonation route, The Journal of Supercritical Fluids, 36 (2006) 202-215.

[24] G. Montes-Hernandez, F. Renard, N. Geoffroy, L. Charlet, J. Pironon, Calcite precipitation from CO2-H2O-Ca(OH)2 slurry under high pressure of CO2, Journal of Crystal Growth, 308 (2007) 228-236.

[25] M. Kitamura, H. Konno, A. Yasui, H. Masuoka, Controlling factors and mechanism of reactive crystallization of calcium carbonate polymorphs from calcium hydroxide suspensions, Journal of Crystal Growth, 236 (2002) 323-332.

[26] C. Peng, Q. Zhao, C. Gao, Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO3 and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO3 microparticles, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 353 (2010) 132-139.

[27] T. Ikoma, T. Tonegawa, H. Watanaba, G. Chen, J. Tanaka, Y. Mizushima, Drug-Supported Microparticles of Calcium Carbonate Nanocrystals and Its Covering with Hydroxyapatite, J. Nanosci. Nanotechnol., 7 (2007) 822-827.

[28] A. Lucas-Girot, M.-C. Verdier, O. Tribut, J.-C. Sangleboeuf, H. Allain, H. Oudadesse, Gentamicin-loaded calcium carbonate materials: Comparison of two drug-loading modes, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 73B (2005) 164-170.

[29] M. Fujiwara, K. Shiokawa, K. Morigaki, Y. Zhu, Y. Nakahara, Calcium carbonate microcapsules encapsulating biomacromolecules, Chemical Engineering Journal, 137 (2008) 14-22.

[30] D. Zhao, R.-X. Zhuo, S.-X. Cheng, Alginate modified nanostructured calcium carbonate with enhanced delivery efficiency for gene and drug delivery, Molecular BioSystems, 8 (2012).

[31] A.I. Petrov, D.V. Volodkin, G.B. Sukhorukov, Protein—Calcium Carbonate Coprecipitation: A Tool for Protein Encapsulation, Biotechnology Progress, 21 (2005) 918-925.

[32] M.-L. De Temmerman, J. Demeester, F. De Vos, S.C. De Smedt, Encapsulation Performance of Layer-by-Layer Microcapsules for Proteins, Biomacromolecules, 12 (2011) 1283-1289.

[33] Y. Ueno, H. Futagawa, Y. Takagi, A. Ueno, Y. Mizushima, Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system, Journal of Controlled Release, 103 (2005) 93-98.

[34] M. Dierendonck, S. De Koker, C. Cuvelier, J. Grooten, C. Vervaet, J.-P. Remon, B.G. De Geest, Facile Two-Step Synthesis of Porous Antigen-Loaded Degradable Polyelectrolyte Microspheres, Angewandte Chemie International Edition, 49 (2010) 8620-8624.

[35] A. Lopez-Marzo, J. Pons, A. Merkoci, Controlled formation of nanostructured CaCO3-PEI microparticles with high biofunctionalizing capacity, J. Mater. Chem., 22 (2012) 15326-15335.

[36] M. Fujiwara, K. Shiokawa, M. Araki, N. Ashitaka, K. Morigaki, T. Kubota, Y. Nakahara, Encapsulation of Proteins into CaCO3 by Phase Transition from Vaterite to Calcite, Crystal Growth & Design, 10 (2010) 4030-4037.

[37] T. Beuvier, B. Calvignac, G.J.-R. Delcroix, M.K. Tran, S. Kodjikian, N. Delorme, J.-F. Bardeau, A. Gibaud, F. Boury, Synthesis of hollow vaterite CaCO3 microspheres in supercritical carbon dioxide medium, J. Mater. Chem., 21 (2011) 9757-9761.

[38] E.A. Chavez Panduro, T. Beuvier, M. Fernandez Martinez, L. Hassani, B. Calvignac, F. Boury, A. Gibaud, Small-angle X-ray scattering analysis of porous powders of CaCO3, Journal of Applied Crystallography, 45 (2012).

[39] S.M. Mottu F, Rüfenacht DA, Doelker E, Comparative hemolytic activity of undiluted organic water-miscible solvents for intravenous and intra-arterial injection, PDA J Pharm Sci Technol., 55 (2001) 16-23.

[40] L.A. Mottu F, Rufenacht DA, Doelker E, Organic solvents for pharmaceutical parenterals and embolic liquids: a review of toxicity data, PDA J Pharm Sci Technol., 54 (2000 Nov-Dec) 456-469.

[41] F. Mottu, P. Gailloud, D. Massuelle, D.A. Rüfenacht, E. Doelker, In vitro assessment of new embolic liquids prepared from preformed polymers and water-miscible solvents for aneurysm treatment, Biomaterials, 21 (2000) 803-811.

[42] M.F. Laurent A, Chapot R, Zhang JQ, Jordan O, Rüfenacht DA, Doelker E, Merland JJ, Cardiovascular effects of selected water-miscible solvents for pharmaceutical injections and embolization materials: a comparative hemodynamic study using a sheep model, PDA J Pharm Sci Technol., 61 (2007 Mar-Apr) 64-74.

[43] A. Giteau, M.-C. Venier-Julienne, S. Marchal, J.-L. Courthaudon, M. Sergent, C. Montero-Menei, J.-M. Verdier, J.-P. Benoit, Reversible protein precipitation to ensure stability during encapsulation within PLGA microspheres, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 70 (2008) 127-136.

[44] M.J. Anderson, P.J. Whitcomb, RSM simplified: optimizing processes using response surface methods for design of experiments, Productivity press, 2005.

[45] F. Boury, J. Benoit, O. Thomas, F. Tewes, Method for preparing particles from an emulsion in supercritical or liquid CO_2 ,U.S. Patent 20090087491, (2009).

[46] D. Allhenn, A. Lamprecht, Microsphere Preparation Using the Untoxic Solvent Glycofurol, Pharmaceutical Research, 28 (2010) 563-571.

[47] M.-K. Tran, A. Swed, F. Boury, Preparation of polymeric particles in CO2 medium using non-toxic solvents: Formulation and comparisons with a phase separation method, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 82 (2012) 498-507.

[48] H. Wakayama, S.R. Hall, Y. Fukushima, S. Mann, CaCO3/Biopolymer Composite Films Prepared Using Supercritical CO2, Industrial & Engineering Chemistry Research, 45 (2005) 3332-3334.

[49] H. Wakayama, S.R. Hall, S. Mann, Fabrication of CaCO3-biopolymer thin films using supercritical carbon dioxide, J. Mater. Chem., 15 (2005) 1134-1136.

[50] W. Gu, D.W. Bousfield, C.P. Tripp, Formation of calcium carbonate particles by direct contact of Ca(OH)2 powders with supercritical CO2, J. Mater. Chem., 16 (2006) 3312-3317.

[51] Z. Bing, J.Y. Lee, S.W. Choi, J.H. Kim, Preparation of porous CaCO3/PAM composites by CO2 in water emulsion templating method, European Polymer Journal, 43 (2007) 4814-4820.

[52] Z. Zhang, D. Gao, H. Zhao, C. Xie, G. Guan, D. Wang, S.-H. Yu, Biomimetic Assembly of Polypeptide-Stabilized CaCO3 Nanoparticles, The Journal of Physical Chemistry B, 110 (2006) 8613-8618.

[53] C. Jimenez-Lopez, A. Rodriguez-Navarro, J.M. Dominguez-Vera, J.M. Garcia-Ruiz, Influence of lysozyme on the precipitation of calcium carbonate: a kinetic and morphologic study, Geochimica et Cosmochimica Acta, 67 (2003) 1667-1676.

[54] L. Yang, L. She, J.-G. Zhou, Y. Cao, X.-M. Ma, Interaction of lysozyme during calcium carbonate precipitation at supramolecular level, Inorganic Chemistry Communications, 9 (2006) 164-166.

[55] Y. Ueno, H. Futagawa, Y. Takagi, A. Ueno, Y. Mizushima, Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system, J Control Release, 103 (2005) 93-98.

[56] M.A. Winters, B.L. Knutson, P.G. Debenedetti, H.G. Sparks, T.M. Przybycien, C.L. Stevenson, S.J. Prestrelski, Precipitation of proteins in supercritical carbon dioxide, Journal of Pharmaceutical Sciences, 85 (1996) 586-594.

[57] Z. Wimmer, M. Zarevucka, A review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity, Int J Mol Sci, 11 233-253.

IV.2 CHAPITRE 2: Encapsulation de protéines dans des particules de PLGA préparées en milieu CO_2 pressurisé en utilisant des solvants non-toxiques: formulation et comparaisons avec la méthode de séparation de phase

Nous avons montré dans la première partie de notre étude que des particules sphériques de PLGA pouvaient être formulées à l'aide d'un procédé basé sur la dispersion d'une phase organique (glycofurol, GF) dans une phase de CO_2 pressurisé. Par ailleurs, ce procédé montre la possibilité d'encapsuler avec succès une protéine modèle, préformulée sous forme de nanoprécipité. Cependant, les résultats préliminaires ont révélé la complexité du procédé. En effet, les données obtenues lors de l'étape d'optimisation du rendement d'encapsulation indiquent que de faibles quantité d'éthanol sont favorables pour l'encapsulation de la protéine mais ne sont pas optimales pour réaliser l'étape d'émulsification. Ainsi, dans les conditions étudiées, et en présence de glycofurol, la formation des particules de PLGA semble faire intervenir deux mécanismes physico-chimiques distincts : un phénomène d'émulsification/extraction de solvant et un phénomène de séparation de phase. Afin de mieux comprendre ces deux mécanismes et discerner leur rôle dans la formation des particules de PLGA, nous nous sommes tout d'abord placés dans des conditions où seule la séparation de phase était impliquée dans la formation des particules. Ainsi, nous présenterons les résultats d'une étude de formulation basée sur l'addition d'une phase liquide (éthanol et eau) permettant la désolvatation ménagée du polymère PLGA initialement dissout dans le glycofurol.

Dans une deuxième partie de ce chapitre, nous avons cherché à élaborer un nouveau procédé d'émulsification/extraction en milieu CO_2 pressurisé mais en utilisant un autre solvant injectable, l'isosorbide dimethyl ether (DMI), qui présentait un meilleur profil toxicologique que le glycofurol (voir partie bibliographique, partie II.2) et une plus grande capacité à solubiliser le PLGA. Nous souhaitions utiliser la méthode d'émulsification/extraction pour la formulation de particules de PLGA car cette méthode permet de contrôler facilement la taille des particules, ce qui peut être utile selon les applications recherchées. Après avoir étudié la faisabilité du procédé, nous avons cherché à rendre modulables les conditions de formulation en milieu pressurisé en étudiant notamment des mélanges DMI/GF.

Pour les différentes approches, nous avons concentré notre travail sur l'étape de formulation en utilisant la méthodologie des plans d'expérience afin de mettre en évidence l'effet des différents facteurs sur le rendement d'encapsulation et trouver les zones optimales dans le domaine expérimental pour optimiser les procédés.

Les résultats obtenus sont présentés dans la publication intitulée "Preparation of Polymeric Particles in CO_2 medium using Non Toxic Solvents: Formulation and Comparisons with a Phase Separation Method" publiée dans " European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics".

L'encapsulation de protéine dans les particules de carbonate de calcium s'avère prometteuse, mais nécessite des études approfondies concernant la caractérisation physicochimique des particules et la compréhension de la formation des particules en milieu CO_2 pressurisé. Désormais, cette étude fait l'objet d'un autre projet de recherche dans notre laboratoire.

PREPARATION OF POLYMERIC PARTICLES IN CO_2 MEDIUM USING NON TOXIC SOLVENTS: FORMULATION AND COMPARISONS WITH A PHASE SEPARATION METHOD

My-Kien. TRAN[a,b], Amin. SWED[a,b], Frank. BOURY[a,b].

[a]LUNAM Université, Angers, France.

[b]INSERM U1066, Micro et Nanomedécines Biomimétiques, IBS, 4 rue Larrey, F-49933 Angers cedex 9, France.

Corresponding author: Frank.BOURY (e-mail: frank.boury@univ-angers.fr; Tel: 33 2 44 68 85 28; Fax: +33 2 44 68 85 46)

Abstract:

The aim of this work was to elaborate formulation strategies to encapsulate a protein into biodegradable polymeric particles for sustained release purpose. In this paper, two encapsulation methods will be presented, one dealing with a phase separation phenomenon while the other involving an emulsification/extraction process in CO_2 medium. In those methods, only non-volatile injectable solvents such as glycofurol or isosorbide dimethyl ether were used to dissolve the polymer. Moreover, experimental designs were built up to help us to go further in the understanding of the processes and to better predict output responses in design space. Spherical particles were successfully generated with a satisfactory encapsulation yield. Further characterization steps such as *in-vitro, in-vivo* releases will be carried out to validate the interest of our encapsulation methods in the development of drug delivery systems.

Key words: non-toxic solvents, protein encapsulation, drug delivery systems, experimental design, CO_2, poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA).

I. INTRODUCTION

Protein encapsulation in biodegradable polymers has been drawing attention of researchers since decades [1, 2] and it is still the subject of many publications in recent years [3, 4]. This research

topic arises from the fact that many therapeutic proteins have been discovered and the encapsulation of these molecules into a controlled release system can improve the therapeutic efficiency and offers benefits to patient comfort [5]. Hence, many encapsulation methods have been developed to respond to the actual need such as: water/oil/water (w/o/w) [6], solid/oil/water (s/o/w) [7], simple coacervation [8] and other derivative methods [9, 10]. Although each method presents its own disadvantages, proteins can be encapsulated more or less successfully by these methods. With no intention to be exhaustive, some disadvantages of each method are listed below for illustration purpose. For instances, in the w/o/w method, proteins may absorb at w/o interfaces, unfold and loss their integrity [5]. To avoid destructive w/o interfaces, s/o/w and solid/oil/oil (s/o/o) have been developed and their utility have been proven by many works [3, 7, 11, 12]. However, amount of residual solvent and non polar character of the continuous phase are considered as drawbacks in s/o/o method while low encapsulation efficiency and the diffusion of stabilizing agents into the water phase are issues of s/o/w method [13]. In classic simple coacervation method, which was widely used for protein and peptide encapsulation, the main problem lies in the toxicity of residual coacervating and hardening agents remaining in the final product [14].

In those methods mentioned above, the use of volatile solvents such as halogenated solvents is rarely avoided, which is harmful to human health and the environment. Hence, it is of great importance to find ways of avoiding the use of these solvents in the encapsulation process. An interesting approach was developed based on the PGSS (Particle Gas Saturated System) method, which allows poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) microparticles to be formed in CO_2 medium without using any organic solvent in a mild condition of temperature [15]. Moreover, it was reported that there was no significant loss of activity of proteins encapsulated by this technique. However, according to the authors, it is difficult to control the size, shape and drug release kinetics of this type of PLGA microparticles [15]. Therefore, this technique requires further improvements to prove its interest in the development of protein delivery system. Another approach is to use non-volatile water-miscible solvents [16, 17], which are much safer than the volatile ones. One example of this approach is the work of Ugo Balati *et al*. [18] in which DMSO or n-methyl pyrrolidone was used to dissolve PLGA and proteins. PLGA nanoparticles were formed by a process called nanoprecipitation when polymer solution was put in contact with a non-solvent of PLGA like water or ethanol.

In this paper, we present two encapsulation methods where protein was firstly precipitated and the suspension of protein precipitates was then mixed with a polymer solution prepared in glycofurol (GF) or in a mixture of GF and isosorbide dimethyl ether (DMI). To our best knowledge, GF and DMI are the two safest injectable solvents used in different drug products for parenteral or other therapeutic uses [19-24] with a consistently low toxicity demonstrated through many studies [24-27]. This is the rationale of our work on the formulation of PLGA particles using different preparation methods. In this present paper as our first piece of work related to protein encapsulation in PLGA particles using water-miscible injectable solvents, two encapsulation methods named emulsification/extraction method in CO_2 medium and phase separation method will be shown. The aim of this work was to optimize these two encapsulation processes using experimental design. Different formulation variables such as solvent composition, pH, polymer concentration, etc. were studied to allow optimal conditions of encapsulation process to be found. Besides, comparisons between these two processes will be made.

II. MATERIALS & METHODS

II.1 Materials:

Lysozyme (chicken egg-white), *Micrococcus lysodeikticus*, glycofurol (tetraglycol or α-[(tetrahydro-2-furanyl) methyl]-ω-hydroxy-poly(oxy-1,2-ethandiyl), isosorbide dimethyl ether (1,4:3,6-Dianhydro-2,5-di-O-methyl-D-glucitol) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier,France). Uncapped 75/25 PLGA provided by Phusis (Saint-Ismier, France) had a mean molecular weight of 21,000 Da (polydispersity index I=1.8) as determined by size-exclusion chromatography (standard: polystyrene). Poly (ε-caprolactone) (Capa® 6250, Mw 25,000) was kindly supplied by Perstorp (Warrington, England). Lutrol F68 and Lutrol F127 were purchased from BASF (Laserson, France).

II.2 Methods:

II.2.1. Preparation of particles using phase separation method:

*Preparation of protein precipitates:

Protein precipitation using GF had been optimized by A.Giteau *et al* [28]. Precipitation condition of experiment number 4, which is one of the optima found by the author, was chosen to perform the precipitation step. Concretely, lysozyme was dissolved in 0.16 M NaCl solution at the

concentration of 20 mg/ml. Thereafter, 25 µl of this solution was then mixed into 975 µl of glycofurol, which played here a role of anti-solvent, to obtain a suspension of precipitated protein for further use.

*Preparation of polymer solution:

A stock solution of 12% (w/v) PLGA in glycofurol was firstly prepared. Concentrations in this present paper will be expressed in w/v unless otherwise stated. Precisely, after adding PLGA to glycofurol, the mixture was left under stirring for about 48 hours and then was left to stand for at least 7 days at room temperature. During this period of time, a macroscopic evolution of polymer solution was observed. This phenomenon was probably due to a reorganization of polymer chains with time leading to a partial precipitation of polymer from the solution. Before any further use, the solution was filtered through 0.2 µm pore size filter (Minisart RC 25, Sartorius Stedim).

*Preparation of protein-loading particles:

Firstly, 100 µl of suspension of protein precipitates in GF was added into 200 µl of polymer solution in GF to obtain finally a suspension of protein precipitates in polymer solution. The final polymer concentration in this suspension was either 5% or 8%. A certain amount of ethanol (50-150 µl) was then added into it, right before some volume (0.9-1.8 ml) of a 1% Lutrol F68 solution (solution X) was added into this mixture to start the phase separation. Thereafter, 15 ml of a 1% Lutrol solution in glycin buffer 1.25 mM pH (9-11) (solution Y) was introduced into the suspension. pH was measured using a MicropH2001pH-meter with a resolution of 0.01 pH (Crison Instruments, Paris, France). It should be noted that pH below 9 did not give a good result in terms of particle collection after centrifugation based on our previous work. After 15 minutes, 15-25 ml of the solution Y was added into the suspension and this suspension was left to stand for 12-24 hours for the extraction step. It should be noted that at the end of the formulation pH was found to be around 7.After that, the suspension of particles was concentrated by successively centrifuging at 1000 g for 30 minutes and then 2000 g for 30 minutes. Only redispersible particles were collected and the supernatant was eliminated. The final volume of the suspension was about 1 ml. This suspension was then freeze-dried for further quantification. A brief procedure is summarized in Figure 1.

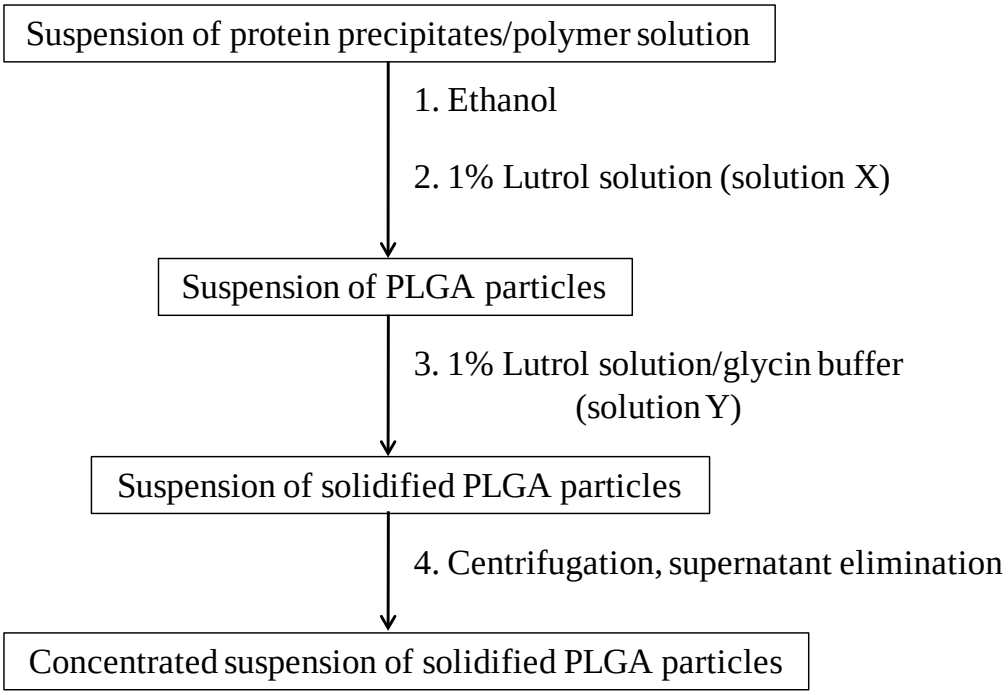


Figure 1 : flow chart of the procedure used for the preparation of protein-loading PLGA particles by phase separation

To optimize the formulation procedure, an experimental design was used. At the outset of our experimental program, a screening design was carried out to evaluate the impact of different operating factors. 7 following factors were chosen to be studied: A (extraction time), B (pH of solution Y), C (total volume of the suspension), D (volume ratio between polymer solution and solution X), E (ethanol volume), F (extraction temperature), and G (polymer concentration). In this set of experiments, a 2-level saturated fractional factorial design 2_{III}^{7-4} was used to get insight into the possible significant effects. Factorial effects defining contrast are *I = ABD = ACE = AFG = BCF = BEG = CDG = DEF = ABCG = ABEF = ACDF = ADEG = BCDE = BDFG = CEFG = ABCDEFG*. With this type of low-resolution design, main effects are confounded with two-factor interaction (2FI) effects. In fact, on the assumption that third order (3FI) effects are not significant, in our case of 7 factors, main effects will be aliased with two-factor interactions as follows [29]:

$$[A] = A + BD + CE + FG$$

$$[B] = B + AD + CF + EG$$

$$[C] = C + AE + BF + DG$$

$$[D] = D + AB + CG + EF$$

$$[E] = E + AC + BG + DF$$

$$[F] = F + AG + BC + DE$$

$$[G] = G + AF + BE + CD$$

Therefore, a foldover (mirror-image fold-over) design was applied in order to free the main effects from two-factor interactions [29, 30]. After knowing the active factors, response surface methodology may be used to optimize the process. Design-Expert® 8 (Stat-Ease, Minneapolis, U.S.) package was used for experimental design and data analysis.

II.2.2. Preparation of particles using emulsification/extraction method in CO_2 medium:

*Preparation of protein precipitates:

In this series of experiments in CO_2 medium, our goal was to study the influence of the composition of solvent mixture used to dissolve polymer on the encapsulation yield under fixed conditions of pressure and temperature. Due to the fact that PLGA is much more soluble in DMI than in GF, it was decided to prepare protein precipitates using DMI instead of using GF in order to minimize the time of homogenization when the suspension of protein precipitates was added into polymer solution.

Like in the case of GF, protein was firstly dissolved in a solution of NaCl. This solution was then mixed with DMI to allow protein precipitates to be formed. In order to optimize the precipitation condition, an experimental design was built up using a Doehlert matrix [31] in which ionic strength, volume of aqueous phase and protein quantity with the following characteristics were chosen to be studied as variables:

-ionic strength (X_1): center point - 0.3 M; step size - 0.29 M.

-volume of the aqueous phase (X_2): center point - 90 µl; step size - 75 µl.

-protein quantity (X_3): center point - 0.9 mg; step size - 0.5 mg.

The final total volume after mixing the protein solution with DMI was 1 ml.

This approach was inspired by the previous work of A. Giteau *et al.* [28] except that the range of protein quantity was modified to suit our purpose. Lysozyme was chosen as protein model and activity yield of lysozyme precipitates was the output to be measured. It was determined by measuring the turbidity of *Micrococcus lysodeikticus* suspension at 450 nm after an appropriate dilution (cf. II.2.3.2). A series of 13 distinct experiments uniformly distributed in

the spherical domain (Figure 2) was firstly carried out (Table 1). The center point of experimental domain was repeated 6 times to estimate the pure experimental error. The postulated empirical model used to calculate the response from the input variables was as follows:

$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3$

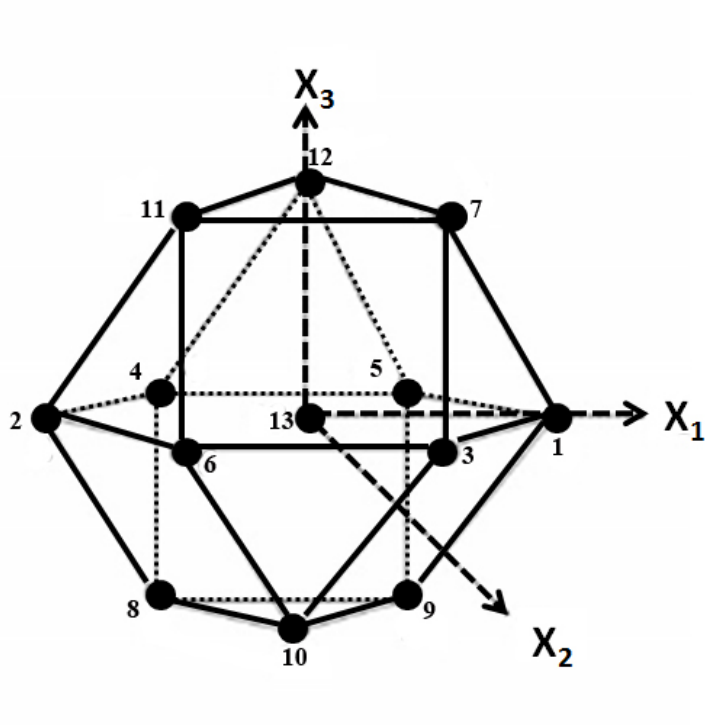


Figure 2 : distribution of experimental points in design space (Doehlert matrix).

In order to validate the postulated model, 4 check points uniformly distributed in the design space were added to the previous set of experiments. Their distance from the center point is half the radius of the chosen spherical domain. At these check points, the differences between the actual yields obtained through observation and those obtained through theoretical calculation from the empirical model were then compared with the experimental error. Besides, an ANOVA analysis was performed to test the significance of the chosen model and the overall lack-of-fit of the experimental points in the domain. Nemrodw® (LPRAI, Marseille, France) was used for experimental design and data analysis.

Table 1 : experimental points with the corresponding activity yield of protein precipitates prepared using DMI.

N°Exp	ionic strength (M)	aqueous volume (µl)	protein quantity (mg)	activity yield (%)
1	0.59 (1.000)	90.0 (0.000)	0.9 (0.000)	90.6
2	0.01 (-1.000)	90.0 (0.000)	0.9 (0.000)	94.9
3	0.44 (0.500)	155.0 (0.866)	0.9 (0.000)	97.0
4	0.16 (-0.500)	25.0 (-0.866)	0.9 (0.000)	90.7
5	0.44 (0.500)	25.0 (0.866)	0.9 (0.000)	76.7
6	0.16 (-0.500)	155.0 (0.866)	0.9 (0.000)	90.9
7	0.44 (0.500)	111.7 (0.289)	1.3 (0.816)	81.5
8	0.16 (-0.500)	68.3 (-0.289)	0.5 (-0.816)	80.9
9	0.44 (0.500)	68.3 (-0.289)	0.5 (-0.816)	100.0
10	0.30 (0.000)	133.3 (0.577)	0.5 (-0.816)	100.0
11	0.16 (-0.500)	111.7 (0.289)	1.3 (0.816)	80.0
12	0.30 (0.000)	46.7 (0.577)	1.3 (0.816)	88.5
13	0.30 (0.000)	90.0 (0.000)	0.9 (0.000)	92.9
14	0.30 (0.000)	90.0 (0.000)	0.9 (0.000)	90.5
15	0.30 (0.000)	90.0 (0.000)	0.9 (0.000)	102.0
16	0.30 (0.000)	90.0 (0.000)	0.9 (0.000)	98.0
17	0.30 (0.000)	90.0 (0.000)	0.9 (0.000)	94.9

18	0.30 (0.000)	90.0 (0.000)	0.9 (0.000)	97.0
19	0.18 (-0.408)	72.3 (-0.236)	0.8 (-0.167)	87.5
20	0.42 (0.408)	72.3 (-0.236)	0.8 (-0.167)	90.0
21	0.30 (0.000)	125.4 (0.471)	0.8 (-0.167)	102.5
22	0.30 (0.000)	90.0 (0.000)	1.1 (0.500)	94.5

Values in parentheses are coordinates of experimental points presented in coded form.

Points number 19, 20, 21, 22 were check points used for the validation of empirical model.

*Preparation of protein-loading particles:

The following preparation procedure was adapted from a process patented by our laboratory[32]. A scheme of the experimental setup used for the preparation of PLGA particles is shown in Figure 3. Firstly, 0.4 ml of a suspension of lysozyme precipitates in polymer solution was introduced in a 14 ml view-cell (E1), which was kept at the operating temperature (39.6 ± 0.1°C) by a thermostated water bath. Lysozyme and PLGA amounts were respectively 0.09 mg and 30 mg. The suspension was prepared by adding 100 µl of lysozyme precipitates in DMI with 300 µl polymer solution. CO_2 was then delivered to the cell by means of a membrane pump. The mechanical stirring was kept at 1500 rpm to favor the formation of an emulsion in CO_2. Once the desired pressure (80 ± 0.1 bars) was reached, 1.5 ml of 1% Lutrol F68 solution prepared in glycin buffer (0.625M) pH 10 (E2) was injected to the cell using a HPLC pump. The stirring was kept for 20 minutes before a depressurizing step. A suspension of particles was then collected in (E3), which contained 5ml of 9% Lutrol F127 solution (solution E4). This suspension was left to stand for 30 minutes before 35 ml of solution E4 was added into it. This final suspension was left to stand at ambient temperature (≈25°C) for 8 hours. Thereafter, the suspension was centrifuged at 2000g for 30 minutes, which allows particles to be collected. Particles were washed one time with distilled water before being freeze-dried.

We believe that under known conditions of temperature and pressure, emulsification in CO_2 medium and the consequent impact on the encapsulation yield will strongly depend on the composition of solvent mixture. Hence, a mixture design was built up in which DMI, GF, and

ethanol were chosen as components and Scheffé canonical polynomials [33]were chosen as regression models. These three components vary as shown:

$$0.25 \leq A\ (DMI)$$

$$0 \leq B\ (GF) \leq 0.5$$

$$0 \leq C\ (ethanol) \leq 0.25$$

$$A + B + C = 1$$

The total volume of solvents and the amount of PLGA were respectively fixed at 400 µl and 30 mg. 100 µl of protein suspension, which was used to mix with 300 µl of polymer solution, was considered as 100 µl of DMI in the calculation of solvent composition.

The experimental domain with the chosen constraints is not a simplex. Thus, point exchange algorithm and coordinate exchange algorithm [34] have been used to search experimental points across the design space based on IV-optimum (I-optimum) criterion, which minimizes the integral of prediction variance over the experimental domain [35]. Quadratic model was firstly chosen for our study. A series of 11 distinct experimental points was then found based on the above-mentioned criterion. Some points were repeated for the estimation of the pure experimental error (5 degrees of freedom). The model may be eventually augmented if necessary by adding extra points to the design space. Design-Expert® 8 (Stat-Ease, Minneapolis, U.S.) package was used for experimental design and data analysis.

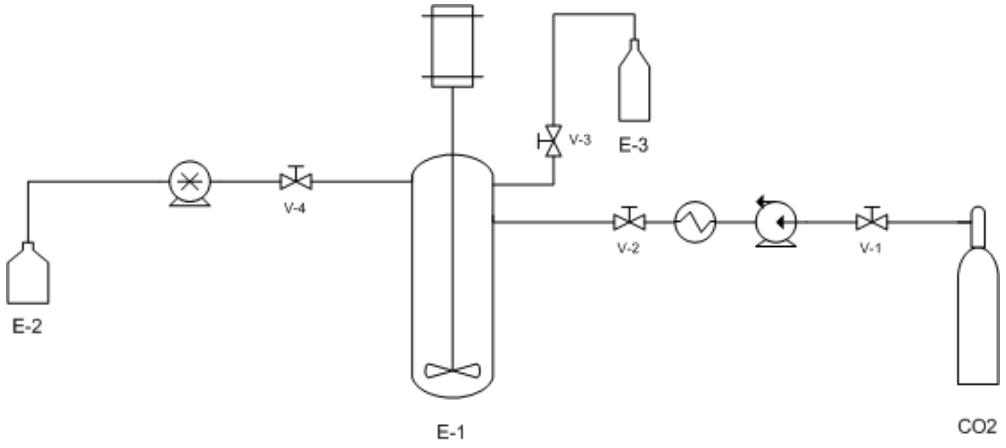


Figure 3 : Schematic diagram of the experimental setup.

II.2.3. Particles characterization:

II.2.3.1. Morphology and size:

The surface morphology of the particles was investigated by scanning electron microscopy (SEM) (JSM 6310F, JEOL, Paris, France) at accelerating potential of 3 kV. Freeze-dried particles were mounted onto metal stubs using double-sided adhesive tape and then vacuum-coated with a film of gold using a MED 020 (Bal-Tec, Balzers, Lichtenstein).

Particle size was determined by dynamic light scattering technique. A Nanosizer® (Malvern Instruments, Worcestershire,UK) was used in the case of particles prepared by phase separation while those obtained from emulsification/extraction method were measured by a Mastersizer® 2000HS (Malvern Instruments, Worcestershire,UK). Suspensions of particles in distilled water before freeze-dried step were used for these analyses.

II.2.3.2. Encapsulation yield of protein:

The biologically active entrapped protein was determined using *Micrococcus lysodeikticus* [3, 28]. Briefly, the total amount of each batch (15-30 mg according to experiment conditions) of freeze-dried lysozyme-loaded microparticles obtained after formulation was dissolved in 0.9 ml of DMSO. After 1 hour, 3 ml of 0.01M HCl was added. The solution was left to stand for 1 more hour and then diluted to an appropriate range of concentration before being incubated overnight with a suspension of *Micrococcus lysodeikticus*. Lysozyme activity determination was based on turbidity measurement at 450 nm (UVIKON 922, Kontron Instruments, France). The amount of encapsulated active protein was calculated using a standard curve after subtraction of the control value of blank sample. The blank sample was prepared in the same condition of protein-loaded sample in absence of protein precipitates. It should be pointed out that blank sample did not show any lysis effect on *Micrococcus lysodeikticus.*

II.2.3.3. DSC analysis:

Differential scanning calorimetry (DSC) was performed with a Mettler Toledo Star System (Mettler-Toledo, Viroflay, France). Approximately 10 mg of sample was placed in a sealed aluminum DSC pan without hole. The measurements were carried out at 5°C.min^{-1} under nitrogen flow. The sample was firstly heated to 70°C. Thereafter the sample was cooled down to 0°C before being reheated to 70°C. Thermal data were taken from the second heating step using the supplied software.

III. RESULTS & DISCUSSIONS

III.1. Formulation of lysozyme-loading particles using phase separation method:

At the initial stage of our experimental program, screening design was firstly performed to find influential factors on the encapsulation yield. It can be seen in the half-normal plot (Figure 4) that only the estimation of the effect of factor B (pH) falls off to right of the line, which means this effect has contributed the most to the variation of the response. Other effects falling in line, which represents a normal scatter presumably due to experimental error, are probably insignificant. As already said in the method part, the factor B confounds with some of two-factor interactions such as AD, CF, EG. In order to clear the factor B of these two-factor interactions and to be able to conclude whether factor pH is significant or not, the initial design was augmented by adding its mirror image to perform a foldover design. The result is shown in the Figure 5 and this time, factor B (pH) is confirmedly active.

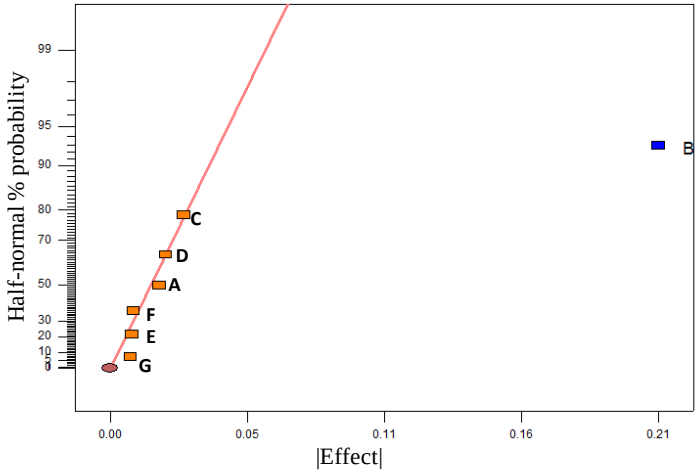


Figure 4 : half-normal plot of effects for encapsulation yield

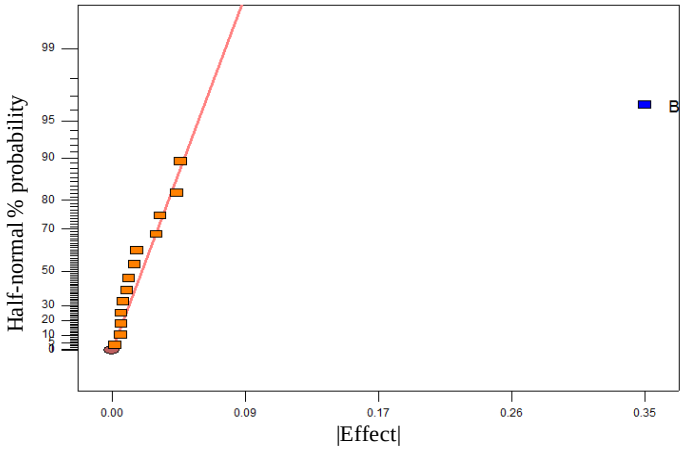


Figure 5 : half-normal plot of effects for encapsulation yield of lysozyme after foldover. (From leff to right are the estimation of E, BE, F, G, DE, D, DG, DF, CE, CF, C, EF, A, B)

At this stage of the work, our wish was to study the influence of pH on the response and eventually find the optimum condition for the encapsulation process. Hence, while keeping other factors constant, pH was gradually modified in the chosen range and then the consequent variation of the encapsulation yield was noted. It can be noted in the Figure 6 that encapsulation yield does not change much in a range of pH from 10.25 to 10.65. It can be found 75-85% of encapsulation yield in this range with a maximum of 85% at pH of 10.35. Outside this range, encapsulation yield begins to decrease, which is maybe a sign of the onset of PLGA hydrolysis in alkaline medium.

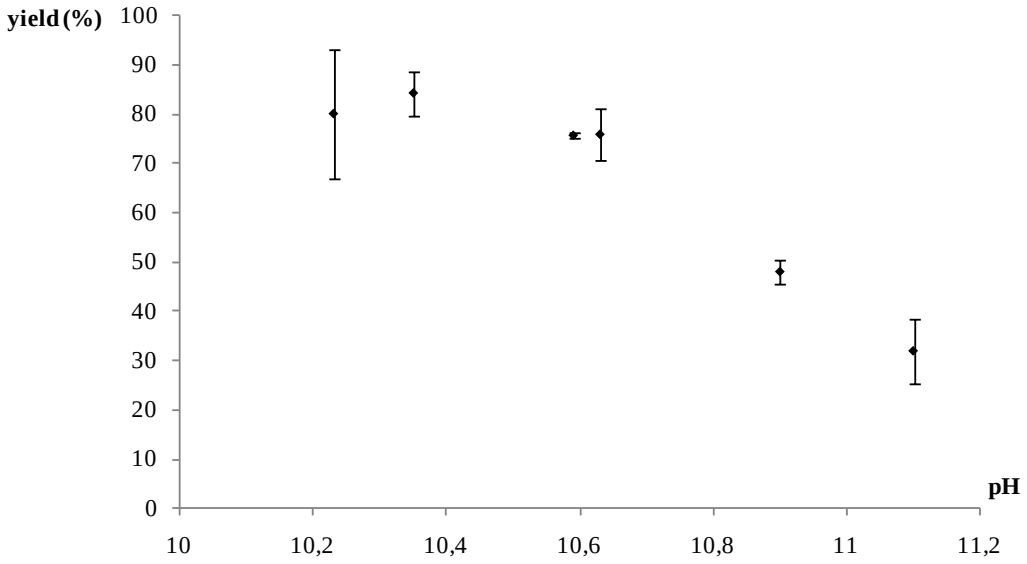


Figure 6 : variation of encapsulation yield according to pH.
(Error bars are presented as standard error of mean, n=3)

The size of particles in suspension form, determined by Nanosizer, is about 250 nm (Table 8), which is coherently confirmed by the observation of freeze-dried powder under electron microscopy (Figure 11.A). Freeze-dried particles appear to be spherical but aggregated. It suggests that there is residual GF still remaining in the particles (Tg = 27.5°C compared to Tg = 45°C of pure PLGA) [36]. However, obtaining a powder form is not our ultimate goal in this formulation part. At this stage, it seems fair for us to say that a suspension form of protein-encapsulated PLGA particles, which would be used for parenteral applications, is successfully formulated. Besides, it needs to be emphasized that the aim of this work is to encapsulate a

therapeutic protein, which is generally very fragile and easily denatured by different factors. PLGA particles with a less pronounced aggregation can be seen in the Figure 11.B. This batch of particles can be prepared by increasing ionic strength and buffer capacity of the solution Y, which is harmful for protein activity but might be useful, for instance, in the case of encapsulation of a lipophilic drug like many anti-cancer drugs. Indeed, PLGA particles with an average size of 250 nm prepared by this method may be suitable for a passive tumor targeting based on enhanced permeability and retention (EPR) effect. Although the optimal size for EPR effect has not been precisely determined yet, it can be found in the literature that the cutoff size of the pore in tumor vessels is between 400-600 nm suggested by a study using liposomes as carriers [37] or can be ranging from 200 nm to 2 µm based on a direct observation of tumor vasculature [38, 39]. However, it should be noted that the pore size is tumor-dependent and the permeability can vary during tumor progression as well as the anatomical location [38, 40].

*Underlying mechanism of the encapsulation process:

Since protein precipitates were prepared using precipitation process and were freshly mixed with polymer solution, we believe that protein precipitates were in solvated state and had a surrounding liquid surface of GF, which is the solvent of PLGA. Therefore, like in the case of classic simple coacervation method, the interfacial tensions between drug-phase and coacervate/continuous phases play the essential role in the final result [8]. Solvated protein precipitates, continuous phase (H_2O) and coacervate phase are denoted as L1, L2, and L3 respectively. A complete encapsulation occurs when the following conditions are satisfied:

$S_1 = \gamma_{L2/L3} - (\gamma_{L1/L2} + \gamma_{L1/L3}) < 0$

$S_2 = \gamma_{L1/L3} - (\gamma_{L1/L2} + \gamma_{L2/L3}) < 0$

$S_3 = \gamma_{L1/L2} - (\gamma_{L1/L3} + \gamma_{L2/L3}) > 0$

It can be seen that the lower $\gamma_{L1/L3}$'s value is, the lower S_2 is, the higher S_3 is, and thus the more L3 will spread over L1 and then the better the encapsulation yield will be. That is the reason why protein precipitates in solvated state have been used for the formulation. In this study, continuous phase is water in which proteins are literally soluble, but it can be envisaged to increase S_3 by using another continuous phase like ethanol, which is not a solvent of proteins, to make greater $\gamma_{L1/L2}$.

III.2. Formulation of lysozyme-loading particles using emulsification/extraction method in CO_2 medium:

***Protein precipitation using DMI:**

Activity yield corresponding to experimental points are listed in Table 1. Beside the fact that 100% of protein recovery could be obtained at different conditions of precipitation, the minimum value found at experimental points was 76.7%, which is very promising for the use of DMI to precipitate protein. It can be seen via the optimal pathway (Figure 7) the trend of activity yield according to the chosen variables. In fact, when activity yield changed from the minimum value to the maximum one, while other factors stayed almost at the same level, protein quantity changed its sign from positive to negative, which means protein quantity apparently played an important role in this process. Having mentioned that, it needs to be emphasized that yield maximization only occurred when ionic strength and aqueous volume were at a certain level. Therefore, it will be unsurprising if some interactions such as b_{13}, b_{23}, b_{123} are also found to be significant. The empirical model above-mentioned in section II.2.2 was fit to the data for predictive purpose. The model was validated by evaluating the residuals of the check points. Result from Table 2 shows that statistically there are no difference between the residuals and the pure experimental error, which permits the postulated model to be validated. Furthermore, an ANOVA test was performed. It is shown in Table 3 that the chosen model is significant and the overall lack-of-fit is not statistically greater than the pure experimental error. Therefore, the postulated model with its coefficients summarized in the Table 4 is suitable for the prediction of activity yield in the chosen ranges of parameters. As already said above, it can be found in this table that not only b_3 but also b_{13}, b_{23}, b_{123} were significant. To illustrate the equation used for prediction, the activity yield is mapped over the experimental domain at the cut of X_2= 90 µl in a contour plot and in a 3D surface plot (Figure 8). Our goal in this formulation part is to prepare protein precipitates whose activity yield is at least 95%. Hence, a desirability function was elaborated with the minimum value set at 95% and the target value set at 100% to help us in finding the region where our goal is satisfied. The result at the cut of X_2= 90 µl is shown in Figure 9. The following combination of X_1 = 0.3 M, X_2 = 90 µl, X_3 = 0.9 mg where activity yield was found to be about 95.6 ± 3.2% was chosen for the encapsulation process in CO_2 medium, which is the topic of the next paragraph.

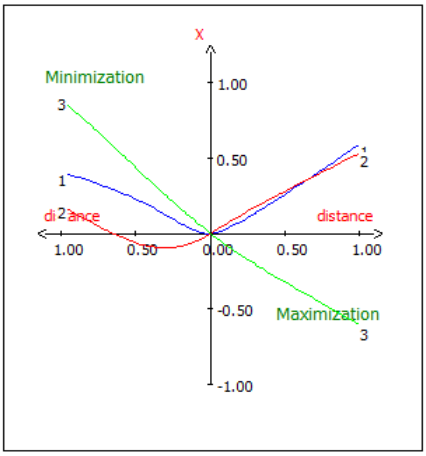


Figure 7 : optimal pathway of activity yield of lysozyme precipitates prepared using DMI.

Table 2 : validation of empirical model using check points.

Check points	obseved value	calculated value	Difference	df	p-value
19	87.50	94.40	-6.90	7	0.141
20	90.00	93.72	-3.72	7	0.400
21	102.50	98.17	4.33	7	0.331
22	94.50	90.67	3.83	7	0.387

Table 3 : ANOVA table showing the significance of the model and the lack-of-fit test.

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value
Model	915.961	10	91.596	5.3867	0.00512 **
Residual	187.045	11	17.004		
Lack-of-fit	105.056	6	17.509	1.0678	0.481
Pure error	81.988	5	16.397		
Total	1103.01	21			

Table 4 : estimation of coefficients in the chosen special cubic model used for prediction of activity yield in the preparation of lysozyme precipitates.

	Coefficient	F.Inflation	st. Deviation	t.exp.	p-value
b0	95.66		1.44	66.45	< 0.0001 ***
b1	-2.43	1.34	2.30	-1.06	0.3130
b2	5.72	1.00	1.98	2.88	0.0148 *
b3	-5.64	1.00	1.98	-2.84	0.0159 *
b1-1	-3.65	1.07	3.27	-1.12	0.2880
b2-2	-7.92	1.07	3.27	-2.42	0.0339 *
b3-3	-7.60	1.02	3.04	-2.50	0.0296 *
b1-2	11.33	1.12	4.73	2.39	0.0356 *
b1-3	-15.07	1.12	5.31	-2.84	0.0161 *
b2-3	-14.76	1.12	5.31	-2.78	0.0179 *
b1-2-3	54.82	1.34	20.17	2.72	0.0200 *

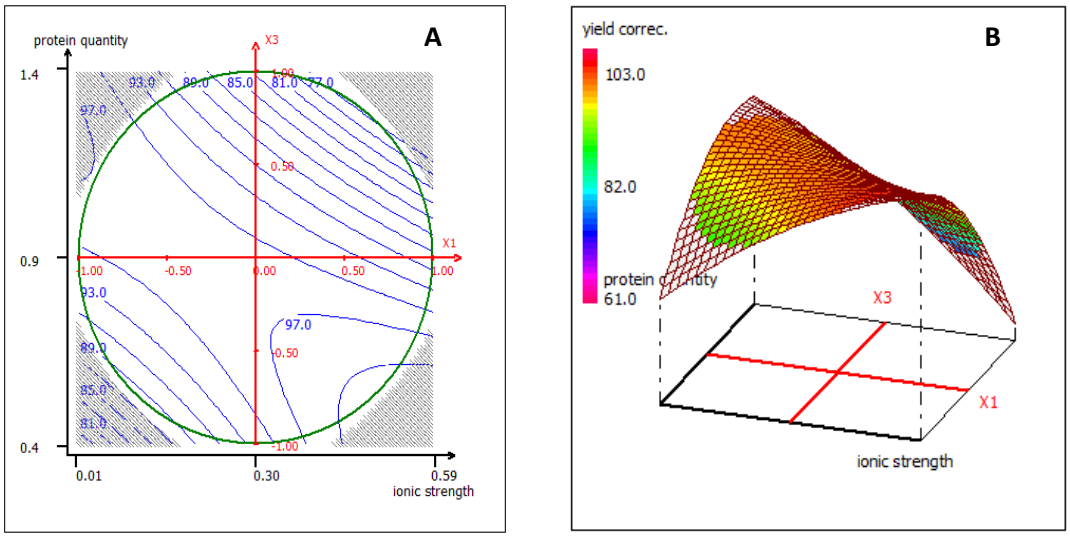


Figure 8 : activity yield of lysozyme precipitates presented in a contour plot (A) and in a 3D surface (B). Aqueous volume was fixed at 90 µl.

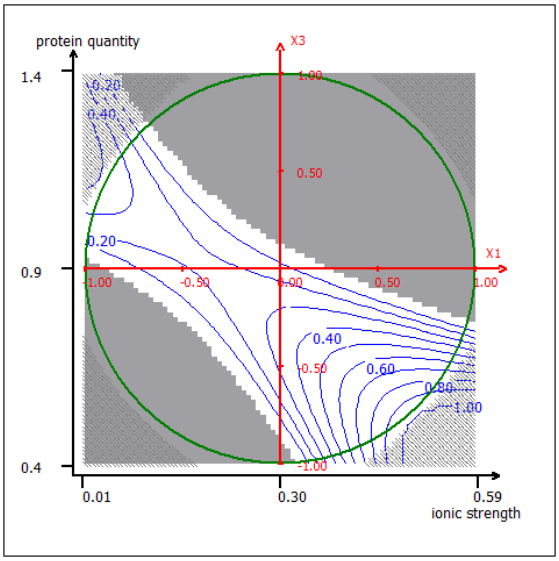


Figure 9 : contour plot of desirability function. Aqueous volume (X_2) was fixed at 90 µl.

***Preparation of lysozyme-loading particles:**

Results are listed in Table 5. It can be seen that encapsulation yield of the first 16 experiments varies from 57.8% to 88.9%. However, the firstly assumed quadratic model (p-value=0.0711) fails to explain the variation of the yield in the chosen experimental domain (Table 6.). Besides, in this table, one can also note that special cubic model (p-value=0.0021) and cubic model (p-value=0.0008) are found to well describe the variation of encapsulation yield and do not show a significant lack-of-fit. In this series of 11 distinct experiments, we were fully aware that cubic model used up 10 degree of freedom and thus the lack-of-fit test did not have much meaning. At this stage of experimental design, we did not have enough information to rule out any one of these two regression models. Therefore, 5 extra points (Table 5, experimental points from standard 17 to standard 21) were added into the design space to test the augmented models. These 5 points were found using exchange algorithm based on I-optimum criterion in the assumption that the phenomenon would be explained by a cubic model. By doing this, it was ensured that prediction variance in the design space in either case, special cubic or cubic, would have a good quality.

Table 5 : experimental points and the matching encapsulation yield. (This experimental design was used for the preparation of lysozyme-loading PLGA particles in CO_2 medium.)

Std	Run	DMI	GF	Ethanol	Yield (%)
1	4	0.544	0.456	0.000	74.4
2	13	1.000	0.000	0.000	60.0
3	7	1.000	0.000	0.000	57.8
4	16	0.843	0.157	0.000	88.9
5	5	0.421	0.500	0.079	65.6
6	14	0.667	0.238	0.095	76.7
7	10	0.667	0.238	0.095	68.9
8	12	0.667	0.238	0.095	73.0
9	3	0.527	0.341	0.131	68.9
10	15	0.819	0.000	0.181	78.9
11	9	0.819	0.000	0.181	77.8
12	1	0.309	0.500	0.191	67.0
13	8	0.309	0.500	0.191	65.4
14	11	0.679	0.087	0.234	85.6
15	2	0.545	0.205	0.250	75.6
16	6	0.405	0.345	0.250	77.5
17	18	0.667	0.333	0.000	75.5
18	21	0.917	0.000	0.083	66.7

19	20	0.750	0.125	0.125	68.9
20	19	0.563	0.250	0.188	76.7
21	17	0.750	0.000	0.250	90.9

Table 6 : ANOVA table of different models before the design was augmented.

Source	Sum of squares	df	mean square	F-value	p-value	Conclusion
ANOVA for Scheffé quadratic model						
Model	646.78	5	129.36	2.91	0.0711	not significant
Residual	445.23	10	44.52			
Lack of fit	410.48	5	82.10	11.81	0.0085	Significant
ANOVA for Scheffé special cubic model						
Model	937.40	6	156.23	9.09	0.0021	Significant
Residual	154.61	9	17.18			
Lack of fit	119.86	4	29.97	4.31	0.0704	not significant
ANOVA for Scheffé cubic model						
Model	1057	9	117.44	20.13	0.0008	Significant
Residual	35.01	6	5.83			
Lack of fit	0.25	1	0.25	0.036	0.8561	not significant
Pure error	34.75	5	6.95			
Cor total	1092	15				

After running the extra points, data were collected and analyzed. Firstly, analysis of sequential model sum of squares has been carried out. This analysis consists of testing the truth of a null hypothesis as follows: H_0: the response is invariant to the presence or absence of the group of terms that has been added to the model. Special cubic model versus quadratic model and cubic model versus special cubic model F-tests have been performed. While the p-value of the former test is 0.0071, which means the term ABC should be included in the regression model, the p-value of the latter one is 0.5084, much higher than 0.05, proving that the cubic model is not better than the special cubic one in describing the variation of encapsulation yield in the design space. Therefore, it seems reasonable for us to carry on further analysis with special cubic form as the choice of the regression model.

Partial sum of squares of the model are summarized in an ANOVA table (Table 7). It can be noted that the regression model is significant and there is no significant lack of fit, which means the special cubic model cannot be rejected in the sense of prediction of the response in the chosen experimental domain. In Figure 10.B, the response is mapped over the design space in a contour plot and it can be found correspondingly in the Figure 10.A the matching standard error of the response expressed in the unit of pure experimental error. The most interesting zone seems to be the orange one in which predicted encapsulation yield can be found from about 85% to 90%. In this zone, ethanol is found to be close to its upper constraint, which is 100 µl.

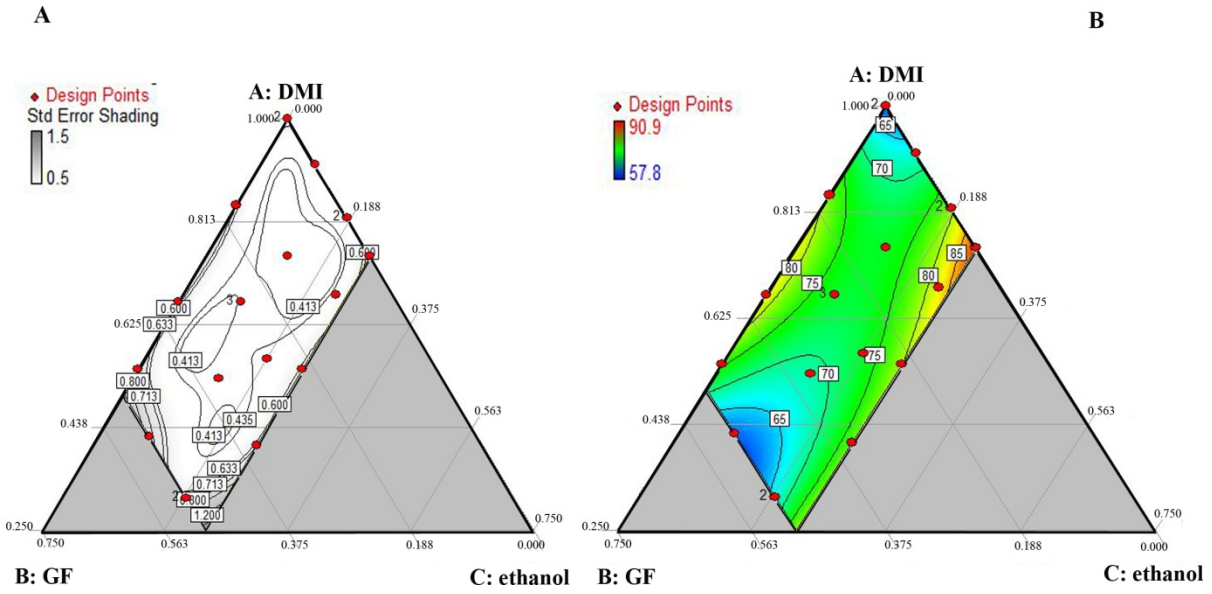


Figure 10 : predicted activity yield and prediction standard error maps. (A) Contour plot of prediction standard error of special cubic model; (B) contour plot of predicted activity yield.

Table 7 : ANOVA table showing the significance of special cubic model and the lack-of-fit test.

Source	Sum of squares	df	Mean square	F- value	p-value	
Model	1203.43	6	200.57	9.86	0.0002	Significant
Linear mixture	283.90	2	141.95	6.98	0.0079	
AB	330.71	1	330.71	16.25	0.0012	
AC	31.23	1	31.23	1.53	0.2358	
BC	4.16	1	4.16	0.20	0.6581	
ABC	202.08	1	202.08	9.93	0.0071	
Residual	284.85	14	20.35			
Lack-of-fit	250.10	9	27.79	4.00	0.0706	not significant
Pure error	34.75	5	6.95			
Corrected total	1488.29	20				

Image of PLGA particles observed under scanning electron microscopy (SEM) is shown in Figure 11.C. The particles look spherical and well separated one from the others, which implies that solvents have been successfully extracted. Another indication of it is that the glass transition temperature is about 34°C, 6.5° higher than the one obtained from sample prepared by phase separation method (Table 8). About particle size, it can be noted that average size is smaller in the case of particles prepared by phase separation method than those prepared by emulsification/extraction in CO_2. Moreover, distribution's standard deviation in the case emulsification/extraction is much higher, which is no doubt for us typical of the presence of an emulsification step in the process. Hereby, we present a proof of concept of our process based on an emulsification/extraction method, which theoretically permits particle size to be tuned to suit

different applications by modifying the shear stress in emulsification step. Some properties of PLGA particles formulated by the two methods are summarized in Table 8.

Besides, in comparison to the phase separation method, working with solvent mixtures in CO_2 medium gives us more flexibility in the sense of modifying polymer composition or machine configuration to adapt our purpose. For instance, PLGA can be mixed with poly ε-caplactone, which is not soluble in GF and thus cannot be used in phase separation method , to seek a more sustained, or at least a modified release behavior compared to the one produced by pure PLGA [41]. SEM image of particles prepared from a blend of PLGA and poly ε-caprolactone, is shown in Figure 11.D.

Table 8 : some characteristics of PLGA particles prepared by phase separation and emulsification/extraction.

Method	Size (nm)		Glass transition temperature (Tg °C)
	Mean	Distribution's standard deviation	
Phase separation	249	51	27.5
Emulsification/ extraction*	2800	2650	33.9

*: analysis was performed with particles prepared under condition of Std 14 (Table 5)

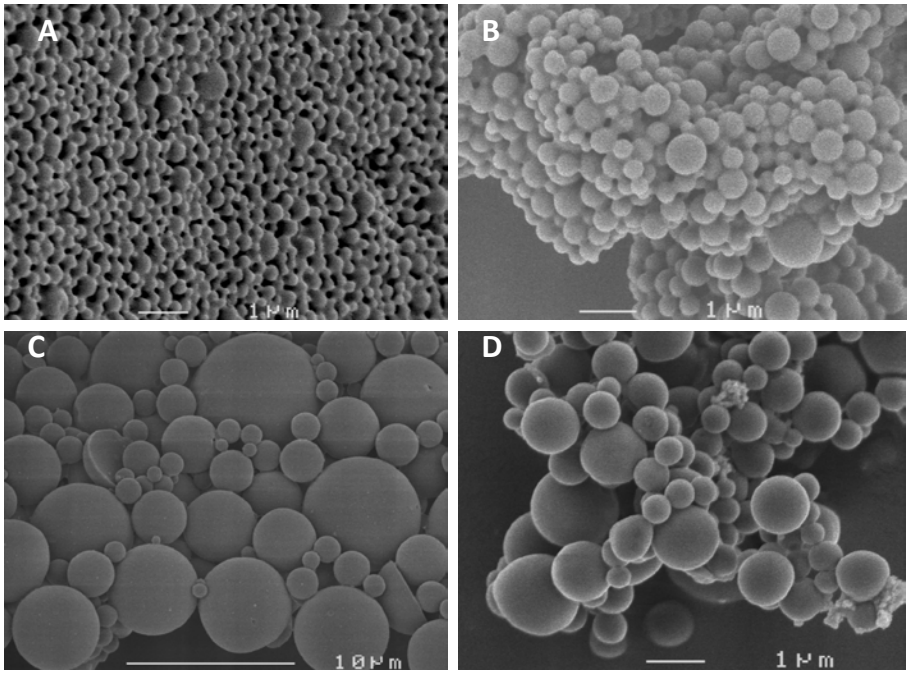


Figure 11 : PLGA particles observed under electron microscopy. (A,B) particles prepared using phase separation method. In (B), glycine-NaCl buffer 0.625M pH 10 was used as the solution Y; (C,D) particles prepared using emulsification/extraction in CO_2 medium. In (D), poly (ε-caprolacton) was mixed with PLGA at a ratio of 1/9 (w/w).

IV. CONCLUSION:

In this paper, we have presented two methods using non-toxic solvents for the preparation of PLGA particles. These methods were used for protein encapsulation purpose but could also be adapted to the encapsulation of other drugs. Each method has its own advantages and also comes with certain disadvantages. Phase separation proves itself as a simple way to generate PLGA particles; however, further effort will be required to fully understand how to modify and to control particle size. Emulsification/extraction in CO_2 offers more options to change the properties of PLGA particles in terms of particle size or polymer composition; however, the indispensable use of a specific machine and CO_2 may be the weak point in this method compared to the phase separation one. Based on the results obtained from this study, it seems reasonable to pursue further steps in the development of these drug carrier systems. Influence of operating parameters on particle size, process robustness, *in-vitro* release, and *in-vivo* release will be carried out. Besides, working with other types of biodegradable polymers like pegylated-PLGA is also envisaged.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the financial support of ANR (France—Project ANR-09-PIRI-0004-01), Regional research program (Pays de Loire, France—Bioregos program) and the French education minister. We would like to thank the SCIAM ("Service Commun d'Imagerie et d'Analyse Microscopique") of Angers for scanning electron microscopy images.

REFERENCES

[1] J.S. Kent (Cupertino, CA), D.H. Lewis (Birmingham, AL), L.M. Sanders (Palo Alto, CA), T.R. Tice (Birmingham, AL), Microencapsulation of water soluble active polypeptides, in, Syntex (U.S.A.) Inc. (Palo Alto, CA), U.S. patent 4,675,189 (1987).

[2] F.G. Hutchinson, B.J.A. Furr, Biodegradable carriers for the sustained release of polypeptides, Trends Biotechnol., 5 (1987) 102-106.

[3] V.-T. Tran, J.-P. Karam, X. Garric, J. Coudane, J.-P. Benoît, C.N. Montero-Menei, M.-C. Venier-Julienne, Protein-loaded PLGA–PEG–PLGA microspheres: A tool for cell therapy, Eur. J. Pharm. Sci., 45 (2012) 128-137.

[4] K. Andreas, R. Zehbe, M. Kazubek, K. Grzeschik, N. Sternberg, H. Bäumler, H. Schubert, M. Sittinger, J. Ringe, Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: Investigation for cartilage tissue engineering, Acta Biomater., 7 (2011) 1485-1495.

[5] G.S. Kwon, Improving the Stability of PLGA-encapsulated proteins., in: Polymeric drug delivery systems, Taylor & Francis, 2005, pp. 381-416.

[6] A. Aubert-Pouëssel, M.-C. Venier-Julienne, A. Clavreul, M. Sergent, C. Jollivet, C.N. Montero-Menei, E. Garcion, D.C. Bibby, P. Menei, J.-P. Benoit, In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres, J. Control. Release, 95 (2004) 463-475.

[7] T. Morita, Y. Sakamura, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant, J. Control. Release, 69 (2000) 435-444.

[8] C. Thomasin, H.P. Merkle, B.A. Gander, Physico-chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation, Int. J. Pharm., 147 (1997) 173-186.

[9] J. Kluge, F. Fusaro, N. Casas, M. Mazzotti, G. Muhrer, Production of PLGA micro- and nanocomposites by supercritical fluid extraction of emulsions: I. Encapsulation of lysozyme, J. Supercrit. Fluids, 50 (2009) 327-335.

[10] B. Gander, P. Johansen, H. Nam-Trân, H.P. Merkle, Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly(D,L-lactide) by spray drying, Int. J. Pharm., 129 (1996) 51-61.

[11] S.P. Schwendeman, M. Tobío, M. Joworowicz, M.j. Alonso, R. Langer, New strategies for the microencapsulation of tetanus vaccine, J. Microencapsulation, 15 (1998) 299-318.

[12] K.G. Carrasquillo, A.M. Stanley, J.C. Aponte-Carro, P. De Jésus, H.R. Costantino, C.J. Bosques, K. Griebenow, Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein, J. Control. Release, 76 (2001) 199-208.

[13] P. Kinam, Y. Yoon, Microencapsulation of Protein Drugs, in: Tissue Engineering And Novel Delivery Systems, CRC Press, 2003, pp. 315.

[14] C. Thomasin, H. Nam-Trân, H.P. Merkle, B. Gander, Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 1. Overview and theoretical considerations, J. Pharm. Sci., 87 (1998) 259-268.

[15] M.J. Whitaker, J. Hao, O.R. Davies, G. Serhatkulu, S. Stolnik-Trenkic, S.M. Howdle, K.M. Shakesheff, The production of protein-loaded microparticles by supercritical fluid enhanced mixing and spraying, J. Control. Release, 101 (2005) 85-92.

[16] A. Hatefi, B. Amsden, Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems, J. Control. Release, 80 (2002) 9-28.

[17] H.B. Ravivarapu, K.L. Moyer, R.L. Dunn, Sustained suppression of pituitary-gonadal axis with an injectable, in situ forming implant of leuprolide acetate, J. Pharm. Sci., 89 (2000) 732-741.

[18] U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues, AAPS PharmSciTech, 6 (2005) E594-E604.

[19] R.O. Beauchamp Jr. (Richmond, VA), J.W. Ward (Richmond, VA), B.V. Franko (Richmond, VA), Dimethylisosorbide solvent for muscle relaxant drugs, in, A. H. Robins Company Incorporated (Richmond, VA), U.S. patent 3,699,230 (1972).

[20] A.R. Bell (Woollahra, AU), F. Cochrane (Frencs Forest, AU), G.N. O'connor (Loftus, AU), J.S. Rowe (Kogarah, AU), Formulations for anaesthetic use, in, Parnell Laboratories (Aust) Pty Limited (New South Wales, AU), U.S. patent 7,326,735 (2008).

[21] J.L. Chen (East Brunswick, NJ), J.M. Battaglia (North Brunswick, NJ), Topical and other type pharmaceutical formulations containing isosorbide carrier, in, E. R. Squibb & Sons, Inc. (Princeton, NJ), U.S. patent 4,082,881 (1978).

[22] M. Durr (Pulheim/Dansweiler, DE), H.U. Fribolin (Neuss, DE), E. Harhausen (Sarkwitz, DE), J. Seidel (Pulheim, DE), Use of glycofurol for the liquidization of pharmaceutical preparations to be filled into soft gelatine capsules, in, A. Nattermann & CIE GmbH (Cologne, DE), U.S. patent 4,842,865 (1989).

[23] L.A. Luzzi (Morgantown, WV), J.K.H. Ma (Morgantown, WV), Dimethyl isosorbide in liquid formulation of aspirin, in, Research Corporation (New York, NY), U.S. patent 4,228,162 (1980).

[24] L.A. Mottu F, Rufenacht DA, Doelker E, Organic solvents for pharmaceutical parenterals and embolic liquids: a review of toxicity data, PDA J. Pharm. Sci. Technol., 54 (2000 Nov-Dec) 456-469.

[25] S.M. Mottu F, Rüfenacht DA, Doelker E, Comparative hemolytic activity of undiluted organic water-miscible solvents for intravenous and intra-arterial injection, PDA J. Pharm. Sci. Technol., 55 (2001) 16-23.

[26] F. Mottu, P. Gailloud, D. Massuelle, D.A. Rüfenacht, E. Doelker, In vitro assessment of new embolic liquids prepared from preformed polymers and water-miscible solvents for aneurysm treatment, Biomaterials, 21 (2000) 803-811.

[27] M.F. Laurent A, Chapot R, Zhang JQ, Jordan O, Rüfenacht DA, Doelker E, Merland JJ, Cardiovascular effects of selected water-miscible solvents for pharmaceutical injections and embolization materials: a comparative hemodynamic study using a sheep model, PDA J. Pharm. Sci. Technol., 61 (2007 Mar-Apr) 64-74.

[28] A. Giteau, M.-C. Venier-Julienne, S. Marchal, J.-L. Courthaudon, M. Sergent, C. Montero-Menei, J.-M. Verdier, J.-P. Benoit, Reversible protein precipitation to ensure stability during encapsulation within PLGA microspheres, Eur. J. Pharm. Biopharm., 70 (2008) 127-136.

[29] M.J. Anderson, P.J. Whitcomb, Getting the most from minimal-run designs., in: DOE Simplified: Practical Tools for Effective Experimentation, Taylor and Francis, 2007, pp. 115-132.

[30] NIST/SEMATECH, Mirror-image foldover design, in: e-Handbook of Statistical Methods, 2010. http://itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3381.htm

[31] G.A. Lewis, D. Mathieu, and Roger Tan Luu Phan, Response Surface Methodology, in: Pharmaceutical experimental design, Marcel Dekker, New York, 1998, pp. 218-230.

[32] F. Boury (Angers, FR), J.P. Benoit (Angers, FR), O. Thomas (Angers, FR), F. Tewes (Poitiers, FR), Method for preparing particles from an emulsion in supercritical or liquid co2, in, Patent WO2007072106 (2005).

[33] J.A. Cornell, The Canonical Polynomials, in: Experiments with Mixtures: Design, Models, and the Analysis of Mixture Data, John Wiley & Sons, Inc., 2002, pp. 25-30.

[34] W. F.Smith, Designs for Non-Simplex-Shaped Region, in: Experimental Design for Formulation,

Society for Industrial and Applied Mathematics, 2005, pp. 61-93.

[35] A. Atkinson, A. Donev, R. Tobias, Criteria of optimality, in:Optimum Experimental Designs, with SAS (Oxford Statistical Science Series), Oxford University Press, USA, 2007,pp.135-150.

[36] L.A. Belfiore, Effect of Particle size or Film Thickness on the Glass Transition Tempearture, in: Physical Properties of Macromolecules, John Wiley & Sons, 2010, pp. 31-34.

[37] F. Yuan, M. Dellian, D.Fukumura, M. Leuing, D. A.Berk, V.P. Torchillin, R. K.Jain, Vascular permeability in a human tumor xenograft : molecular size dependence and cutoff size, AACR, Philadelphia, United States, 1995.

[38] H. Hashizume, P. Baluk, S. Morikawa, J.W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R.K. Jain, D.M. McDonald, Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness, Am. J. Pathol., 156 (2000) 1363-1380.

[39] S.K. Hobbs, W.L. Monsky, F. Yuan, W.G. Roberts, L. Griffith, V.P. Torchilin, R.K. Jain, Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95 (1998) 4607-4612.

[40] J.H. Park, S. Lee, J.-H. Kim, K. Park, K. Kim, I.C. Kwon, Polymeric nanomedicine for cancer therapy, Prog. Polym. Sci., 33 (2008) 113-137.

[41] R.C. Mundargi, S. Srirangarajan, S.A. Agnihotri, S.A. Patil, S. Ravindra, S.B. Setty, T.M. Aminabhavi, Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(ε-caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: In vitro and in vivo studies, J. Control. Release, 119 (2007) 59-68.

IV.3 CHAPITRE 3: Préparation de particules de PLGA en milieu CO_2 pressurisé en vue de l'encapsulation des protéines: discussions du mécanisme de formation de particules.

Dans le deuxième chapitre expérimental, nous avons présenté un procédé de formulation des particules de PLGA basé sur la méthode d'émulsification/extraction en utilisant l'isosorbide dimethyl ether (DMI) comme solvant du PLGA (Figure 10, chapitre 2, zone orange). Afin de préciser le mécanisme de formation des particules de PLGA générées par cette méthode, il nous est apparu nécessaire de mieux comprendre les solubilités partielles entre le CO_2 et le DMI en présence ou non de polymère. Nous présentons dans cette partie expérimentale les mesures de solubilité du CO_2 dans le DMI et dans la solution de polymère à l'aide d'approches classiques validées pour d'autres systèmes, ainsi que des mesures de l'expansion volumique du solvant DMI et de la solution de polymère en milieu CO_2 pressurisé. Ces résultats nous apportent des éléments nouveaux permettant de mieux comprendre le mécanisme de formation des particules de PLGA.

La solubilité du CO_2 dans le DMI a été ensuite modélisée par deux approches en utilisant : (1) une équation d'état avec une règle de mélange ; (2) un modèle mathématique construit à partir d'un réseau de neurones. Ce travail de modélisation nous permet de prédire avec confiance la solubilité du CO_2 dans le DMI dans la zone expérimentale.

La corrélation entre la taille des particules et la vitesse d'agitation sera montrée pour mettre en évidence le mécanisme de formation des particules qui est basé essentiellement sur une étape d'émulsification. D'autre part, des études d'encapsulation, de libération *in-vitro*, et de visualisation par la microscopie confocale seront aussi présentées dans ce chapitre afin de montrer la faisabilité du procédé en vue de l'encapsulation d'une protéine.

Nos résultats correspondant à ce procédé nommé « Modified-PGSS » (Modified-Particle from Gas Saturated Solution) sont présentés dans ce chapitres sous forme de l'article « Preparation of polymeric particles in CO_2 medium using non-toxic solvents: Discussions on the mechanism of particle formation." soumis pour publication dans "European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics".

PREPARATION OF POLYMERIC PARTICLES IN CO_2 MEDIA USING NON-TOXIC SOLVENTS: DISCUSSIONS ON THE MECHANISM OF PARTICLE FORMATION

My-Kien Tran[a,b], Brice Calvignac[a,b], Kim-Ngan Dang[a,b], Leila Hassani[a,b], Frank Boury[a,b].

[a]LUNAM Université, Angers, France.

[b]INSERM U1066, Micro et Nanomedécines Biomimétiques, IBS, 4 rue Larrey, F-49933 Angers cedex 9, France.

Corresponding author: Frank.BOURY (e-mail: frank.boury@univ-angers.fr; Tel: 33 2 44 68 85 28; Fax: +33 2 44 68 85 46)

Abstract

In this paper, a new formulation method for the preparation of polymeric particles in CO_2 media, named modified-PGSS (modified-Particle from Gas Saturated Solution), will be presented. Low-toxic water-miscible solvent-DMI (isosorbide dimethyl ether) was used for the formulation. The mechanism of particle formation will be discussed in detail. The solubility of CO_2 in DMI and the volumetric expansion of DMI in CO_2 media were measured. A mathematical model was built to predict the solubility of CO_2 in DMI in the chosen experimental space. Also, the solubility of CO_2 was correlated with an equation of state. Moreover, model proteins were encapsulated in these particles to show a proof-of-concept of our encapsulation method. *In-vitro* release profiles will also be presented.

Keywords: DMI (isosorbide dimethyl ether), modified-PGSS, protein encapsulation, PLGA (poly-lactic-glycolic acid), sustained release.

I. INTRODUCTION

Protein encapsulation in a sustained release system has been proven to be useful for patient comfort and therapeutic efficiency with the presence of many commercial products on the market such as Lupron® Depot, Nutropin® Depot, Zoladex®, Trelstar® LA, Somatuline®LA, Sandostatin LAR® Depot, Decapeptyl®, Parlodel® Depot, Enantone® Depot, Posilac®, Eligard®,… mostly in the form of biodegradable microparticles [1-3]. For the formulation of microparticles, PLGA (poly-lactic-glycolic-acid) polymer has often been chosen as the shell material due to its biocompatibility and biodegradability. The first patent for protein encapsulation in PLGA microparticles, in 1987, reported the encapsulation of leutinizing hormone-releasing hormone (LHRH) using a phase separation method [4]. Since then, different encapsulation methods have been developed and used for protein encapsulation. Among these methods, water/oil/water (w/o/w) [5], solid/oil/water (s/o/w) [6], simple coacervation [7], and spray-drying [8] can be cited as the essential ones. However, the common point of the above-mentioned methods is the use of toxic volatile solvents, which is harmful for the environment, patient health, and the operators. Recently, the use of low-toxic, high-boiling-point solvents such as dimethyl sulfoxide (DMSO)[9], glycofurol (GF)[10, 11], isosorbide dimethyl ether (DMI) [12] have emerged as an alternative way to classic solvents for the formulation of PLGA particles. To the best of our knowledge, DMI appears to be the safest solvent at the time being, based on different toxicity criteria (Table 1). In a previous paper, a new procedure for the formulation of PLGA particles in CO_2 media using DMI as the polymer solvent has been introduced and compared with a phase separation method [12]. In this paper, the main focus will be the discussions on the mechanism of particle formation. Solubility measurements show that CO_2 is very soluble in DMI, which allows the properties of a DMI-CO_2 mixture to be appropriately tuned to be able to form an emulsion with an aqueous phase in CO_2 media. Moreover, dependence between the stirring rate and particle size will be shown to prove the existence of an emulsification step in our formulation method. Model proteins were encapsulated into PLGA particles to show a proof-of-concept of our encapsulation method. The *in-vitro* release of a model protein from PLGA particles will also be presented.

Table 1: toxicity review of different water-miscible solvents.

Solvent	LD50 (mL/kg)[13]	Hemolytic activity[14]	Cardiovascular toxicity[15]	Angiotoxicity (duration of vasospasm)[16]
DMSO	6.9 (iv/m.) 12.6 (ip/m.) 15 (po/m.)	Very high	Moderate	19.1
NMP	4.4 (ip/m.)	Moderate	High	5.0*
GF	3.5 (iv/m.)	Moderate	Insignificant	10.5
DMI	8.54 (iv/r.)	Low	Insignificant	5.9*
PEG200	7.6 (iv/m.) 12.9 (ip/m.) 26 (po/m.)	High	Insignificant	-

II. MATERIALS & METHOD

II.1. Materials

Lysozyme (chicken egg-white), FITC-insulin, *Micrococcus lysodeikticus*, isosorbide dimethyl ether (1,4:3,6-Dianhydro-2,5-di-O-methyl-D-glucitol) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier,France). Uncapped 75/25 PLGA was provided by Phusis (Saint-Ismier, France) with a mean molecular weight of 21,000 Da (polydispersity index I=1.8) as determined by size-exclusion chromatography (standard: polystyrene). Lutrol F127 was purchased from BASF (Laserson, France). CO_2 (purity of 99.995%) was obtained from Air Liquid (Paris, France). A micro-BCA protein assay reagent kit was purchased from Pierce (Bezons, France).

II.2. Methods

II.2.1. Solubility of CO_2 in DMI:

II.2.1.1. Measurement of the solubility of CO_2 in DMI:

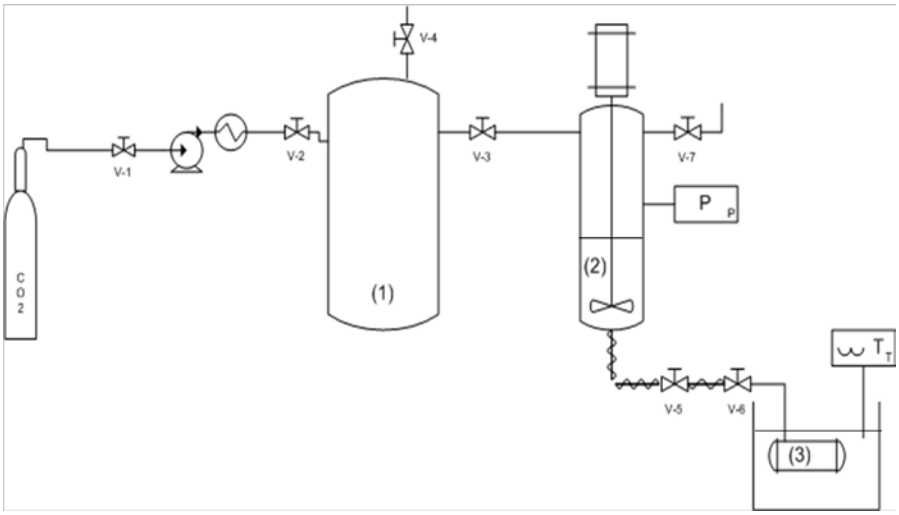


Figure 1: Schematic diagram of the experimental setup for solubility measurements.

In this work, solubility measurements were carried out using a gravimetric method. The general principle of this method consists of taking a sample of the DMI-CO_2 mixture without disturbing its thermodynamic equilibrium. An experimental device (Figure 1) was designed in order to achieve this objective. This type of device had been previously conceived and used for the measurement of the solubility of CO_2 in DMSO and in cocoa butter[13, 14]. Briefly, the measurement procedure was composed of the following steps:

-The first step consisted of obtaining an equilibrium state of the DMI-CO_2 mixture in a thermostated cell (2) (V=94 mL) provided with a mechanical stirrer.

-Once pressure and temperature were stable, valves V-5 and V-6 were opened to allow a sample of the mixture in liquid phase to flow to a thermostated sampling cell (3) (V≈5mL) which was removed afterwards for weighing. Note that the cell (2) was connected with a storage buffer cell (1) (V=200 mL) which was used for the compensation of the pressure drop when sampling. Besides, all of the pipes in the sampling loop were thermally controlled at the same temperature of the cells (1) and (2).

-The last step consisted in finding the mass of CO_2 in the mixture. In order to achieve this, a series of weighing operations, before and after CO_2 degassing, were carried out. The mass percentage of CO_2 in the mixture was calculated as follows:

$$X_{CO2}(\%) = \frac{m_{DMI-CO2} - m_{DMI}}{m_{DMI-CO2}} \times 100 \quad \text{(eq 1)}$$

where m_{DMI} is the mass of DMI in the mixture and $m_{DMI-CO2}$ is the mass of the mixture sample.

II.2.1.2. Modeling of the solubility of CO_2 in DMI using a neural network:

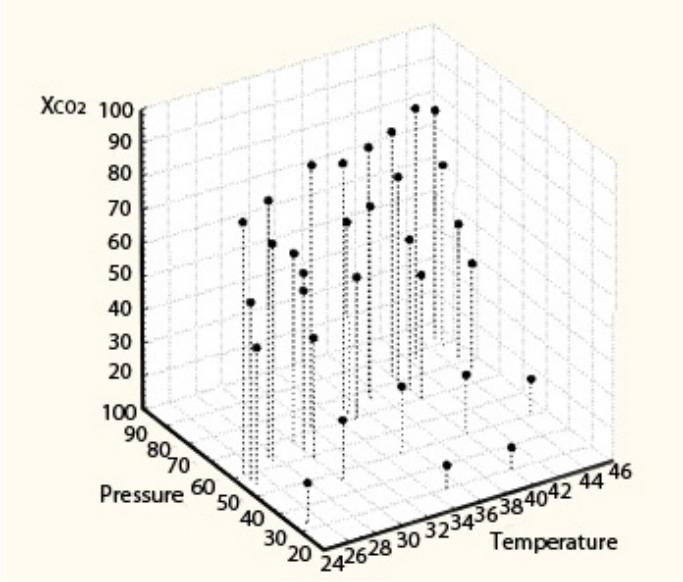


Figure 2: experimental solubility of CO_2 in DMI in the experimental space.

Measures of the solubility of CO_2 in DMI were carried out under different conditions of pressure and temperature (Figure 2). Experimental points were chosen to be well distributed in the experimental domain of pressure and temperature, which makes the data suitable for further predictive modeling. In this paper, the neural network technique was chosen for this purpose. Different topologies such as multi-layer perceptron (MLP), radial basis function (RBF), and generalized feed forward (GFF) were tested, using the same data set which had been randomized and partitioned into training, cross-validation and, testing subsets in the same fashion. It appeared to us that MLP yielded the best performance. Hence, the MLP topology was chosen for further refinement. The leave-N-out approach (in this paper, N=1) was used to enhance the predictive quality by maximizing the use of data for training. In fact, the leave-N-out approach trains the network multiple times, each time omitting a different subset of data and using this subset for cross-validation, which is a good measure to show how well the model generalizes[15]. Besides, about 15% of the data was set aside to test the predictive quality of the obtained model and, more importantly, to allow us to set an appropriate number of epochs to avoid over-training the

network. Concerning the architecture of MLP topology, it was started with a low level of complexity with one hidden layer of three processing elements. The Levenberg-Marquardt method was chosen as the learning rule. Readers are referred elsewhere[16] for details of the algorithm and the calculation procedure. In this work, Neurosolution version 6 (Neurodimension, US) was used to create and train the neural networks. The performance of the chosen mathematical model is calculated as follows:

$$\mathrm{AAD} = \frac{1}{\mathrm{N}}\sum_{\mathrm{i=1}}^{\mathrm{N}}\left|\mathrm{X_{cal}} - \mathrm{X_{exp}}\right| \qquad \text{(eq 2)}$$

$$\mathrm{AAD(\%)} = \frac{1}{\mathrm{N}}\sum_{\mathrm{i=1}}^{\mathrm{N}}\frac{\left|\mathrm{X_{cal}} - \mathrm{X_{exp}}\right|}{\mathrm{X_{exp}}} \times 100 \qquad \text{(eq 3)}$$

where AAD is the average absolute deviation; X_{cal}, X_{exp} are respectively the calculated solubility and the experimental solubility.

II.2.1.3. Data correlation using an equation of state:

In this part, experimental data on the solubility of CO_2 in DMI were correlated in an $\phi - \phi$ approach using the Peng-Robinson equation of state (PR-EoS) with the standard alpha function. The equation for the Peng-Robinson model is as follows:

$$\mathrm{P} = \frac{\mathrm{RT}}{\mathrm{V_m} - \mathrm{b}} - \frac{\mathrm{a}}{\mathrm{V_m(V_m + b) + b(V_m - b)}} \qquad \text{(eq 4)}$$

The conventional mixing rule with an additional asymmetric term a_1 [17, 18] was used to calculate the attractive and repulsive terms of the mixture as shown below:

$$\mathrm{b} = \sum_{\mathrm{i}} \mathrm{z_i b_i} \qquad \text{(eq 5)}$$

$$\mathrm{a} = \mathrm{a_0} + \mathrm{a_1} \qquad \text{(eq 6)}$$

$$\mathrm{a_0} = \sum_{\mathrm{i}}\sum_{\mathrm{j}} \mathrm{z_i z_j}\left(\mathrm{a_i a_j}\right)^{0.5}\left(1 - \mathrm{k_{ij}}\right) \qquad \text{(eq 7)}$$

$$\mathrm{k_{ij}} = \mathrm{k_{ij}^{(1)}} + \mathrm{k_{ij}^{(2)}T} + \frac{\mathrm{k_{ij}^{(3)}}}{\mathrm{T}} \qquad \text{(eq 8)}$$

$$\mathrm{a_1} = \sum_{\mathrm{i=1}}^{\mathrm{n}} \mathrm{z_i}\left(\sum_{\mathrm{j=1}}^{\mathrm{n}} \mathrm{z_j}(\mathrm{a_i a_j})^{1/6}\mathrm{l_{ij}^{1/3}}\right)^3 \qquad \text{(eq 9)}$$

$$l_{ij} = l_{ij}^{(1)} + l_{ij}^{(2)}T + \frac{l_{ij}^{(3)}}{T} \quad \text{(eq 10)}$$

$$a_i = \alpha_i 0.45724 \frac{R^2 T_{c_i}^2}{P_{C_i}} \quad \text{(eq 11)}$$

$$b_i = 0.07780 \frac{RT_{C_I}}{P_{C_i}} \quad \text{(eq 12)}$$

$$\alpha_i = \left[1 + m_i(1 - T_{r_i}^{0.5})\right]^2 \quad \text{(eq 13)}$$

$$m_i = 0.37464 + 1.54226\omega_i - 0.26992\omega_i^2 \quad \text{(eq 14)}$$

where z_i, a_i, b_i, T_{ci}, P_{ci}, ω_i, T_{ri} are respectively the mole fraction, attractive term, repulsive term, critical temperature, critical pressure, acentric factor and reduced temperature of the component *i* while k_{ij} and l_{ij} are the binary interaction parameters. The critical properties and acentric factor of the components were estimated using Joback's method [19]; their values are listed in Table 2.

Table 2: critical properties of the components estimated by the Joback's method.

	Critical temperature- T_c (°K)	Critical pressure-P_c (bar)	Acentric factor (ω)
DMI	721.35	31.07	0.535
CO_2	304.18	73.80	0.224

For every component *i* in the mixture, the condition of thermodynamic equilibrium is given by:

$$f_i^V = y_i \phi_i^V P = x_i \phi_i^L P = f_i^L \quad \text{(eq 15)}$$

where f_i^V, y_i, ϕ_i^V and f_i^L, x_i, ϕ_i^L are the fugacity, mole fraction, fugacity coefficient of the component *i* in vapor and liquid phase. Readers are referred elsewhere [20, 21] to find the form of $\ln\phi_i^V$ and $\ln\phi_i^L$ obtained from PR-EoS. The binary parameters were found by minimizing the Barker objective function for T-P-x data [22]:

$$\psi = \sum_{j}^{ndata} (P_j - P_j^{calc})^2 \quad \text{(eq 16)}$$

where ndata is the total number of experimental points and P_j and P_j^{calc} are experimental and calculated pressures. Readers may refer to [22] for more details on the mathematics of the regression technique. In this paper, Aspen Plus (Aspen Technology, US) was used to perform the regression task and the estimation of physical properties. The performance of the model is calculated as follows:

$$AAD(\%) = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\frac{\left|P_{cal} - P_{exp}\right|}{P_{exp}} \times 100 \qquad \text{(eq 17)}$$

where AAD is the average absolute deviation; P_{cal}, P_{exp} are respectively the estimated pressure and the experimental pressure.

II.2.2. Volumetric expansion measurement of DMI in CO_2 media:

The principle of the measurements consists of measuring the volume change of DMI when put in contact with CO_2. Measurements were carried out in a thermostated variable volume cell provided with sapphire windows, which made it possible to visually follow the volume change of DMI according to CO_2 pressure. The volumetric expansion was calculated as shown:

$$E\% = \frac{(V_{DMI-CO2} - V_{DMI}^0) \times 100}{V_{DMI}^0} \qquad \text{(eq 18)}$$

where V_{DMI}^0 and $V_{DMI-CO2}$ are respectively the initial volume of DMI and the volume of DMI-CO_2 mixture in liquid phase. In order to measure the volume increment, we created previously, under pressure (50 bar, 25 °C), a standard profile of the water level in the cell according to the volume injected (Figure 3), which allowed us afterwards to determine the unknown liquid volume from its level observed through the sapphire windows. The water level was determined by using image analysis software (ImageJ, NIH). The procedure of volumetric expansion measurement was as follows: firstly, a precise initial volume of DMI was introduced into the cell; CO_2 was then delivered to the cell by means of a membrane pump; the mixture was subjected to mechanical stirring until pressure and temperature were constant; finally, an image of the liquid level in the cell was taken for image analysis and volume calculation. The volume inside the cell was known and could be modified at any time, if necessary, to allow the liquid level to be observed via the sapphire window. Volume displacement was taken into account for the calculation of volumetric expansion. The maximal error of level measurement was 4 pixels. The maximal error of volumetric expansion determination was about 3%.

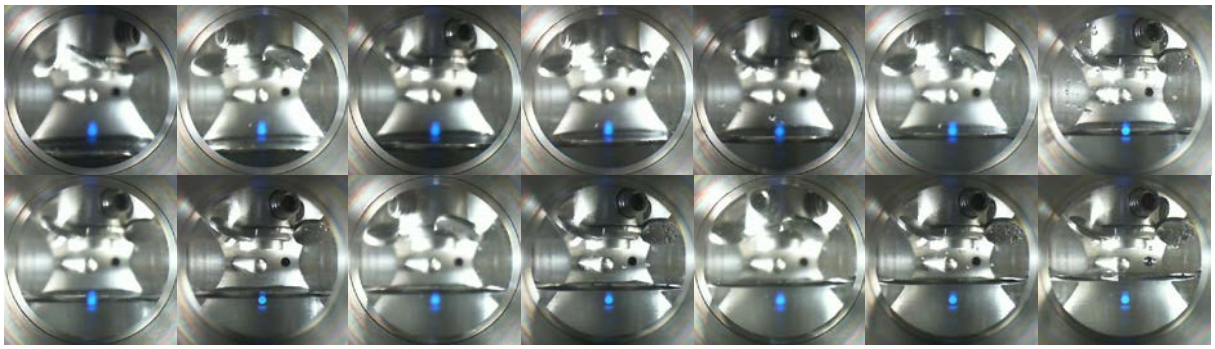


Figure 3: standard profile of the water level according to its volume injected to the cell

II.2.3. Preparation of PLGA particles and protein-loading particles:

II.2.3.1. Preparation of protein precipitates:

Protein precipitation had been previously optimized using experimental design [12]. Briefly, lysozyme was dissolved in 0.3M NaCl solution at the concentration of 10 mg/mL. 90 µl of this solution was then mixed with 910 µl DMI, which played a role of anti-solvent, to obtain a suspension of precipitated protein for further use.

II.2.3.2. Formulation of PLGA particles in CO_2 media:

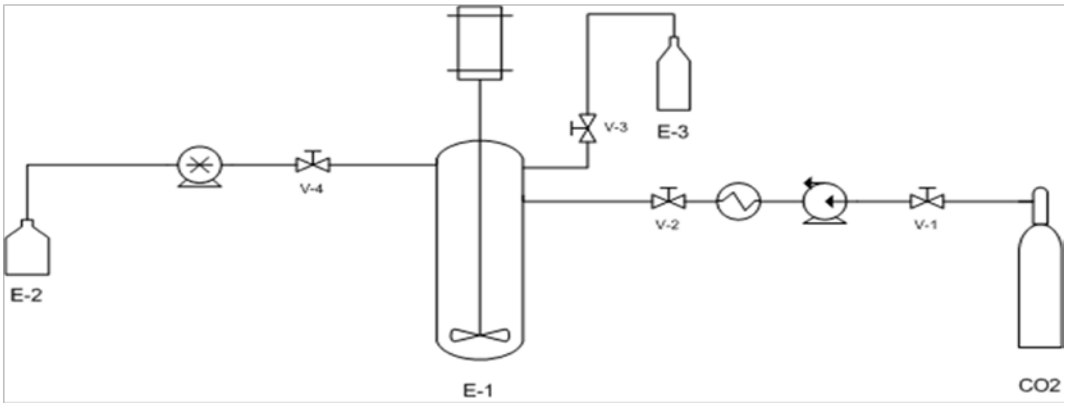


Figure 4: Schematic diagram of the experimental setup for the formulation of PLGA particles.

A scheme of the experimental setup used for the preparation of PLGA particles is shown in Figure 4. Firstly, 0.5 mL of a suspension of lysozyme precipitates in polymer solution was introduced in a 14 mL view-cell (E1), which was kept at the operating temperature (39.6 ± 0.1°C) by a thermostated water bath. The suspension was prepared by adding 100 µl of lysozyme

precipitates in DMI with 300 µl polymer solution (7.5%-20%). This suspension was then gently mixed with 100 µl of ethanol to obtain the final 0.5 mL suspension to introduce into the cell. In the case of preparing blank PLGA particles, 100 µl of protein precipitates was replaced by 100 µl of DMI. It should be pointed out that the presence of 100 µl ethanol is justified by the results obtained from experimental design that had been carried out previously [12]. CO_2 was then delivered to the cell by means of a membrane pump. The mechanical stirring was kept at 1050 rpm to favor the formation of an emulsion. Once the desired pressure (80 ± 0.1 bar) was reached, 1.5 mL of 9% Lutrol F127 solution (E2) was injected to the cell using an HPLC pump. The stirring was maintained for 20 minutes before a depressurizing step. A suspension of particles was then collected in (E3), which contained 5mL of 9% Lutrol F127 solution (solution E4). This suspension was left to stand for 30 minutes before 35 mL of solution E4 was added into it. This final suspension was left to stand at ambient temperature (≈25°C) for 8 hours. Thereafter, the suspension was centrifuged at 2000g for 30 minutes, which allowed particles to be collected. Particles were washed once with distilled water before being freeze-dried. The supernatant was also stored for further quantification.

II.2.4. Particle characterization:

II.2.4.1. Morphology:

The surface morphology of the particles was investigated by scanning electron microscopy (SEM) (JSM 6310F, JEOL, Paris, France) at an accelerating potential of 3 kV. Freeze-dried particles were mounted onto metal stubs using double-sided adhesive tape and then vacuum-coated with a film of gold using a MED 020 (Bal-Tec, Balzers, Lichtenstein).

II.2.4.2. Particle size:

Particle size was determined by using the dynamic light scattering technique using a Mastersizer® 2000HS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Suspensions of particles in distilled water before the freeze-dried step were used for these analyses.

II.2.4.3. Zeta potential:

The zeta potential was measured by the electrophoretic light scattering principle using a Nanosizer® ZS (Malvern Instruments, Worcestershire,UK). Suspensions of particles in distilled water before the freeze-dried step were used for these analyses.

II.2.4.4. Confocal microscopy:

Images of fluorescent particles were investigated using a confocal microscopy Olympus Fluoview FV300 (Olympus, Japan). Imaris® software (Bitplane, Switzerland) was used for the reconstruction of 3D images. FITC-Insulin loaded microparticles were used for this experiment. The procedure used for the preparation of FITC-Insulin loaded microparticles was the same as the one carried out in the case of lysozyme-loaded microparticles except that FITC-Insulin precipitates were prepared as follows: FITC-insulin was dissolved in 0.3M NaCl/0.1M HCl solution at the concentration of 10 mg/mL. 90 µl of this solution was then mixed with 910 µl DMI, which played a role of anti-solvent, to obtain a suspension of precipitated protein for further use. Protein encapsulation yield was quantified using microBCA method (c.f. II.2.5.1).

II.2.5. In-vitro release:

II.2.5.1. Determination of encapsulation yield:

The total protein was determined using the microBCA method. Briefly, the total amount of each batch (22.5- 60 mg according to experimental conditions) of freeze-dried protein-loaded PLGA particles was dissolved in 1.8 mL DMSO. After 1h, 6 mL of HCl 0.01M was added into the solution. The mixture was then incubated at 37 °C overnight for the extraction of protein. After that, the mixture was centrifuged at 10000g for 30 min. The transparent supernatant was then collected for quantification using a microBCA kit. The protein concentration was calculated using a standard curve after subtraction of the control value of the blank sample. Absorbance was measured at 580 nm with a Multiskan (Multiskan Labsystem, Thermo Fisher).

In this work, *M.lysodeikticus* was not used to quantify the entrapped active protein because a possible overestimation of active protein may occur due to the presence of Lutrol adsorbed on PLGA particles. This method was only used to quantify the amount of active protein in the supernatant obtained after the formulation to correlate with the total protein determined by the microBCA method. The HPLC method (c.f. II.2.5.3) was also used to compare with the microBCA method.

II.2.5.2. Procedure of *in-vitro* release:

In this work, *in-vitro* release was carried out using two approaches. In the first one, the entire batch of protein-loaded PLGA particles (22.5-60 mg depending on experimental conditions) was

put into a centrifugation tube which contained 6 mL of 0.0095M (PO_4)-DPBS buffer, 0.1% Lutrol F68. The tube was incubated in a shaken water bath (37 °C, 125 rpm). In each tube, at determined intervals, the suspension of particles was centrifuged (30 min., 2000g) to allow the supernatant to be collected and quantified. The total supernatant was then replaced by fresh buffer. The experiment was duplicated.

In the second approach, the *in-vitro* experiment was carried out in a multiple-well plate (Transwell®, Corning). Each well is accompanied with an insert provided with a bottom porous membrane (0.4 µm), which permits fluid exchange between the inside and outside of the insert. The suspension of protein-loaded PLGA particles was loaded into the insert. The buffer volumes inside and outside the insert were respectively 0.5 and 2 mL. Four wells were used to load the entire batch of particles. The plate was incubated in an oven at 37 °C and was agitated with a rotating shaker at 290 rpm. At determined intervals, the total outside volume was collected and quantified. The outside volume was replaced by fresh buffer. The experiment was duplicated.

II.2.5.3. Quantification of released protein:

Active released protein was determined using M.lysodeikticus. Released-protein samples were diluted to an appropriate range of concentration before being incubated overnight with a suspension of M.lysodeikticus. Lysozyme activity determination was based on turbidity measurements at 450 nm (UVIKON 922, Kontron Instruments, France). Active protein was calculated using a standard curve. The detection limit of this method is about 0.015 µg/mL.

Total protein released after 24 h was quantified using HPLC. An HPLC assay was conducted using a PLRPS-Column (polymeric reverse phase Column; PLRP-S 250 4.6 mm, 300 Å pore size, 5 µm particle size; Agilent, Massy-France) followed by detection with a photodiode array detector (PDA 996, Waters Technologies, Guyancourt-France). The system was equipped with a mobile phase delivery pump (600 Controller, Waters, Guyancourt-France), an auto sampler (Auto717 Plus, Waters, Guyancourt-France), an on line degasser (AF, Waters, Guyancourt-France), and a column oven (Waters, Guyancourt-France) set at 45°C. Typically, a filtered sample (50 µL) was injected into the column. The flow rate was 1 mL min^{-1}, and the mobile phase consisted of a gradient of water and acetonitrile both containing 0.1% trifluoroacetic acid (v/v). The eluting conditions expressed as proportion of water with 0.1% TFA were as follows: 0–10 min: 69%, 19 min: 49.3%, 20 min: 25%, 20–21 min: 25%, 22 min: 69%, 22–30 min: 69%. The lysozyme peak was identified in the chromatogram at a retention time of 20 min. A UV

spectrum was also taken in order to confirm the identity of the peak and thus guarantee the specificity of the analysis. Lysozyme has a specific peak at 280 nm. Protein concentration was calculated based on a calibration curve. The detection limit of this method is about 3mg/mL.

III. RESULTS & DISCUSSIONS:

*Solubility of CO_2 in DMI and volumetric expansion:

In this work, the solubility of CO_2 in DMI has been measured within a range of temperature of 298.15 °K to 318.15 °K. The experimental results are recapitulated in Table 3 and Figure 2. It can be seen that at a fixed pressure, the solubility of CO_2 in DMI decreases with increasing temperature. Remarkably, the solubility increases steeply with increases in pressure at a fixed temperature, which indicates a high solubility of CO_2 in DMI. For predictive purposes, a mathematical modeling step has been carried out using a neural network technique. Multi-layer perceptron topology with the leave-N-out training approach was used to train and test the network. Details of network topology and training results can be found in Table 3. Figure 5 shows experimental results and predicted data at 298.15 °K, 313.15 °K, and 318.15 °K, for example. It can be seen that the established mathematical model fits the experimental data very well. To get more insight into the behavior of DMI in CO_2 media, data were correlated with Peng-Robinson equation of state. Results with values of temperature-dependent binary parameters obtained from regression are summarized in Table 4. The overall AAD % is 3.5%. It should be pointed out that the correlation may yield a better result by combining an advanced mixing rule based on a g^E model with Schwartzentruber-Renon-Watanasiri or Mathias-Copeman alpha function in which some polar terms are added. This approach has been proven to be more appropriate for polar components[20, 23]. Besides, it can be also noted that Fischer and Gmehling [24] have made comparisons between several mixing rules based on predictive g^E models using Soave-Redlich-Kwong EoS to correlate vapor-liquid equilibria of a great variety of substances, and the authors have shown the error in pressure to be about 2.5-3.5%, which is comparable with the results obtained in this work using a PR-EoS.

Table 3: experimental and calculated data using neural network technique.

Temperature (°C)	Pressure (bar)	Measured solubility (%m/m)	Calculated solubility (%m/m)	AAD	AAD (%)
45.00	51.00	20.2	20.58	0.38	1.88
45.00	77.00	41.2	42.18	0.98	2.38
45.00	83.00	50.0	49.67	0.33	0.66
45.00	89.50	63.8	65.15	1.35	2.12
45.00	93.00	78.9	80.63	1.73	2.19
40.00	30.00	16.2	15.49	0.71	4.38
40.00	50.00	27.6	27.00	0.60	2.17
40.00	70.00	47.3	46.63	0.67	1.42
40.00	75.00	54.9	55.25	0.35	0.64
40.00	80.50	71.0	71.84	0.84	1.18
40.00	83.00	83.5	83.94	0.44	0.53
35.00	30.00	17.0	18.88	1.88	11.06
35.00	50.00	30.2	29.58	0.62	2.05
35.00	70.00	52.3	57.59	5.29	10.11
35.00	73.50	66.8	72.27	5.47	8.19
35.00	75.50	83.6	83.78	0.18	0.22
30.00	46.50	27.8	28.07	0.27	0.97
30.00	59.00	45.6	42.59	3.01	6.60
30.00	64.00	62.5	59.13	3.37	5.39

30.00	63.50	57.8	56.91	0.89	1.54
25.00	33.00	22.1	22.35	0.25	1.13
25.00	55.00	50.9	51.02	0.12	0.24
25.00	58.00	63.1	66.58	3.48	5.52
25.00	61.00	85.4	86.46	1.06	1.24
27.50	63.00	75.0	73.79	1.21	1.61
27.50	64.50	87.0	83.86	3.14	3.61
37.25	76.25	67.9	70.72	2.82	4.15
37.50	79.00	83.5	83.11	0.39	0.47
42.50	87.00	85.3	81.05	4.25	4.98
32.00	72.00	88.3	89.41	1.11	1.26
		Average		1.57	2.99

The selected MLP network: 1 hidden layer (3 process elements) + 1 output layer (1 process element)

Transfer function: tanh

Solubility (m% CO_2)= (((((**tanh**(((A* (8.99999e-002) + (-3.14999))*(-3.24663e-001))+ ((B* (2.85714e-002) + (-1.75714))*(-3.24443e-001))+ (1.63425)))*(-1.99927e+002)))+ (((**tanh**(((A* (8.99999e-002) + (-3.14999))*(2.34468))+ ((B* (2.85714e-002) + (-1.75714))*(-4.08862))+ (2.11341)))*(-1.36576)))+ (((**tanh**(((A* (8.999997e-002) + (-3.14999))*(-3.25922e-001))+ ((B* (2.85714e-002) + (-1.75714))*(-2.97319e-001))+ (2.32777)))*(7.54514e+002)))+ (-5.54008e+002))-(-1.30443)) / (2.49653e-002)

A:temperature (°C); B:pressure (bar)

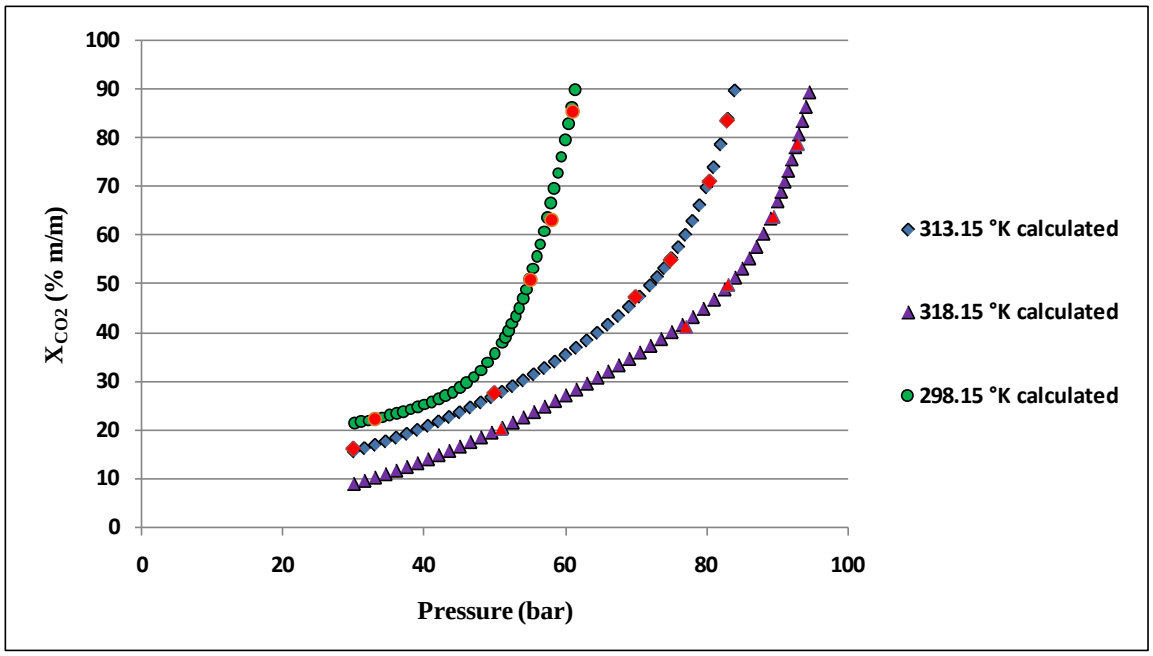


Figure 5: calculated and experimental solubility of CO_2 in DMI. (●,◆,▲ are respectively experimental data at 298.15 °K, 313.15 °K, and 318.15 °K).

Table 4: experimental and correlated data with the Peng-Robinson equation of state.

Temperature (° K)	Mass fraction /liquid phase	Experimental pressure (P_{exp}) (bar)	Estimated pressure (P_{cal}) (bar)	AAD (%)
313.15	0.162	30.00	32.30	7.65
313.15	0.276	50.00	50.40	0.89
313.15	0.473	70.00	70.80	1.16
313.15	0.549	75.00	76.30	1.74
313.15	0.710	80.50	84.50	4.86
313.15	0.835	83.00	87.30	5.07
308.15	0.170	30.00	27.00	9.85

308.15	0.302	50.00	48.80	2.39
308.15	0.523	70.00	65.60	6.38
308.15	0.668	73.50	72.50	1.47
308.15	0.836	75.50	77.70	2.86
303.15	0.278	46.50	44.40	4.44
303.15	0.456	59.00	58.30	1.19
303.15	0.625	64.00	63.60	0.67
303.15	0.578	63.50	62.20	2.03
298.15	0.221	33.00	35.70	8.25
298.15	0.509	55.00	58.20	5.85
298.15	0.631	58.00	58.70	1.33
298.15	0.854	61.00	61.70	1.13
318.15	0.202	51.00	50.10	1.81
318.15	0.412	77.00	77.20	0.31
318.15	0.500	83.00	86.70	4.41
318.15	0.638	89.50	96.60	7.85
318.15	0.789	93.00	98.80	6.20
300.65	0.750	63.00	63.40	0.64
300.65	0.870	64.50	65.63	1.74
310.40	0.679	76.25	77.22	1.27
310.65	0.835	79.00	82.30	4.18
315.65	0.853	87.00	91.99	5.73

305.15	0.883	72.00	73.17	1.62
		Average		3.50

Binary interaction parameters: $k_{ij}^{(1)}$= -66.16979, $k_{ij}^{(2)}$= 0.1095268, $k_{ij}^{(3)}$= 9980.362;

$l_{ij}^{(1)}$= 99.36523, $l_{ij}^{(2)}$= -0.2147893, $l_{ij}^{(3)}$= -9999.708

Based on the prediction performance of the two above-mentioned approaches, we use the neural network model for routine calculations keeping in mind that the phenomenon can be well explained by thermodynamic equations. In the same way, measurements were carried out with a 7.5% PLGA solution (w/v) at 313.15 °K (Figure 6). It can be seen that the solubility of CO_2 in the polymer solution has the same profile as in DMI alone, which is highly pressure-dependent at a fixed temperature. The solubility of CO_2 in PLGA/DMI is lower than in DMI alone about 5-7 units (% m/m) under the same pressure of CO_2 (Figure 5, 6). This fact can be attributed to the presence of PLGA in DMI which makes DMI less available for the interaction with CO_2. Moreover, it should be noted that at 313.15 °K, the polymer solution of 7.5% PLGA begins to precipitate beyond 84 bar. Hence, at this temperature, the condition of pressure for the formulation of PLGA particles must be kept below this limit to prevent any prior precipitation of PLGA before the formation of an emulsion with an aqueous phase. Besides, the high solubility of CO_2 in DMI and PLGA/DMI can be also seen via a high degree of volumetric expansion (Figure 7). The volumetric expansion follows along with the solubility behavior according to CO_2 pressure at the fixed temperature. Volumetric expansion increases quickly, especially beyond 70 bar and it can reach up to about 200% at 80 bar.

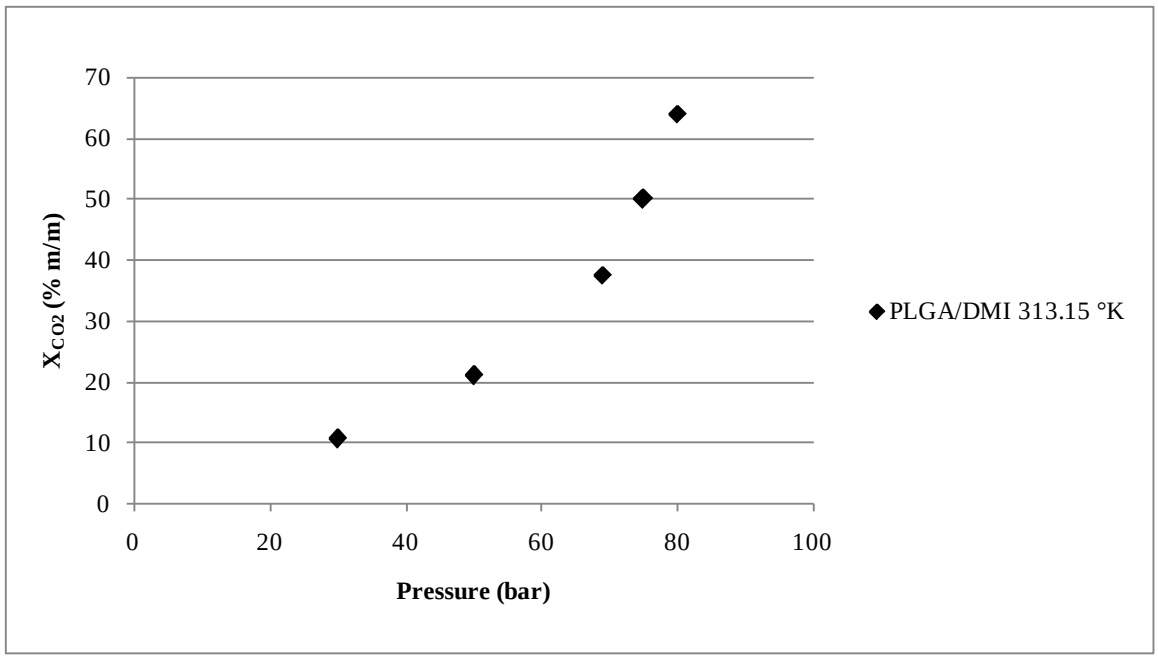


Figure 6: experimental solubility of CO_2 in polymer solution (PLGA/DMI 7.5%) at 313.15 °K

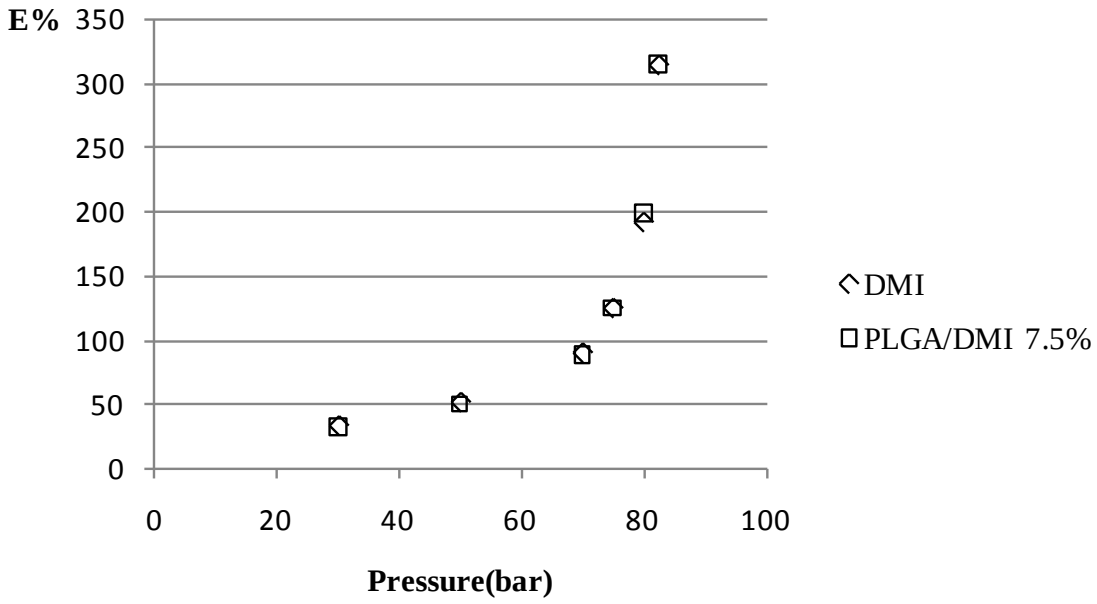


Figure 7: experimental volumetric expansion of DMI and polymer solution in CO_2 at 313.15 °K

*Discussion on the mechanism of particle formation:

In this work, we make use of the high solubility of CO_2 in DMI in order to form an emulsion between a mixture of CO_2 and DMI with an aqueous phase as the first step of the formulation of PLGA particles. As already mentioned above, DMI is a water-miscible solvent, which makes it impossible to form an emulsion with an aqueous phase under atmospheric conditions. Therefore, it was decided to bring into play another component - CO_2, which interacts with DMI and water in a different way. Indeed, whereas CO_2 is barely soluble in water [25], the solubility of CO_2 in DMI is very high as demonstrated above. The main idea behind this fact is, that in CO_2 media, the mixture of DMI and CO_2 becomes more hydrophobic compared to DMI alone, which would slow down the diffusion of DMI into an aqueous phase and vice versa. This is the necessary condition for the formation of an emulsion. To have an idea on how the solubility of CO_2 influences the hydrophilic-hydrophobic character of a DMI-CO_2 mixture, the dielectric constant of the mixture was chosen to be assessed. Based on the Kirkwood theory [26] for a pure fluid, the dielectric constant ε is related to intermolecular interactions as follows:

$$\frac{(\varepsilon-1)(2\varepsilon+1)}{9\varepsilon}=\frac{4\pi N_A}{3\upsilon}\left(\alpha+\frac{\mu^2 g}{3kT}\right) \qquad \text{(eq 19)}$$

where α, μ, N_A, υ, g are respectively molecular polarizability, the dipole moment of the molecule, Avogadro's constant, molar volume, and a correlation factor that characterizes the relative orientations between neighboring molecules. This equation can be rewritten to relate the polarization per unit of volume of the fluid - p to the dielectric constant:

$$p=\frac{(\varepsilon-1)(2\varepsilon+1)}{9\varepsilon} \qquad \text{(eq 20)}$$

For the polarization of a mixture of n components, Oster's rule [26]can be applied:

$$p_m=\frac{\sum_{i=1}^{n} x_i \upsilon_i p_i}{\sum_{i=1}^{n} x_i \upsilon_i} \qquad \text{(eq 21)}$$

where p_m is polarization per unit volume of the mixture and x_i, υ_i, p_i are respectively the mole fraction, molar volume, and polarization per unit volume of the pure component i.

Knowing that $p_{CO2}<p_m<p_{DMI}$ and p is an increasing function of ε, the higher x_{CO2}, the more p_m approaches p_{CO2} and the lower ε is. This fact led us to make a visualization test to study the miscibility between the polymer solution/DMI and water. Observation via a window sapphire (Figure 8) shows a rather stable interface between the polymer solution and the aqueous solution. This indicates that it seems possible to form an emulsion between the polymer solution and the

aqueous solution in CO_2 media. Hence, we sought to apply this result to the formulation of PLGA particles in CO_2 media by using an emulsification-extraction method.

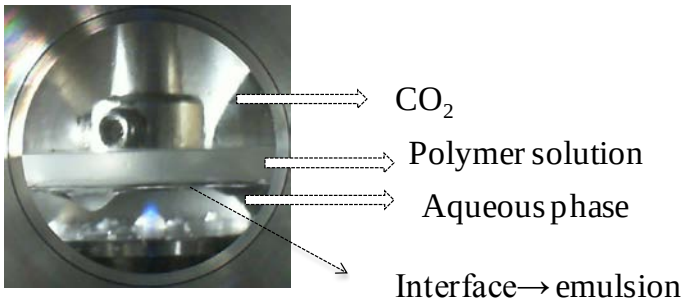


Figure 8: miscibility test between polymer solution and an aqueous phase in CO_2 medium.

The best way to describe an emulsification process is to make time-series measurements of interfacial tension between dispersing and dispersed phases, which are water and CO_2-saturated DMI in this case. We are now building a drop tensiometer which can carry out this task and it will be the focus of our next communication. In this work, to prove the existence of an emulsion in our formulation process, we chose to establish a relation between particle size and stirring rate. In fact, in an emulsification process, particle size would decrease if the stirring rate increases and vice versa. Particle size, which is the "fingerprint" of emulsion droplets formed during the process, was measured using the light scattering technique. The volume-weighted mean diameter d(4,3) of PLGA particles obtained after the formulation was chosen to be investigated according to the variation of the stirring rate. The results combined with SEM images were summarized in Figure 9. It clearly shows the dependence between particle size and stirring rate, which would strongly indicate the presence of an emulsion during our formulation process.

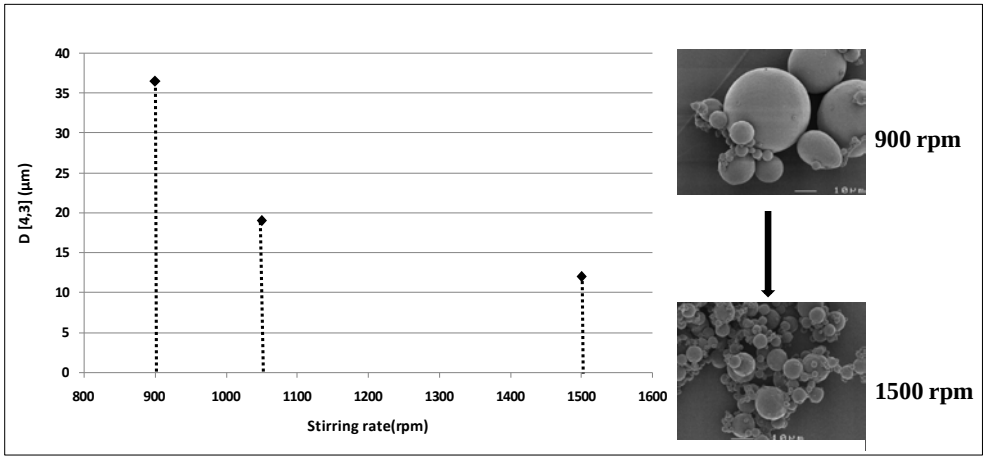


Figure 9: variation of particle size according to stirring rate.

We name our formulation method “modified-PGSS” (modified-Particles from Gas Saturated Solution) due to the fact that a CO_2-saturated polymer solution is called upon for the formation of an emulsion with an aqueous phase as the first step in the particle generation procedure. The polymer is dissolved beforehand in a water-miscible solvent. In this work, DMI, a high-boiling-point, low-toxic solvent is used for this purpose. After the first step of emulsion formation, the CO_2-saturated solvent is slowly extracted to the dispersing phase, which is an aqueous solution, to allow the solidification of PLGA particles. Comparisons between classic PGSS and modified-PGSS for the generation of PLGA particles can be found in Table 5.

Table 5: Comparisons between classic-PGSS and modified-PGSS.

Classic PGSS[31-33]	Modified-PGSS
-Particle generation by spraying a CO_2-saturated solution of melted PLGA through a nozzle.	-Particle generation by emulsifying a CO_2-saturated PLGA solution with an aqueous phase.
-Without organic solvent	-PLGA is dissolved previously in water-miscible solvents (DMI, DMSO…).
-Particle size is controlled by nozzle diameter, spraying rate…	-Particle size is controlled by stirring rate.
-Particle shape is irregular.	-Particle shape is spherical.
-Temperature: > $T_{critical(CO2)}$= 31.3 °C	-Temperature: < or > $T_{critical(CO2)}$

In this work, this method was made use of for protein encapsulation. FITC-labeled insulin was encapsulated to allow further observation under confocal microscopy. Images of fluorescent PLGA particles can be found in Figures 10 A, B. It can be seen in Figure 10 A (2D slice image) a typical image of particles prepared by an emulsification method, which shows a polydispersed population of PLGA particles. Figure 10 B is a close-up image of an FITC-insulin loaded PLGA particle after 3D reconstruction observed under orthogonal view. It can be noted that FITC-insulin appears to be homogeneously distributed inside the particle. Hereby, we show a proof-of-concept of our formulation method.

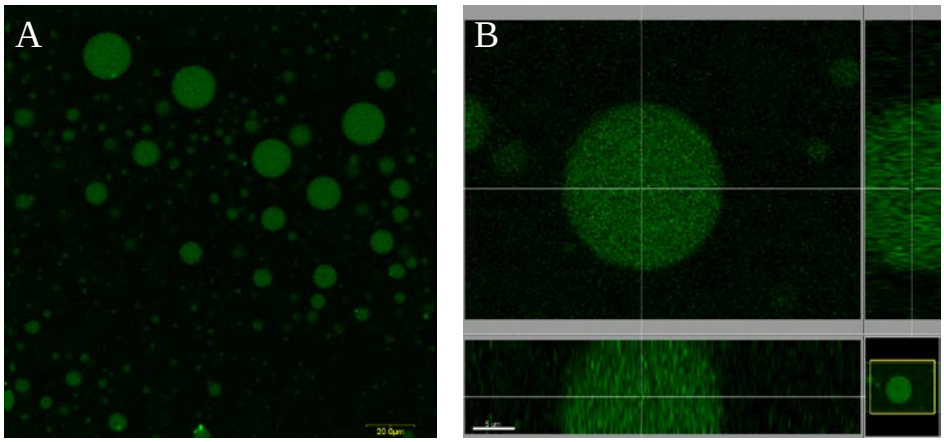


Figure 10: FITC-insulin-loaded PLGA particles observed under confocal microscopy. (A- a 2D slice image; B- orthogonal view in xy, xz, yz planes of a zoom-in particle after 3D reconstruction). Encapsulation yield of FITC-insuline was 75% (quantified by microBCA method).

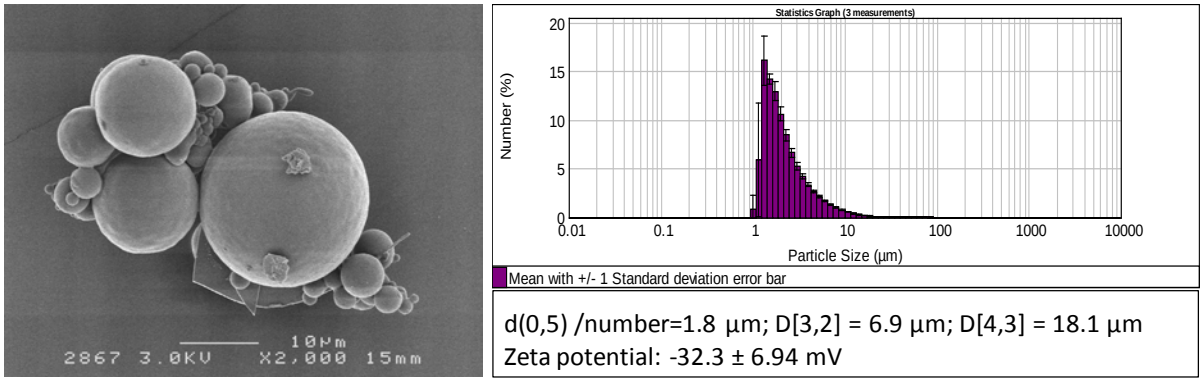


Figure 11: SEM image of protein-loaded particles and results of particle size and zeta potential analysis.

*In-vitro release:

Lysozyme was chosen as model protein for the study of *in-vitro* release due to the fact that lysozyme activity could be quantified at very low range of concentration, which allowed released lysozyme to be closely tracked. The encapsulation yield determined by microBCA and confirmed with HPLC method is about 65%. Besides, active protein found in the supernatant by *M.lysodeikticus* added to with entrapped protein nearly equals the initial amount of protein. The SEM image, particle size, and zeta potential of protein-loaded particles are shown in Figure 11. In-vitro release results after 14 days are shown in Figure 12A. The study was carried out with different batches of particles prepared from polymer solutions at different concentrations.

Whatever the starting concentration, the release profile has an important initial "burst" on the first day, followed by a slow-release phase. It can be seen that the lower the polymer concentration is, the higher burst release can be observed. Besides, it should be pointed out that the total protein released after 24 h quantified by HPLC equals the amount of active protein quantified by *M. lysodeikticus*, which allows us to suppose that the total protein in the particles also equals active protein which had not been quantified due to a possible overestimation in our case. Due to the fast release in the first 24 h, it was decided to closely investigate the release profile over this period of time. The results can be found in Figure 12B. It can be noted that the release rate is faster in the case of PLGA particles formulated with lower polymer concentrations.

After 14 days, PLGA particles were recovered and freeze-dried to quantify the remaining protein. About 40% of total protein was found to be remaining in each sample using the microBCA method. While the released protein and the total remaining protein added up to 100% in the case of PLGA 4.5%, it does not in the case of PLGA 9.5% and 12%. It means that about 20% of protein was not revealed by dosing active protein with *M.lysodeikticus*, which indicates there was denatured protein in the release medium in the case of PLGA 9.5% and 12%. In our preliminary work, it had been tested and proven that lysozyme is stable in the release medium (DPBS, 0.1% Lutrol). Hence, protein denaturation is believed to be related to protein interactions with the polymer. Such interactions could be the non-specific adsorption to the polymer and ionic interaction with the uncapped carboxylic end-group [27]. Besides, the acidic microenvironment inside PLGA particles can possibly affect protein stability over time as well. [27, 28]. In our case, it might be required that additives be added into the formulation. Many suggestions have been made by different authors such as sugars, basic salt, PEG…to improve protein stability and to obtain complete protein release [27, 28]. These approaches are now under investigation. In this work, we mainly focus on studying the burst effect.

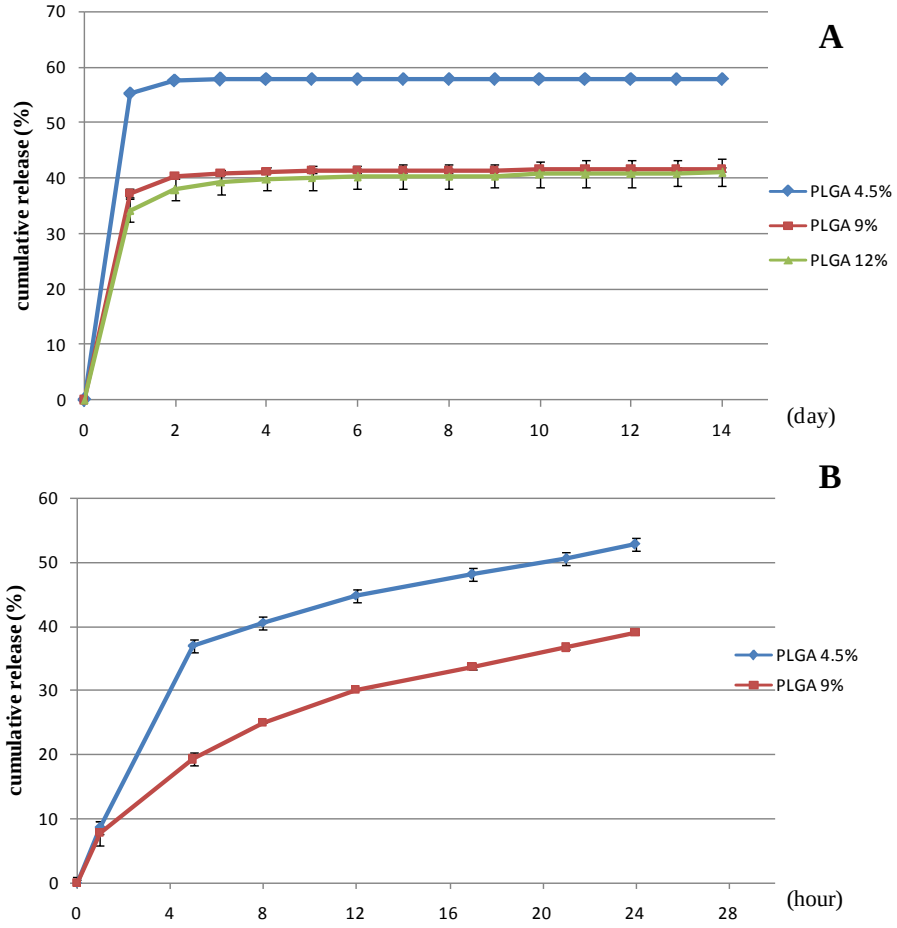


Figure 12: release profile of lysozyme-loaded PLGA in DPBS pH 7.4

The volume-weighted mean diameter ($d_{4,3}$) of protein-loaded PLGA particles is about 18 µm. These particles are intended for use in subcutaneous injections. Therefore, the release profile established above may not be appropriate because repetitive centrifugation might accelerate the release rate, and putting particles in contact with the total volume of release medium may not fit reality. Hence, *in-vitro* release was also carried out using another approach in which the suspension of particles was separated from the release medium by a porous membrane to mimic the absorption of drug through blood and lymphatic vessels, and to avoid centrifugation steps. The results are shown in Figure 13.

It can be seen that the burst effect is clearly attenuated, which indicates the release profile is strongly influenced by the way the experiment was conducted. Moreover, there is no clear connection between *in-vitro* conditions with protein *in-vivo* release profile. For instance, G. Jiang

et al. [29] has demonstrated that the release profile of lysozyme from PLGA particles (prepared by the w/o/w method) carried out in 0.1M glycin-HCl buffer pH 2.5 had the best in-vitro/in-vivo correlation compared to other release media such as 0.1M PBS pH 7.4 and 0.1 acetate buffer pH 4.0. Therefore, until there is a standard procedure of *in-vitro* experimentation for protein-loaded PLGA particles, it will be difficult to make predictions from *in-vitro* release profiles. *In-vivo* studies are thus necessary to assess release behavior of proteins in such delivery systems.

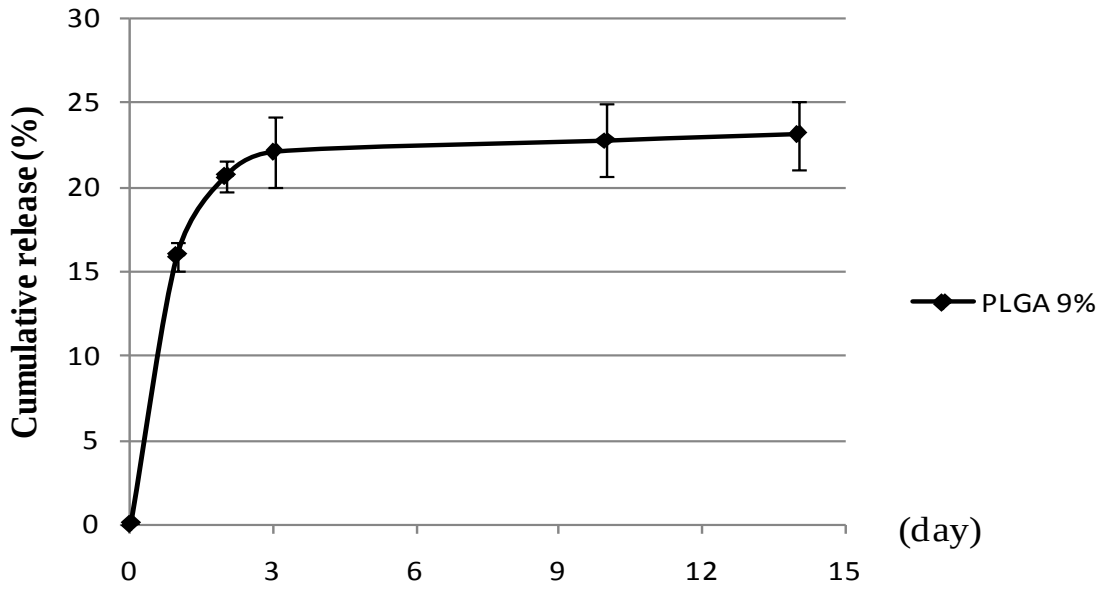


Figure 13: release profile of lysozyme-loaded PLGA in DPBS pH 7.4 obtained with the second approach.

CONCLUSION:

In this work, we discussed in detail the mechanism of particle formation in our process, which is based on an emulsification-extraction method performed in pressurized CO_2. DMI, as the safest injectable, water-miscible solvent at the time being, was used for the formulation of PLGA particles. High solubility of CO_2 in DMI was made use of for the formation of an emulsion of the polymer solution with an aqueous solution. One main advantage of this process is the fact that it allows the particle size to be tuned easily to adapt different applications. Solubility of CO_2 in DMI was correlated with Peng-Robinson equation of state and a mathematical model built from neural network technique. These two approaches have proven to be useful in describing the solubility of CO_2 in DMI in function of pressure and temperature. Moreover, satisfactory

encapsulation efficiency was obtained by using this process. Although model proteins were chosen to be encapsulated to show a proof-of-concept, the encapsulation procedure presented in this paper can be extended to other active agents as well, such as anti-cancer lipophilic drugs. This study could now be adapted for therapeutic fragile proteins and *in vitro, in vivo* evaluation are planned to validate the interest of such drug delivery systems in therapeutic applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank ANR (France—Project ANR-09-PIRI-0004-01), Regional research program (Pays de Loire, France—Bioregos program) and the French education minister for their financial support. We would also like to thank the SCIAM ("Service Commun d'Imagerie et d'Analyse Microscopique") of Angers for scanning electron microscopy images.

REFERENCES

[1] A. Rawat, D.J. Burgess, Parenteral Delivery of Peptides and Proteins, in: Biodrug Delivery Systems: Fundamentals, Applications, and Clinical Development, pp. 50-68.

[2] J.C. Wright, D.J. Burgess, Long Acting Injections and Implants, Springer, 2011.

[3] V.R. Sinha, A. Trehan, Biodegradable microspheres for protein delivery, Journal of Controlled Release, 90 (2003) 261-280.

[4] J.S. Kent, D.H. Lewis, L.M. Sanders, T.M. Tice, Microencapsulation of water soluble active polypeptides, in, Syntex (U.S.A.) Inc. (Palo Alto, CA), U.S. patent 4,675,189, 1987.

[5] A. Aubert-Pouëssel, M.-C. Venier-Julienne, A. Clavreul, M. Sergent, C. Jollivet, C.N. Montero-Menei, E. Garcion, D.C. Bibby, P. Menei, J.-P. Benoit, In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres, Journal of Controlled Release, 95 (2004) 463-475.

[6] T. Morita, Y. Sakamura, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant, Journal of Controlled Release, 69 (2000) 435-444.

[7] C. Thomasin, H.P. Merkle, B.A. Gander, Physico-chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation, International Journal of Pharmaceutics, 147 (1997) 173-186.

[8] B. Gander, P. Johansen, H. Nam-Trân, H.P. Merkle, Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly(D,L-lactide) by spray drying, International Journal of Pharmaceutics, 129 (1996) 51-61.

[9] U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues, AAPS PharmSciTech, 6 (2005) E594-E604.

[10] D. Allhenn, A. Lamprecht, Microsphere Preparation Using the Untoxic Solvent Glycofurol, Pharmaceutical Research, 28 (2010) 563-571.

[11] A. Aubert-Pouëssel, M.-C. Venier-Julienne, P. Saulnier, M. Sergent, J.-P. Benoît, Preparation of PLGA Microparticles by an Emulsion-Extraction Process Using Glycofurol as Polymer Solvent, Pharmaceutical Research, 21 (2004) 2384-2391.

[12] M.-K. Tran, A. Swed, F. Boury, Preparation of polymeric particles in CO2 medium using non-toxic solvents: Formulation and comparisons with a phase separation method, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.

[13] P.-E. Le Renard, O. Jordan, A. Faes, A. Petri-Fink, H. Hofmann, D. Rüfenacht, F. Bosman, F. Buchegger, E. Doelker, The in vivo performance of magnetic particle-loaded injectable, in situ gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia, Biomaterials, 31 (2010) 691-705.

[14] S.M. Mottu F, Rüfenacht DA, Doelker E, Comparative hemolytic activity of undiluted organic water-miscible solvents for intravenous and intra-arterial injection, PDA J Pharm Sci Technol., 55 (2001) 16-23.

[15] M.F. Laurent A, Chapot R, Zhang JQ, Jordan O, Rüfenacht DA, Doelker E, Merland JJ, Cardiovascular effects of selected water-miscible solvents for pharmaceutical injections and embolization materials: a comparative hemodynamic study using a sheep model, PDA J Pharm Sci Technol., 61 (2007 Mar-Apr) 64-74.

[16] O. Dudeck, O. Jordan, K.T. Hoffmann, A.F. Okuducu, K. Tesmer, T. Kreuzer-Nagy, D.A. Rufenacht, E. Doelker, R. Felix, Organic Solvents as Vehicles for Precipitating Liquid Embolics: A Comparative Angiotoxicity Study with Superselective Injections of Swine Rete Mirabile, AJNR Am J Neuroradiol, 27 (2006) 1900-1906.

[17] B. Calvignac, E. Rodier, J.-J. Letourneau, J. Fages, Development of Characterization Techniques of Thermodynamic and Physical Properties Applied to the CO2-DMSO Mixture, in: International Journal of Chemical Reactor Engineering, 2009.

[18] B. Calvignac, E. Rodier, J.-J. Letourneau, M. Almeida dos Santos Pedro, J. Fages, Cocoa Butter Saturated with Supercritical Carbon Dioxide: Measurements and Modelling of Solubility, Volumetric Expansion, Density and Viscosity, in: International Journal of Chemical Reactor Engineering, 2010.

[19] Neurodimension, Neurosolutions Tip Box: Leave-N-out training, in, US, 2005.

[20] J.C. Principe, N.R. Euliano, W.C. Lefebvre, Neural and adaptive systems: fundamentals through simulations, Wiley New York, 2000.

[21] P.M. Mathias, H.C. Klotz, J.M. Prausnitz, Equation-of-State mixing rules for multicomponent mixtures: the problem of invariance, Fluid Phase Equilibria, 67 (1991) 31-44.

[22] M. Solórzano-Zavala, F. Barragán-Aroche, E.R. Bazúa, Comparative study of mixing rules for cubic equations of state in the prediction of multicomponent vapor-liquid equilibria, Fluid Phase Equilibria, 122 (1996) 99-116.

[23] B.E.P. Poling, John M.; O'Connell, John P., Pure Component Constants, in: McGraw-Hill (Ed.) Properties of Gases and Liquids 2001.

[24] B.E.P.J.M.P.J.P. O'Connell, Fluid Phase Equilibria in Multicomponent Systems, in: McGraw-Hill (Ed.) Properties of Gases and Liquids, 2001.

[25] J. Gmehling, B. Kolbe, M. Kleiber, J. Rarey, Chemical Thermodynamics for Process Simulation, Wiley-VCH, 2012.

[26] R. Schefflan, Teach yourself the basics of Aspen plus, Wiley ; American Institute of Chemical Engineers, Hoboken, N.J.; [New York], 2011.

[27] B.K. Jürgen Gmehling, Michael Kleiber,Jürgen Rarey, PHASE EQUILIBRIA IN FLUID SYSTEMS, in: Chemical Thermodynamics for Process Simulation, Wiley-VCH, 2012.

[28] K. Fischer, J. Gmehling, Further development, status and results of the PSRK method for the prediction of vapor-liquid equilibria and gas solubilities, Fluid Phase Equilibria, 112 (1995) 1-22.

[29] L.W. Diamond, N.N. Akinfiev, Solubility of CO2 in water from −1.5 to 100 °C and from 0.1 to 100 MPa: evaluation of literature data and thermodynamic modelling, Fluid Phase Equilibria, 208 (2003) 265-290.

[30] P. Wang, A. Anderko, Computation of dielectric constants of solvent mixtures and electrolyte solutions, Fluid Phase Equilibria, 186 (2001) 103-122.

[31] M.J. Whitaker, J. Hao, O.R. Davies, G. Serhatkulu, S. Stolnik-Trenkic, S.M. Howdle, K.M. Shakesheff, The production of protein-loaded microparticles by supercritical fluid enhanced mixing and spraying, Journal of Controlled Release, 101 (2005) 85-92.

[32] J. Hao, M.J. Whitaker, B. Wong, G. Serhatkulu, K.M. Shakesheff, S.M. Howdle, Plasticization and spraying of poly (DL-lactic acid) using supercritical carbon dioxide: control of particle size, Journal of Pharmaceutical Sciences, 93 (2004) 1083-1090.

[33] L. Casettari, E. Castagnino, S. Stolnik, A. Lewis, S. Howdle, L. Illum, Surface Characterisation of Bioadhesive PLGA/Chitosan Microparticles Produced by Supercritical Fluid Technology, Pharmaceutical Research, 28 (2011) 1668-1682.

[34] U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 59 (2005) 375-388.

[35] A. Giteau, M.C. Venier-Julienne, A. Aubert-Pouëssel, J.P. Benoit, How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?, International Journal of Pharmaceutics, 350 (2008) 14-26.

[36] G. Jiang, B.H. Woo, F. Kang, J. Singh, P.P. DeLuca, Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres, Journal of Controlled Release, 79 (2002) 137-145.

V .DISCUSSION GENERALE

Au cours de ces trois chapitres expérimentaux, nous avons décrits différents procédés de formulation utilisant des solvants non-volatiles et peu toxiques pour produire des particules de PLGA en vue de l'encapsulation d'une protéine. L'objectif de cette discussion générale est de faire ressortir les paramètres principaux de chaque procédé et les difficultés rencontrées lors du développement. Cette discussion pourra être à la base des perspectives à l'issue de ce projet.

***Procédés de formulation :**

Trois procédés de formulation développés pour la génération des particules de PLGA ont été présentés. Ces procédés sont basés soit sur le phénomène de séparation de phase ou soit sur des étapes d'émulsification/extraction. Le choix des procédés est orienté par des questions techniques et méthodologiques, mais aussi par les propriétés intrinsèques du solvant choisi pour la formulation.

En ce qui concerne les avantages et les inconvénients de chaque méthode, une comparaison a été faite dans le chapitre 2. Brièvement, par la méthode de séparation de phase, la procédure est simple à mettre en œuvre, mais elle s'avère sensible à la qualité du polymère (plus l'indice de polydispersité est proche de 1, plus le procédé est reproductible), et la taille moyenne des particules est difficile à moduler. Dans le cas de la méthode d'émulsification/extraction en milieu CO_2 pressurisé, le procédé est techniquement plus difficile à mettre en œuvre car il est indispensable d'avoir un appareil spécifique construit pour pouvoir travailler en milieu pressurisé, accompagné des composants nécessaires (pompes HPLC, agitateur mécanique,…). En revanche, ce procédé est plus flexible au niveau du choix des polymères et la taille des particules est plus facile à modifier qu'avec le procédé basé sur la séparation de phase.

Les propriétés intrinsèques du solvant choisi pour chaque type de formulation font qu'un simple remplacement d'un solvant par un nouveau solvant implique une révision complète des conditions expérimentales (pression, température,…). Certains solvants ne peuvent pas être utilisés dans un procédé spécifique comme cela a été observé dans le cas de la séparation de phase. Ainsi, le remplacement de glycofurol par l'isosorbide dimethyl ether (DMI) entraîne l'échec du procédé du fait d'une forte désolvatation du PLGA, ce qui conduit à la précipitation massive du polymère. Il a été montré que les rapports relatifs entre les énergies d'interaction des composants jouaient un rôle important dans ce procédé [1] (voir II.1.6.1/Etude bibliographique).

Comme l'interaction entre le polymère et la phase aqueuse ne change pas dans les deux cas, on peut s'intéresser principalement aux interactions entre le polymère et le solvant organique ($\Delta intE_1$), et entre le solvant organique et la phase aqueuse ($\Delta intE_2$) qui peuvent être calculées selon les expressions suivantes [2] :

$$\Delta_{int}E_1 = \Delta_{dis}H_A - \Delta_f H_A - V_A\,\delta_A^2 - \Delta_C E^B$$
$$= \Delta_{dis}H_A - \Delta_f H_A - V_A\,\delta_A^2 - V_A\,\delta_{d,B}^2 - 0.5V_B\left(\delta_{d,B}^2 + \delta_{h,B}^2\right)$$

$$\Delta_{int}E_2 = -2V_B\left(\delta_{d,B}\,\delta_{d,C} + \delta_{p,B}\,\delta_{p,C}\right) - E_B E_C - C_B C_C$$

où : $\Delta_{dis}H_A$ est l'enthalpie de dissolution du PLGA dans le solvant ; $\Delta_f H_A$ est l'enthalpie de fusion du PLGA ; V_A, V_B sont les volumes molaires du PLGA et du solvant ; δ correspond aux paramètres de solubilité de Hansen; E,C correspond aux paramètres de Drago.

Afin de calculer ces énergies d'interactions, il est nécessaire de déterminer expérimentalement les valeurs de $\Delta_{dis}H_A$, E_B, C_B car ces valeurs ne sont pas disponibles dans la littérature. Les paramètres physicochimiques du glycofurol et du DMI sont récapitulés dans l'annexe 2. $\Delta_{dis}H_A$ peut être mesurée par la technique de calorimétrie DSC [2, 3]. E_B, C_B peuvent être déterminées par méthode spectroscopique (en basant sur les spectres d'infrarouge et RMN [4]). Nous n'avons malheureusement pu déterminer ces valeurs durant le travail de thèse et il serait donc intéressant de connaître ces paramètres dans l'avenir pour mieux comprendre les mécanismes physico-chimiques impliqués dans le procédé. Selon nos observations, PLGA est beaucoup plus soluble dans le DMI que dans le glycofurol (chapitre 2), ce qui suggère que la valeur de $\Delta_{dis}H_A$ serait plus négative que celle du glycofurol. Ceci reste à confirmer par des mesures expérimentales. Par ailleurs, l'utilisation seule de DMI ne donne pas de résultats satisfaisant, alors qu'un mélange DMI:glycofurol permet d'obtenir des particules sphériques, bien individualisées. (Figure V.1).

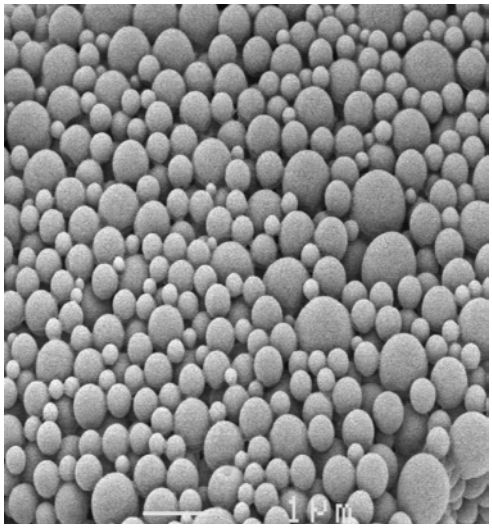


Figure V. 1: Particules de PLGA préparées par séparation de phase en utilisant un mélange DMI : GF (1 : 1) (la barre = 1 µm). La concentration de la solution de polymère est 7.5%.

Pour le procédé « Modified-PGSS » développé avec le DMI (chapitre 3), un changement de solvant organique nécessite une nouvelle étude du comportement de ce solvant en milieu CO_2 pressurisé. L'étude de la solubilité du CO_2 dans le glycofurol et l'expansion volumique du GF en milieu CO_2 pressurisé ont été réalisées et comparées avec les résultats obtenus dans le cas du DMI (Figure V.2, V.3).

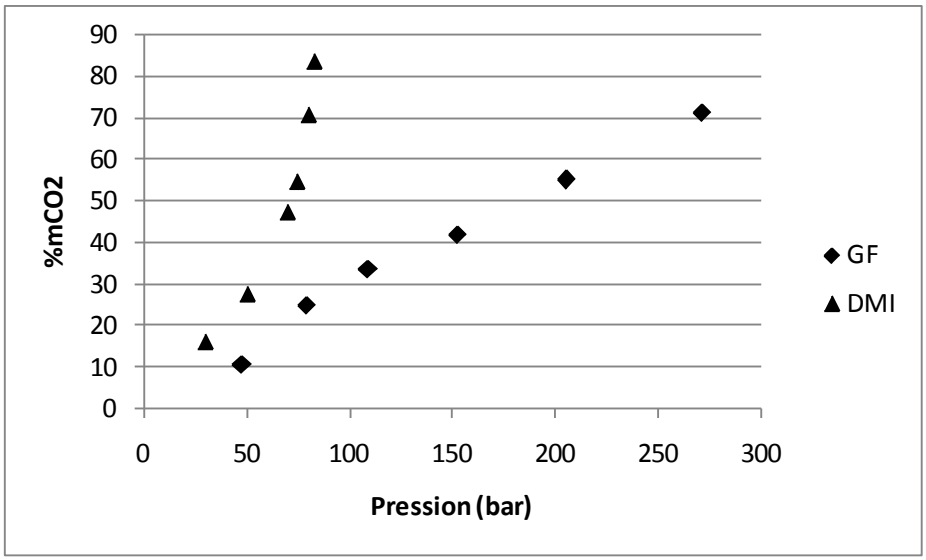


Figure V. 2: Comparaison de la solubilité du CO_2 dans le DMI et dans le GF en fonction de la pression à 313.15 °K.

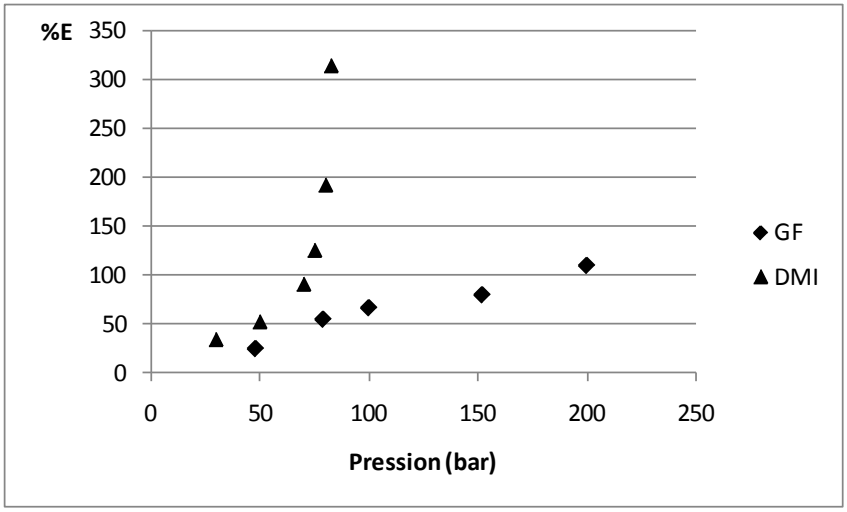


Figure V. 3: Expansion volumique du glycofurol et du DMI en milieu CO_2 pressurisé.

On peut observer que le comportement du glycofurol en milieu CO_2 est totalement différent de celui du DMI. La solubilité du CO_2 dans le glycofurol est ainsi beaucoup moins importante que dans le DMI. Cependant, les données de solubilité du CO_2 dans le tétrahydrofurane [5] et le méthoxy-éthanol [6], molécules qui constituent la structure chimique du glycofurol (Figure V.4) aurait laissé penser à une meilleure solubilité du CO_2 dans ce solvant organique,

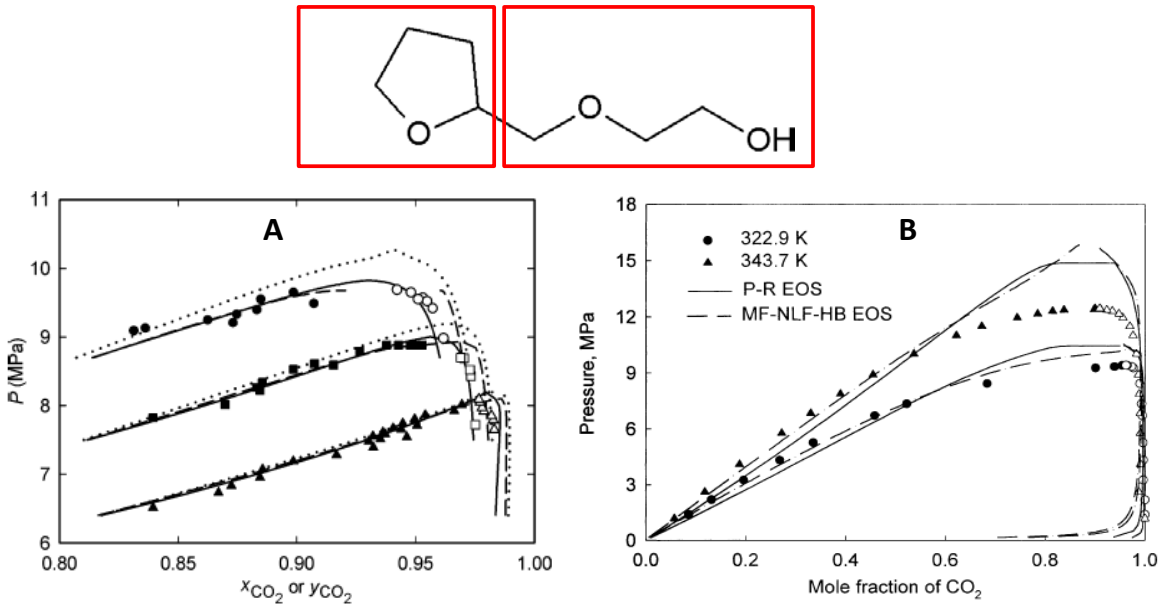


Figure V. 4:Equilibre liquide-vapeur des mélanges binaires: tétrahydrofurane-CO_2 (A) et méthoxy-éthanol-CO_2 (B)

A notre connaissance, un des facteurs qui pourrait influencer la solubilité d'un gaz dans un liquide est le volume libre fractionnaire (free fractional volume-FFV) du liquide [7]. Les valeurs de FFV de ces trois molécules (tétrahydrofurane, 2-méthoxy-éthanol, et glycofurol) ont été calculées selon l'expression suivante et les valeurs sont récapitulées dans le Tableau V.1:

$$\mathrm{FFV} = \frac{\mathrm{V_m} - 1.3\mathrm{V_{vdW}}}{\mathrm{V_m}} = \frac{\mathrm{V_m} - \mathrm{V_{cosmo}}}{\mathrm{V_m}}$$

où Vm, VvdW, Vcosmo sont respectivement le volume moléculaire, le volume de Van der Waals et le volume COSMO.

Tableau V. 1: Volumes libres fractionnaires (calculés en utilisant le logiciel COSMOtherm®).

Molécule	Densité (g/ml)	Volume moléculaire ($Å^3$)	Volume COSMO ($Å^3$)	Volume libre fractionnaire – FFV (%)
2-methoxy-ethanol	0.9274	136.248	103.643	23.93
tétrahydrofurane	0.8794	136.161	99.081	27.23
Glycofurol	1.0639	228.176	189.322	17.02

Ainsi, le glycofurol a une valeur de FFV plus faible par rapport à tétrahydrofurane ou 2-methoxy-éthanol, et il donc serait moins accessible au gaz par rapport que les deux autres liquides. Pour mieux comprendre les interactions entre ces molécules avec le CO_2, la probabilité des interactions moléculaires entre ces molécules avec le CO_2 a été calculée en se basant sur la théorie « Conductor like Screening Model for Realistic Solvation » - COSMO-RS[8], avec un mélange (solvant- CO_2) fictif de rapport molaire 1/9. Les résultats sont répertoriés dans le Tableau V.2.

Tableau V. 2: Probabilité des interactions moléculaires et énergies d'interactions.

Molécule	Rapport solvant/ CO_2 (mol/mol)	Probabilité molécule-molécule	Probabilité molécule-CO_2	Energie d'interaction hydrogène (kcal/mol)	Energie d'interaction van der Waals (kcal/mol)
Tétrahydro-furane	1/9	0.133	0.867	0	-4.44
2-methoxy-ethanol	1/9	0.175	0.825	-1.71	-4.41
Glycofurol	1/9	0.245	0.755	-2.62	-7.49

Avec un mélange de rapport molaire 1/9, s'il n'existe pas de différences entre l'interaction glycofurol-glycofurol et l'interaction glycofurol-CO_2, la probabilité d'interaction des molécules de glycofurol entre elles sera 0.1. Par le calcul de simulation, on peut observer que le glycofurol a tendance à favoriser les interactions entre glycofurol-glycofurol ($0.245 \gg 0.1$) par rapport aux interactions glycofurol-CO_2. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'énergie d'interaction due aux liaisons hydrogènes dans le cas du glycofurol est assez importante. Cette valeur est en effet plus grande que la somme des interactions obtenues pour le tétrahydrofurane et le 2-methoxy-éthanol pris séparément. Cette simulation suggère donc qu'il pourrait exister des liaisons hydrogènes entre les molécules de glycofurol comme indiqué dans la Figure V.5. Ceci pourrait expliquer en partie la solubilité assez faible du CO_2 dans le glycofurol.

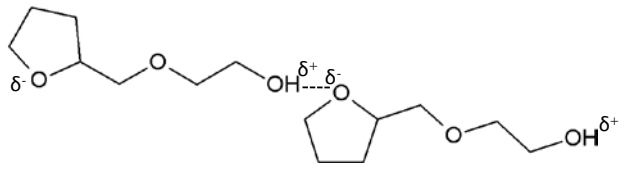


Figure V.5: Liaison hydrogène possible dans le cas du glycofurol.

En plus de la solubilité du CO_2 dans les solvants organiques étudiés, il faut aussi souligner d'autres points importants à prendre en compte dans les procédés d'émulsification/extraction abordés dans les chapitres expérimentaux 1 et 3: (1) la viscosité de la solution de polymère, joue

un rôle important dans la formation des gouttelettes de la phase dispersée pendant l'étape d'émulsification ; (2) la tension interfaciale entre la phase dispersée et la phase dispersante est un paramètre à considérer. Des informations liées à ces deux grandeurs citées ci-dessus ont été obtenues qualitativement lors de l'observation des formulations via une fenêtre de saphir. Il serait désormais intéressant de mesurer directement la viscosité et la tension interfaciale à l'aide d'un viscosimètre [9] et un tensiomètre à goutte adapté aux conditions de pressions. Ainsi, nous développons au laboratoire un tensiomètre à goutte dynamique avec une configuration inverse de celui décrit dans l'annexe 6 [10], et équipé une chambre de mélange afin de faciliter l'obtention de l'équilibre thermodynamique du mélange solvant-CO_2. Cet appareil nous permettra d'obtenir des informations sur la tension interfaciale entre le solvant (glycofurol)/la solution de polymère et la phase CO_2 pressurisé, un paramètre important dans le procédé présenté dans le chapitre 1. En ce qui concerne le procédé présenté dans le chapitre 3, l'utilisation de cet appareil nous permettra de mesurer la tension interfaciale entre le solvant (DMI)/la solution de polymère et la phase aqueuse dans les conditions de la formulation. En effet, dans ces deux procédés, le comportement et le rôle des solvants diffèrent vis à vis du milieu CO_2 pressurisé. Le procédé « Modified-PGSS » est basé principalement sur la forte solubilité du CO_2 dans le DMI ce qui rend la solution de polymère plus hydrophobe en milieu CO_2 et permet la formation d'une émulsion de la solution de polymère chargée en CO_2 avec la phase aqueuse. Le procédé d'émulsification/extraction décrit dans le chapitre 1, repose sur le fait que l'éthanol est miscible avec la solution de polymère et la phase CO_2, et pourrait ainsi diminuer la tension interfaciale entre ces deux phases, ce qui favoriserait donc la formation d'une émulsion entre la solution de polymère et la phase CO_2. Cette idée est renforcée par le fait que la tension interfaciale mesurée expérimentalement entre l'eau et le CO_2 diminue en présence d'éthanol [11] (Annexe 3).

***Difficultés liées à l'encapsulation de protéines/peptides dans les particules de PLGA :**

Les difficultés d'encapsuler des protéines/peptides dans des particules de PLGA sont liées aux caractéristiques intrinsèques des protéines et peptides. Les protéines/peptides, de part leur structure complexe, sont généralement très fragiles et facilement dénaturées dans les conditions de formulation, de stockage, ainsi que dans les conditions physiologiques. Nous avons observé par exemple que le lysozyme, pourtant considéré comme une des enzymes les plus stables, perdait son activité dans un tampon phosphate mimant les conditions physiologiques (Annexe 4).

Il apparaît donc que la présence d'un additif est indispensable pour conserver l'activité des protéines encapsulées. Parmi ces additifs, des tensioactif non-ioniques (tels que les poloxamer) semblent utiles pour conserver l'activité de certaines protéines dont le lysozyme (Annexe 4). La littérature décrit un grand nombre d'autres additifs qui ont un effet positif sur la stabilité des protéines comme les sucres et oligosascharides (trehalose [12], cycodextrine [13],…), certains agents tensioactifs (polysorbates [14], SDS [15],…), d'autres protéines (albumines [16], gélatine [17],…), ou des polymères hydrophiles de synthèse (polyethylène glycol [18], polyvinylacolcol [19],…). Cependant, il faut souligner que certains additifs comme les tensioactifs ioniques ou certaines protéines ne rentrent pas dans le champ des molécules acceptables du point de vue règlementaire. Le choix des additifs doit être donc être dicté par ces aspects et des composés de type GRAS (Generally Recognized As Safe) sont préférables. Par ailleurs, en ce qui concerne les systèmes PLGA-protéine, il a été démontré que la stabilité des protéines pouvait être affectée par les interactions entre le PLGA et les protéines qui entraînent l'agrégation des protéines. De plus, dans ces systèmes, il faut prendre en compte le micro-environnement acide créé par la dégradation du polymère (production d'oligomères et résidus acides) qui peut également nuire à l'intégrité des protéines. Sur ces aspects, il a été montré qu'une co-encapsulation de protéines avec des additifs tels que polyethyleneglycol, poloxamers, ou des sels basiques (hydroxyde de magnésium, carbonate de magnésium,…) permettait d'améliorer la stabilité des protéines durant l'étape dégradation du polymère en réduisant les interactions protéine/matrice (adsorption) ou en réduisant l'acidification du micro-environnement [20].

Afin d'améliorer l'encapasulation des protéines, il semble également important de prendre en considération leur hydrophilicité. Cette caractéristique pourrait entraîner d'une part la perte de protéines par diffusion vers la phase dispersante lors des étapes de formulation et d'autre part accélérer la libération après mise en contact des particules avec un milieu receveur de type aqueux ou physiologique. Lors de l'étape de formulation, un ajustement du pH de la phase dispersante jusqu'à une valeur proche du pHi (point isoélectrique) de la protéine pourrait permettre de réduire la fuite de ces molécules. En revanche, cette solution ne peut pas être appliquée lors de l'étape de libération car le pH du milieu récepteur doit être proche de celui du milieu ciblé dans le corps humain (le pH choisi pour l'étude de libération est généralement 7.4). Les caractéristiques du polymère jouent donc un rôle important à ce niveau dans le contrôle de la vitesse de la libération. Ainsi, il a été observé que dans le cas du PLGA, la partie composée par

les monomères d'acide lactique augmentait l'hydrophobicité du polymère et retardait la libération. Afin de diminuer l'hydrophilicité des protéines, la « lipidization » semble être une approche intéressante. Cette modification chimique de la protéine, par conjugaison de molécule lipidique, a prouvé son utilité dans la technologie Alzamer Depot (voir II.1.3.3.2). Il existe aujourd'hui des approches chimiques prometteuse, telle que la technique REAL-Reversible Aqueous Lipidization, qui permet une conjugaison réversible entre la protéine et le lipide [21]. L'avantage de cette approche est que la protéine une fois libérée peut retrouver sa structure et conformation originale assurant ainsi l'activité biologique. Afin de prolonger la libération de la protéine dans le temps, nous pouvons mentionner également la co-encapsulation avec une molécule lipophile telle que le sucrose acetate isobutyrate SAIB [22].

Il est généralement observé que la corrélation des profils de libérations des protéines *in-vitro/in-vivo* n'est pas bonne pour les système à base de PLGA [23], ce qui complique le développement des systèmes et nécessite souvent une étude approfondie chez l'animal. Il n'est pas simple par ailleurs de développer des outils méthodologiques d'évaluation *in vitro* qui miment le comportement dans l'espace sous-cutané [24] d'autant plus que le mécanisme d'absorption des protéines dans la circulation systémique après une injection sous-cutanée n'est pas encore clair et dépend de plusieurs facteurs comme la taille ou la charge de la protéine [25, 26], ainsi que l'état physiologique du sujet [27]. Aucune procédure standardisée n'est actuellement mise en place, et les études *in-vivo* semblent donc indispensables pour évaluer l'action prolongée de ces systèmes. Les études *in-vitro,* quant à elles, restent utiles pour étudier la stabilité des protéines dans des milieux modèles afin de permettre aux galénistes d'obtenir les informations permettant de modifier qualitativement et quantitativement les formulations avec d'éventuels additifs.

Un autre verrou technologique et méthodologique dans le développement de ces systèmes à libération prolongée concerne le choix d'une méthode adaptée pour le dosage des protéines. Certaines méthodes de dosage des protéines totales sont validées mais elles ont souvent un seuil de détection trop élevé pour pouvoir être utilisé à toutes les étapes de caractérisation. En effet, un faible taux d'encapsulation de protéine est souvent visé dans le développement des systèmes thérapeutiques en raison de la forte activité biologique des protéines bioactives. Une approche de choix pour relever ce défi repose sur le radiomarquage et le suivi de l'activité radioactive. Cette approche validée au sein de notre unité serait utile pour les études ultérieures avec des protéines

thérapeutiques [28, 29]. Pourtant, ces méthodes ne permettent pas de fournir d'informations sur l'activité ou l'intégrité structurale des protéines. En ce qui concerne la quantification des protéines actives, il reste donc nécessaire de développer des méthodes qui n'ont pas d'influence sur la structure des protéines thérapeutiques, très sensibles à la présence de solvants, de la température, du pH,…et permettent d'avoir des informations sur l'intégrité structurale des protéines. Dans notre travail expérimental, une méthode de dosage basée sur l'utilisation de DMSO a été utilisée. Cette méthode est validée pour le dosage de l'activité du lysozyme avec un seuil de détection qui peut descendre jusqu'à 50 ng/ml. Il aurait été cependant intéressant de développer une deuxième méthode de dosage pour affiner nos résultats. Par exemple, une méthode basée sur la spectroscopie de masse MALDI-TOF a été développée avec succès [30] et aurait permis non seulement de déterminer le taux d'encapsulation dans nos systèmes et également d'évaluer l'intégrité des protéines. Cependant cette technique est relativement lourde à mettre en place et nécessite des compétences particulières.

***Formes galéniques finales:**

En dehors du développement d'une suspension pour des injections sous-cutanées permettant une activité systémique prolongée, notre projet de thèse s'inscrivait également dans une approche où nous souhaitons combiner nos systèmes particulaires avec des dispositifs de type hydrogel implantables. Combinés à des cellules, ces systèmes ont montré leur intérêt en médecine régénérative, notamment pour l'ingénierie tissulaire de l'os ou du cartilage. Dans ce cas, le choix des protéines s'oriente vers des facteurs de croissance, qui, libérés dans la matrice d'hydrogel contenant les cellules, exerceront une action sur le recrutement, la différenciation ou la survie et prolifération des cellules. On peut espérer ainsi favoriser la formation de néo-tissus. La figure V.6 résume les perspectives d'applications et les chemins décisionnels proposés en utilisant des particules de PLGA en cours de développement et avec différentes formes galéniques. Par exemple dans le projet concernant l'ingénierie tissulaire, l'effort est concentré sur l'encapsulation d'une protéine de type TGFI-β1 (Transforming Growth Factor) dans les particules de PLGA ; celles-ci seront ensuite incorporées dans un système d'hydrogel construit à partir d'hydroxypropylmethyl cellulose silanisé (Si-HPMC)[31]. Dans un autre projet, les particules de PLGA pourraient être utilisées dans le but d'encapsuler l'érythropoïétine – une protéine qui est utilisée dans le traitement de l'anémie liée à l'insuffisance rénale ou à la chimiothérapie. Dans le

cas où le profil de libération *in-vivo* d'une protéine à partir des particules de PLGA après une injection sous-cutanée s'avèrerait trop court pour ce type d'application spécifique, une éventuelle association des particules chargées en protéine avec une solution de Regel® (voir II.1.3.2) ou avec une solution de Lutrol F127 [32] pourrait être mise en place. Cette solution, liquide à la température ambiante, possède une propriété de gélification in-situ à la température physiologique, ce qui pourrait permettre d'adapter la libération des protéines avec la réponse biologique souhaitée.

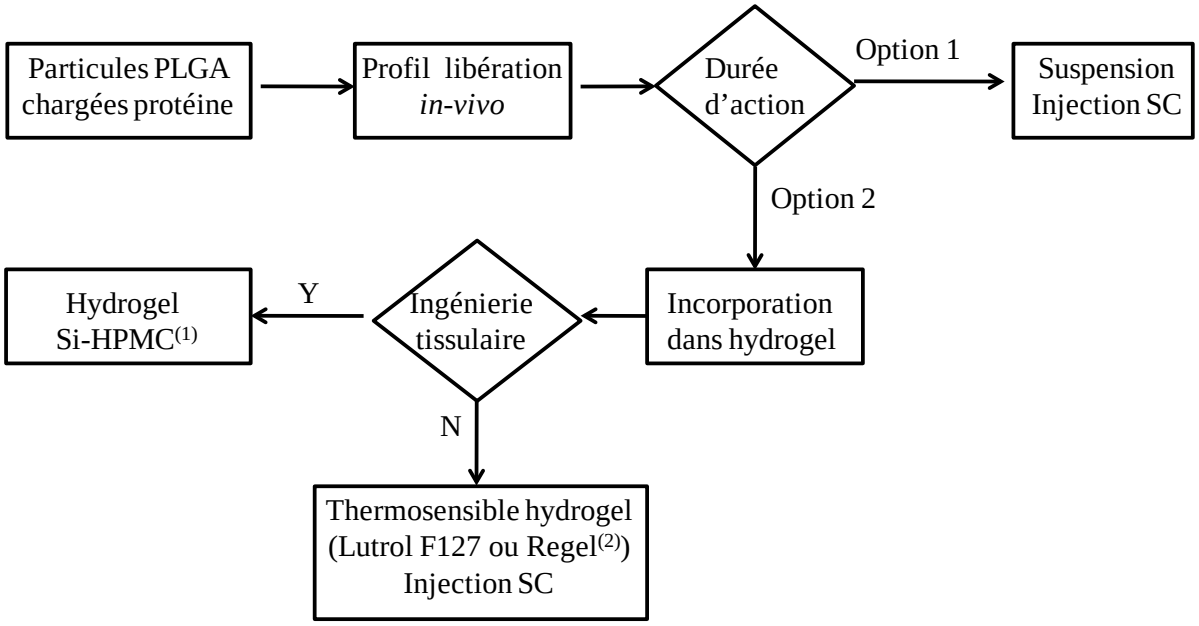


Figure V. 6: Formes galéniques visées concernant les particules de PLGA chargées de protéine. (1) hydroxypropylmethyl cellulose silanisé Si-HPMC, (2) Regel : PLGA-PEG-PLGA (voir II.1.3.2).

REFERENCES :

[1] C. Thomasin, H. Nam-Trân, H.P. Merkle, B. Gander, Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 1. Overview and theoretical considerations, Journal of Pharmaceutical Sciences, 87 (1998) 259-268.

[2] B. Gander, H.P. Merkle, V.P. Nguyen, N.-T. Ho, A New Thermodynamic Model To Predict Protein Encapsulation Efficiency in Poly(lactide) Microspheres, The Journal of Physical Chemistry, 99 (1995) 16144-16148.

[3] H. Nam-Tran, A New Model for Evaluating Interactions in Liquids, The Journal of Physical Chemistry, 98 (1994) 5362-5367.

[4] R.S. Drago, G.C. Vogel, Interpretation of spectroscopic changes upon adduct formation and their use to determine electrostatic and covalent (E and C) parameters, Journal of the American Chemical Society, 114 (1992) 9527-9532.

[5] J. Li, M. Rodrigues, A. Paiva, H.A. Matos, E.G. de Azevedo, Vapor–liquid equilibria and volume expansion of the tetrahydrofuran/CO2 system: Application to a SAS-atomization process, The Journal of Supercritical Fluids, 41 (2007) 343-351.

[6] S.N. Joung, C.W. Yoo, H.Y. Shin, S.Y. Kim, K.-P. Yoo, C.S. Lee, W.S. Huh, Measurements and correlation of high-pressure VLE of binary CO2–alcohol systems (methanol, ethanol, 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol), Fluid Phase Equilibria, 185 (2001) 219-230.

[7] M.S. Shannon, J.M. Tedstone, S.P.O. Danielsen, M.S. Hindman, A.C. Irvin, J.E. Bara, Free Volume as the Basis of Gas Solubility and Selectivity in Imidazolium-Based Ionic Liquids, Industrial & Engineering Chemistry Research, 51 (2012) 5565-5576.

[8] A. Klamt, COSMO-RS: From Quantum Chemistry to Fluid PhaseThermodynamics and Drug Design, Elsevier Science, 2005.

[9] B. Calvignac, E. Rodier, J.-J. Letourneau, P. Vitoux, C. Aymonier, J. Fages, Development of an improved falling ball viscometer for high-pressure measurements with supercritical CO2, The Journal of Supercritical Fluids, 55 (2010) 96-106.

[10] A. Favrelle, C. Boyère, M.K. Tran, D. Alaimo, B. Calvignac, M. Paquot, F. Boury, C. Jérôme, A. Debuigne, Surface activity of a fluorinated carbohydrate ester in water/carbon dioxide emulsions, Journal of Colloid and Interface Science, 398 (2013) 273-275.

[11] B.-S. Chun, G.T. Wilkinson, Interfacial tension in high-pressure carbon dioxide mixtures, Industrial & Engineering Chemistry Research, 34 (1995) 4371-4377.

[12] X.M. Lam, E.T. Duenas, J.L. Cleland, Encapsulation and stabilization of nerve growth factor into poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres, Journal of Pharmaceutical Sciences, 90 (2001) 1356-1365.

[13] P. Johansen, Y. Men, R. Audran, G. Corradin, H. Merkle, B. Gander, Improving Stability and Release Kinetics of Microencapsulated Tetanus Toxoid by Co-Encapsulation of Additives, Pharmaceutical Research, 15 (1998) 1103-1110.

[14] G.D. Rosa, R. Iommelli, M.I. La Rotonda, A. Miro, F. Quaglia, Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres, Journal of Controlled Release, 69 (2000) 283-295.

[15] Y. Kwon, M. Baudys, K. Knutson, S. Kim, In Situ Study of Insulin Aggregation Induced by Water-Organic Solvent Interface, Pharmaceutical Research, 18 (2001) 1754-1759.

[16] R.S. Raghuvanshi, S. Goyal, O. Singh, A.K. Panda, Stabilization of Dichloromethane-Induced Protein Denaturation During Microencapsulation, Pharmaceutical Development and Technology, 3 (1998) 269-276.

[17] A.-C. Chang, R.K. Gupta, Stabilization of tetanus toxoid in poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen, Journal of Pharmaceutical Sciences, 85 (1996) 129-132.

[18] I.J. Castellanos, R. Crespo, K. Griebenow, Poly(ethylene glycol) as stabilizer and emulsifying agent: a novel stabilization approach preventing aggregation and inactivation of proteins upon encapsulation in bioerodible polyester microspheres, Journal of Controlled Release, 88 (2003) 135-145.

[19] M. van de Weert, J. Hoechstetter, W.E. Hennink, D.J.A. Crommelin, The effect of a water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme, Journal of Controlled Release, 68 (2000) 351-359.

[20] U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 59 (2005) 375-388.

[21] J.L. Zaro, W.-C. Shen, J. Wang, Modifying the Physicochemical Nature of Biodrugs by Reversible Lipidization, in: Biodrug Delivery Systems: Fundamentals, Applications, and Clinical Development, pp. 309-322.

[22] E.S. Lee, M.J. Kwon, H. Lee, K. Na, J.J. Kim, In vitro study of lysozyme in poly(lactide-co-glycolide) microspheres with sucrose acetate isobutyrate, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 29 (2006) 435-441.

[23] G. Jiang, B.H. Woo, F. Kang, J. Singh, P.P. DeLuca, Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres, Journal of Controlled Release, 79 (2002) 137-145.

[24] Y. Wang, D. Burgess, Microsphere Technologies, in: J.C. Wright, D.J. Burgess (Eds.) Long Acting Injections and Implants, Springer US, 2012, pp. 167-194.

[25] C.J.H. Porter, G.A. Edwards, S.A. Charman, Lymphatic transport of proteins after s.c. injection: implications of animal model selection, Advanced Drug Delivery Reviews, 50 (2001) 157-171.

[26] M.A. Swartz, The physiology of the lymphatic system, Advanced Drug Delivery Reviews, 50 (2001) 3-20.

[27] W. Wang, N. Chen, X. Shen, P. Cunningham, S. Fauty, K. Michel, B. Wang, X. Hong, C. Adreani, C.N. Nunes, C.V. Johnson, K.-c. Yin, M. Groff, Y. Zou, L. Liu, L. Hamuro, T. Prueksaritanont, Lymphatic Transport and Catabolism of Therapeutic Proteins after Subcutaneous Administration to Rats and Dogs, Drug Metabolism and Disposition, 40 (2012) 952-962.

[28] A. Aubert-Pouëssel, M.-C. Venier-Julienne, A. Clavreul, M. Sergent, C. Jollivet, C.N. Montero-Menei, E. Garcion, D.C. Bibby, P. Menei, J.-P. Benoit, In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres, Journal of Controlled Release, 95 (2004) 463-475.

[29] A. Giteau, M.-C. Venier-Julienne, S. Marchal, J.-L. Courthaudon, M. Sergent, C. Montero-Menei, J.-M. Verdier, J.-P. Benoit, Reversible protein precipitation to ensure stability during encapsulation within PLGA microspheres, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 70 (2008) 127-136.

[30] U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues, AAPS PharmSciTech, 6 (2005) E594-E604.

[31] P. Weiss, A. Fatimi, J. Guicheux, C. Vinatier, Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering, in: R.M. Ottenbrite, K. Park, T. Okano (Eds.) Biomedical Applications of Hydrogels Handbook, Springer New York, 2010, pp. 247-268.

[32] Y.M. Kwon, S.W. KIM, Thermosensitive Biodegradable Hydrogels for the Delivery of Therapeutic Agents, in: G.S. Kwon (Ed.) Polymeric Drug Delivery Systems, Taylor & Francis Group, 2005.

VI .CONCLUSION & PERSPECTIVES

VI.1 .CONCLUSION :

Ce travail avait pour but d'élaborer de nouveaux procédés de formulation de particules polymériques de PLGA appliqués à l'encapsulation de protéines thérapeutiques. Ces procédés devraient permettre de se substituer aux méthodes « classiques » pour lesquelles des solvants volatiles toxiques (dichlorométhane, acétone,…) sont utilisés. Au cours de ce travail, nous avons développé des procédés avec des solvants injectables non-volatiles et peu-toxiques, tels que le glycofurol et l'isosorbide dimethyl ether (DMI). Ces procédés de formulation sont basés soit sur un mécanisme de séparation de phase, soit sur le principe de la méthode d'émulsification/ extraction de solvant. Le procédé de séparation de phase peut être réalisé en condition atmosphérique tandis que la méthode d'émulsification/extraction de solvant a été développée en utilisant le CO_2 pressurisé comme phase dispersante (procédé présenté dans le chapitre 1) ou comme un agent permettant de modifier les propriétés physicochimiques de la phase dispersée (procédé présenté dans le chapitre 2 et 3). En ce qui concerne la méthode d'émulsification/ extraction , le caractère non-polaire du CO_2 a été exploité afin de développer les procédés de formulation de PLGA dans lesquels ces solvants injectables, miscibles avec l'eau ont été utilisés pour solubiliser le PLGA. Dans le procédé présenté dans le chapitre 1, nous avons cherché à former une émulsion entre la solution de polymère et le CO_2 pressurisé. Il a été observé que la présence de l'éthanol favorisait l'émulsification entre ces deux phases. En ce qui concerne le procédé présenté dans le chapitre 2 et 3, nous avons cherché à former une émulsion entre la solution de PLGA dans le DMI et une phase aqueuse tirant profit de la grande solubilité du CO_2 dans le DMI. La solubilité du CO_2 dans le DMI a été modélisée en utilisant deux approches: l'une basée sur une équation d'état (Peng-Robinson) et l'autre basée sur un modèle mathématique construit à partir de la technique de réseaux de neurones.

Différents types de particules de taille variant de 300 nm à 30 µm ont pu être générés par ces procédés et pourront être utiles dans plusieurs applications. Les protéines modèles ont été encapsulées dans les particules de PLGA préparées par ces procédés. Le rendement d'encapsulation de protéines était assez satisfaisant (65-80%, en fonction de la protéine utilisée) et ce résultat pourrait être amélioré pour chaque protéine spécifique en jouant sur les conditions opératoires (par exemple, ajuster le pH de la phase dispersant, cf. partie "Discussions générales").

Au cours de ce travail, différentes étapes dans le processus du développement d'un système à libération prolongée pour les protéines ont été réalisées : la formulation de particules de PLGA, l'encapsulation d'une protéine modèle, la mise en évidence du mécanisme de formation de particules, et la libération *in-vitro* de protéines modèles. Ce travail servira de base aux futures études qui complèteront le développement de ces systèmes, telles que des études chez l'animal.

VI.2 .PERSPECTIVES :

-Afin de compléter ce travail, il serait nécessaire de planifier des études *in-vivo*. Pour ce faire, il faudrait tout d'abord appliquer les procédés à une protéine modèle ayant un effet pharmacologique. Des études d'encapsulation et de libération *in-vitro* de l'insuline, une protéine endogène ayant un effet pharmacologique sur la glycémie, constituent des résultats préliminaires. (Annexe 5). Des études *in-vivo* pourraient ensuite être planifiées sur un modèle animal de rats diabétiques afin de déterminer les performances biopharmaceutiques (pharmacocinétiques et pharmacodynamiques , PK/PD) de nos systèmes.

-Les mesures d'équilibre de phase en milieu CO_2 pressurisé ont permis de mettre au point le procédé « Modified-PGSS » mais pourraient servir également au développement d'autres procédés, par exemple, un procédé dans lequel le CO_2 jouerait le rôle d'anti-solvant (SAS). Un schéma simplifié de cette approche est montré dans la Figure 7.

-En raison des contraintes règlementaires de plus en plus strictes, la recherche par voie de synthèse chimique de solvants de moins en moins toxiques est très active. On peut citer par exemple les travaux en lien avec des liquides ioniques. Dans notre cas, il serait intéressant de développer des solvants non-volatiles, peu toxiques et capables de solubiliser le PLGA. Avec l'aide de nouveaux outils de prédiction, il est possible, à partir de la structure chimique d'une molécule, de prédire non seulement ses propriétés physicochimiques (Aspen Plus, Spartan, COSMOtherm,…) mais également sa toxicité pour les êtres vivants et l'environnement (ADMT Predictor, Opentox,…). Ces outils sont développés en se basant sur la chimie quantique, la méthode de contribution de groupe,…Il semble ainsi possible de prédire à partir de la structure d'un solvant, ses paramètres de solubilité, son comportement en milieu CO_2 (équilibre liquide-

vapeur), sa toxicité, etc… Ces informations permettraient d'effectuer un criblage préliminaire des solvants qui pourraient être adaptés aux procédés développées dans ce travail.

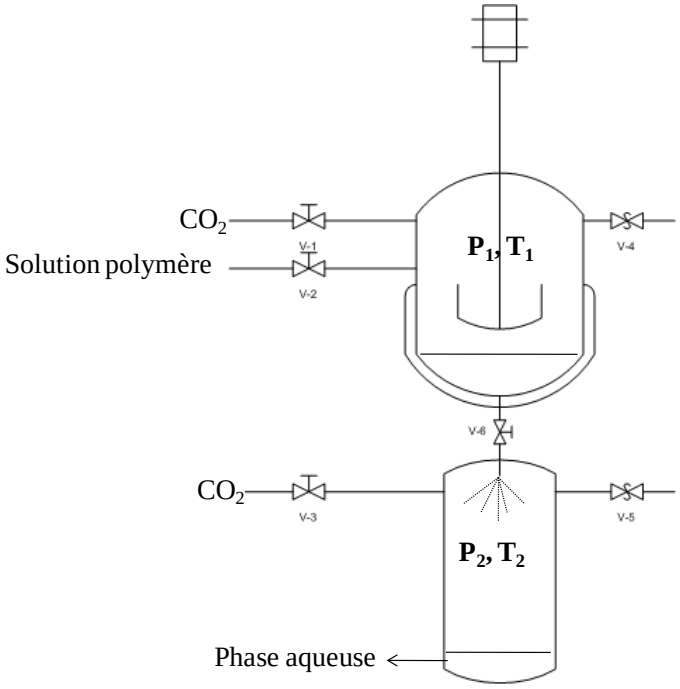


Figure: Schéma d'un procédé anti-solvant. $P_1>P_2$, $T_1>T_2$, solubilité du CO_2 dans le DMI : $S_{P1,T1} > S_{P2,T2}$ (V_4, V_5 : régulateurs de pression).

ANNEXES

ANNEXE 1 : Modélisation de la solubilité du CO_2 dans le DMI

Dans ce travail, la modélisation a été réalisée en utilisant la technique de réseaux de neurones[1]. Cette technique consiste à combiner des fonctions non-linéaires simples (par exemple, la fonction tangente hyperbolique ou la fonction sigmoïde) pour approximer une fonction inconnue. La performance de différentes topologies (MLP-« multi-layer perceptron », « GFF-generalized-feed-forward », «RBF- radial basis function ») a été testée avec la même série de données qui avait été randomisée de la même façon dans ce travail. D'autre part, les données de solubilité du DMI dans le CO_2 à différentes conditions de pression et température ont été divisées en 3 ensembles : un ensemble d'apprentissage, un ensemble de validation et un ensemble de test. Le principe général de ce travail de modélisation était de trouver un modèle en se basant sur les données de l'ensemble d'apprentissage puis de tester son aptitude à être généralisé grâce aux données de l'ensemble de validation ; finalement, la performance du modèle est évaluée avec les données de l'ensemble de test. Dans notre cas, il s'est avéré que la topologie « multi-layer perceptron » nous a fourni le meilleur résultat.

Tableau 1: performance de différentes topologies.

Topology	Training			Cross-Validation			Testing		
	MSE	R	MAE	MSE	r	MAE	MSE	r	MAE
MLP	18.07	0.988	3.16	8.76	0.981	2.59	31.96	0.996	3.975
RBF	48.62	0.955	5.22	213.11	-0.63	13.19	161.53	0.956	10.424
GFF	15.64	0.988	3.33	17.01	0.925	3.26	32.93	0.991	3.049

MSE : écart relative moyen ; MAE : écart absolu moyen.

$$Ecart\ absolu\ moyen = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\left|y_{cal} - y_{exp}\right|$$

$$Ecart\ relatif\ moyen\ (\%) = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\frac{\left|y_{cal} - y_{exp}\right|}{y_{exp}} \times 100$$

La topologie MLP- "Multi-layer-Perceptron" a été choisie pour modéliser la solubilité du CO_2 dans le DMI. Les résultats ont été affinés en utilisant la technique « Leave-N-out » (article 3).

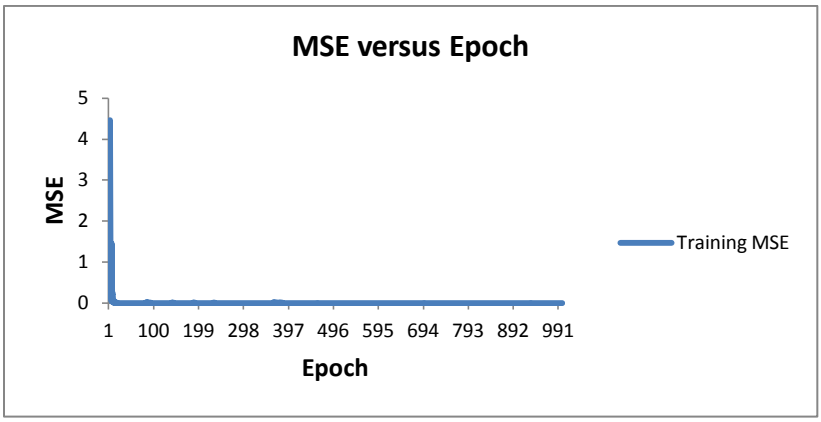


Figure 1: Le process d'apprentissage.

Tableau 2: Performance finale de la topologie MLP améliorée par la technique «Leave-N-out»

Performance	***%solubility***
MSE	6,693317983
NMSE	0,023920289
MAE	1,782018536
Min Abs Error	0,272170592
Max Abs Error	5,468860177

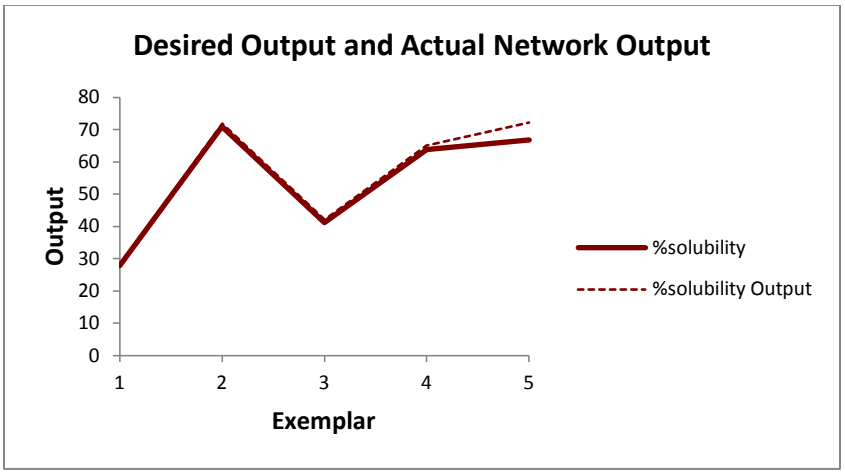


Figure 2: Résultat sur l'ensemble de test.

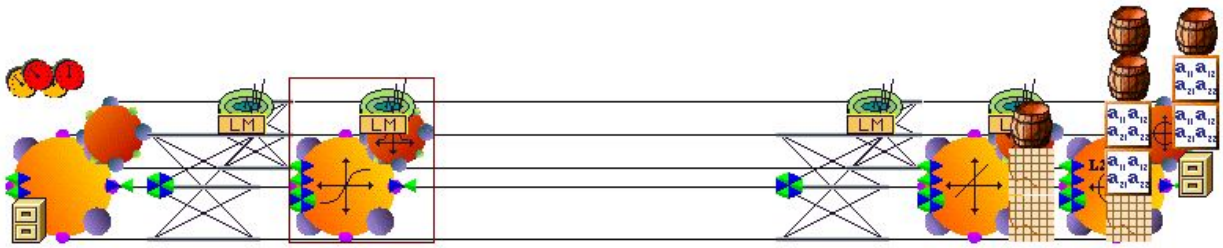


Figure 3: Topologie de MLP- Multi-layer-Perceptron dans cette étude (1 couche de neurones cachées avec 3 éléments de process, fonction : tanh, algorithme d'apprentissage : Levenberg-Marquardt)

[1] Gérard Dreyfus, Jean-Marc Martinez, Manuel Samuelides, Mirta B. Gordon, Fouad Badran, S. Thiria, Apprentissage statistique: Réseaux de neurones - Cartes topologiques - Machines à vecteurs supports, in, Eyrolles, 2011, pp. 450.

ANNEXE 2 : Paramètres physicochimiques des solvants et du PLGA

Tableau 1: Paramètres de solubilité de différents types de PLGA [2]

Type de polymère	Pourcentage de monomères (%)		Paramètre de solubilité $MPa^{1/2}$				
	LA	GA	δ_d	δ_p	δ_h	δ_{total}	R
PLA	100	0	17.4	7.6	20.5	21.7	8.4
PLGA (85/15)	85	15	17.4	8.3	9.9	21.7	8.0
PLGA (75/25)	75	25	17.4	8.	9.9	21.7	7.8
PLGA (50/50)	50	50	17.4	9.1	10.5	22.3	7.5

Tableau 2 : Paramètre de solubilité de Hansen des solvants miscibles dans l'eau [3]

Solvant	Abréviation	Densité (g/ml)	Viscosité (mPa s)		Paramètre de solubilité ($MPa^{1/2}$)			
			25°C	37°C	δ_d	δ_p	δ_h	δ_t
Dimethylsulfoxide	DMSO	1.100	1.88	1.40	20.4	7.3	8.0	23.1
N-methyl 2-pyrrolidone	NMP	1.032	1.83	1.33	18.0	8.1	5.9	20.6
1,2-Dimethoxyethane	DME	0.867	0.49	0.45	17.8	7.9	9.6	21.7
Diethylene glycol dimethylether	Diglyme	0.943	1.05	0.93	18.7	8.7	10.1	23.0
Glycofurol	Glycofurol	1.085	12.95	8.87	19.1	5.9	13.4	24.0
Dimethylisosorbide	DMI	1.167	5.96	4.26	22.5	12.2	12.0	28.3
Ethyl lactate	EtL	1.034	2.33	1.81	21.2	7.3	15.0	27.5
DLα,β-isopropylidene-glycerol	Solketal	1.066	8.28	5.60	16.2	5.0	13.4	21.6
Tetrahydro furfurul alcohol	THFA	1.053	5.41	3.65	19.3	6.9	16.2	26.1

Glycerolformal	GF	1.218	9.65	6.43	20.9	10.3	17.6	29.2
Ethanol	EtOH	0.790	1.43	1.19	15.3	8.5	18.2	25.3
Eau	–	1.000	0.89	0.69	12.2	22.8	40.4	48.0

Table 3: Quelques paramètres physicochimiques du GF et du DMI calculés par Spartan (Wavefunction InC, US)

Solvants	Energie libre de solvatation (kcal/mol)	Moment dipolaire (Debye)
DMI	-8.546	2.49
GF	-10.040	4.36

[2] S. Schenderlein, M. Lück, B.W. Müller, Partial solubility parameters of poly(d,l-lactide-co-glycolide), International Journal of Pharmaceutics, 286 (2004) 19-26.
[3] F. Mottu, P. Gailloud, D. Massuelle, D.A. Rüfenacht, E. Doelker, In vitro assessment of new embolic liquids prepared from preformed polymers and water-miscible solvents for aneurysm treatment, Biomaterials, 21 (2000) 803-811.

ANNEXE 3 : Tension interfaciale du système H_2O+ethanol -CO_2

Tableeau 1: Tension interfaciale du système H_2O+ethanol -CO_2 [4]

Pression (MPa)	γ (mN/m) en fonction de la fraction molaire d'éthanol				
	0	0.096	0.184	0.336	0.523
0.10	69.66	54.95	47.99	37.91	32.97
2.07	60.38	47.84	40.87	32.54	27.64
3.45	52.19				
4.14	48.95	40.02	33.57	26.30	21.77
6.20	40.86	32.51		20.93	16.10
6.89	37.21		24.62		
7.58	35.79	26.74		15.26	11.04
7.93	31.55	18.98	14.43	10.65	7.51
8.27	20.97	17.36		9.47	6.50
8.62	18.27	17.26		8.89	6.04

[4] B.-S. Chun, G.T. Wilkinson, Interfacial tension in high-pressure carbon dioxide mixtures, Industrial & Engineering Chemistry Research, 34 (1995) 4371-4377.

ANNEXE 4 : Stabilité du Lysozyme dans le milieu de libération

Dans le but d'étudier la stabilité du lysozyme dans un milieu de libération, l'activité de cette protéine a été mesurée dans le milieu de libération. Les valeurs présentées dans le Tableau concernent le pourcentage du lysozyme restant actif.

Tableau 1: Evaluation de l'intégrité du lysozyme dans un milieu de libération.

Concentration / Tampons	0.033 µg/ml			0.4 µg/ml			4 µg/ml		
	2h	6h	24h	2h	6h	24h	2h	6h	24h
Tris	40	23.6	23.6	26.66	24.83	18.33	100	92.33	42.67
Tris_BSA 0.1%	104	100	100	100	100	100	100	100	100
Tris lutrol 0.1%	100	96	92	98.33	98.33	98.33	100	98.3	100
Tris lutrol 0.015%	96	92	80	100	98.33	96.67	103	100	97.83
DPBS	104	32	9.44	50	16.67	0	100	100	100
DPBS_BSA 0.1%	92	90	96	96.67	97.83	100	98.83	100	100
DPBS lutrol 0.1%	100	100	100	100	100	100	100	100	100
DPBS lutrol 0.015%	98.4	92	88.89	98.83	100	95	100	100	100

<u>ANNEXE 5 :</u> Etude préliminaire sur l'encapsulation de l'insuline dans les particules de PLGA par la méthode « Modified-PGSS »

*Préparation des précipités d'insuline :

0.9 mg de l'insuline est dissout dans 90 µl de la solution de NaCl 0.3 M dans l'acide hydrochlorique 0.1 M. En ajoutant au mélange 910 µl de DMI, les nanoprécipités sont obtenus (rendement d'activité dosé par ELISA : 100%). La taille des précipités est d'environ 500-600 nm.

*Rendement d'encapsulation : 75-80% (dosé par la méthode microBCA et Fluoro Profile). Le protocole de dosage selon la méthode Fluoro Profile est fourni par le fournisseur Sigma-Aldrich (Catalog number FP0010). L'observation sous microscope confocale des particules PLGA chargées d'insuline-FITC a été aussi réalisée (chapitre 3).

*Profil de libération :

La quantité d'insuline libérée a été quantifiée en utilisant la méthode Fluoro Profile. L'avantage de cette méthode par rapport à la méthode microBCA est l'absence d'interférence avec des agents de surface dans le milieu de libération (Lutrol F68, Lutrol F127).

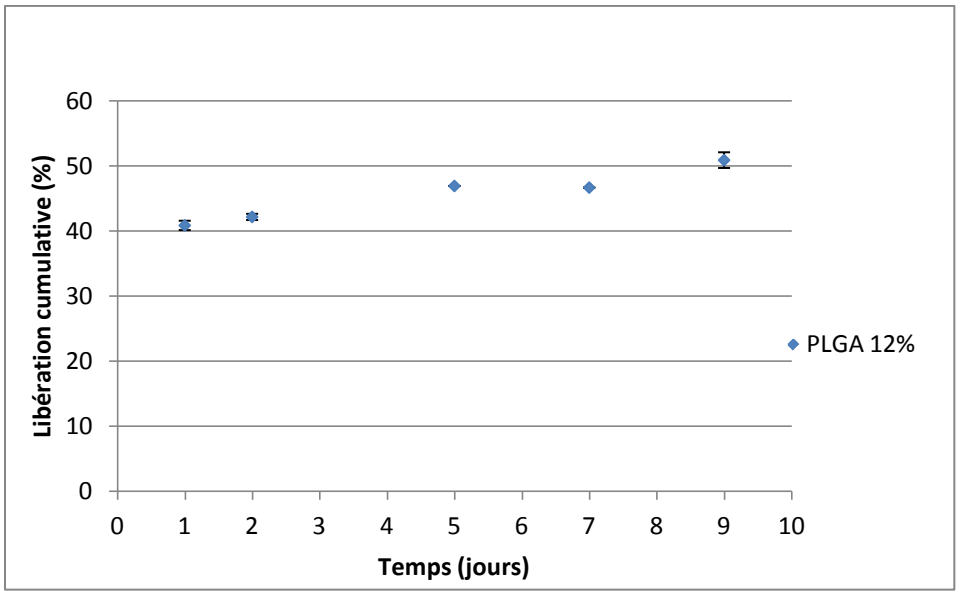


Figure 1: Liberation *in-vitro* de l'insuline au cours du temps.

Journal of Colloid and Interface Science 398 (2013) 273–275

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

www.elsevier.com/locate/jcis

Short Communication

Surface activity of a fluorinated carbohydrate ester in water/carbon dioxide emulsions

Audrey Favrelle [a], Cédric Boyère [a], Kien My Tran [b], David Alaimo [a], Brice Calvignac [b], Michel Paquot [c], Frank Boury [b], Christine Jérôme [a], Antoine Debuigne [a,*]

[a] Center for Education and Research on Macromolecules (CERM), Chemistry Department, University of Liege (ULg), Sart-Tilman, Allée de la Chimie 3, Bat. B6a, B-4000 Liege, Belgium
[b] LUNAM Université, UMR S-1066, Micro-Nanomédecines Biomimétiques, IBS Institut de Biologie en Santé, Bâtiment IRIS, 4 rue Larrey, F-49933 Angers, France
[c] Unit of Biological and Industrial Chemistry, University of Liege, Gembloux Agro-Bio Tech, Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 December 2012
Accepted 8 February 2013
Available online 26 February 2013

Keywords:
Fluorinated glycosurfactant
Water/carbon dioxide interface
Pendant drop tensiometry
Emulsification

ABSTRACT

The water/carbon dioxide (W/CO_2) interfacial activity and emulsifying capacity of hydrocarbon and fluorinated carbohydrate esters are investigated of the first time and compared to the performance of sodium-bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT). The reduction of the W/CO_2 interfacial tension was measured using a pendant drop tensiometer equipped with a cell view pressurized with CO_2 at 80 bar and 45 °C. It was found that the interface stabilization improved in the order AOT < 6-*O*-myristoyl mannose < 6-*O*-(2H,2H,3H,3H-perfluoroundecanoyl)-D-mannose. In the latter case, a drastic reduction of the W/CO_2 interfacial tension was observed (85% reduction, interfacial tension at the equilibrium = 3.6 mN/m), which emphasizes the advantage of using a fluorinated CO_2-philic tail and the potential of sugars as hydrophilic head. The formulation of stable W/CO_2 emulsions was also achieved using the fluorinated mannose derivative. This study paves the way to the design of a novel class of competitive surface active agents for W/CO_2 emulsions.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

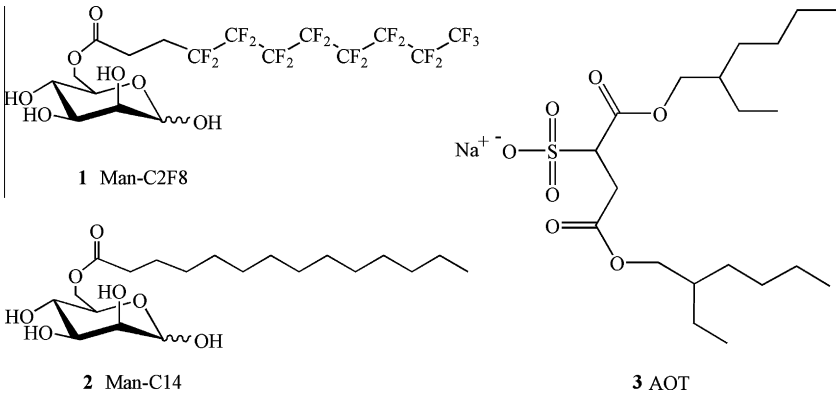
Emulsions are usually implemented from water/organic solvent mixtures but today supercritical carbon dioxide ($scCO_2$) constitutes a valuable alternative to the traditional organic solvents because it is environmentally friendlier, non-toxic, inexpensive, non-inflammable and its critical conditions can readily be achieved (P_c = 73.8 - bar; T_c = 31.1 °C) [1]. Such water/carbon dioxide (W/CO_2) emulsions notably allow to involve polar substances, previously excluded from the $scCO_2$ technology due to their poor solubility in CO_2, and serve as templates for polymerization reactions leading to highly interconnected porous matrices [2]. In this case, specific surface active agents are required for the stabilization of the W/CO_2 interface [3,4]. Some aliphatic chains were used as the CO_2-philic tail [5–9] but the later more often consists in a fluorinated carbon chain which interacts favorably with the quadrupole of CO_2 [9–12]. Although numerous surfactants with a charged hydrophilic head proved their efficiency to stabilize the W/CO_2 interface [7–13], the search for nonionic candidates remains attractive because their electrical neutrality imparts a lower sensitivity to the presence of electrolytes in water [14,15].

Here, an important class of neutral surfactants, i.e. carbohydrate esters, which are currently used as detergents and emulsifiers in pharmaceutical, cosmetic and food industries [16,17], was adapted for the stabilization of the W/CO_2 interface. In this respect, we substituted the usual hydrocarbon tail of glycosurfactants for a fluorinated one, following a previously reported enzymatic procedure [18]. The W/CO_2 surface activity and emulsifying power of the resulting fluorinated mannose **1** (6-*O*-(2H,2H,3H,3H-perfluoroundecanoyl)-D-mannose, Man-C2F8) were evaluated and compared to those of the hydrocarbonated analogue **2** (6-*O*-myristoyl mannose, Man-C14) (see Scheme 1). Finally, in order to calibrate this novel class of glycosurfactants, the interfacial tension of sodium-*bis*(2-ethylhexyl)sulfosuccinate **3** (AOT), a commercially available and commonly used compound already well-known to lower the W/CO_2 surface tension [7], has also been measured under the same pressure and temperature conditions.

First, we examined the behavior of the fluorinated mannose **1** in $scCO_2$ and in water. Even after a prolonged equilibration time (24 h), most of the Man-C2F8 remained insoluble in CO_2 at 300 bar and 45 °C. Nevertheless, the medium became cloudy when depressurized at 190 bar, which confirms the partial solubility of **1** in CO_2 above this pressure (Fig. S1). On the other hand, clear aqueous solutions of **1** (0.1–1.0 mM) could not be obtained by simple addition of water, which is consistent with the previously measured critical aggregation concentration (CAC = 0.02 mM) [18]. In order to incorporate significant amount of Man-C2F8 in water (1.0 mM), the surfactant was dissolved in acetone prior addition of water and the solution was stirred in open air in order to evaporate traces of

* Corresponding author. Fax: +32 4 366 34 97.
E-mail address: adebuigne@ulg.ac.be (A. Debuigne).

0021-9797/$ - see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2013.02.023



Scheme 1.

acetone. Transmission electron microscopy (TEM) (Fig. S2) and dynamic light scattering (DLS) analyses of the Man-C2F8 aqueous solution showed the presence of spherical aggregates (average hydrodynamic diameter = 72.8 nm, polydispersity = 0.188).

Next, the Man-C2F8 aqueous solutions prepared above were exposed to CO_2 in order to assess the W/CO_2 surface activity of this surfactant by the pendant drop tensiometry technique. Surface tension (γ) was determined by analyzing the axial symmetric shape of a drop of an aqueous solution generated in a visualization cell which is pressurized with CO_2 at 80 bar and heated at 45 °C. As a reference, a drop of ultrapure water was created in $scCO_2$ and we observed a decrease of γ to 22 mN/m (see red line in Fig. 1), in agreement with previous reports [19,20]. The adsorption kinetics were then performed at the same pressure and temperature for the Man-C2F8 solutions for a concentration range from 10^{-6} to 10^{-3} M (Fig. 1). At 0.5×10^{-4} M in water, **1** considerably lowers γ (5.9 mN/m). A faster and better stabilization of the W/CO_2 interface was obtained when the concentration of **1** was further increased (0.5×10^{-3} M); the γ value dropped to 3.6 mN/m in less than 90 s.

Then, we showed that the aliphatic carbohydrate analogue **2** (Man-C14) has a lower surface activity at the W/CO_2 interface (Fig. 2, γ_{W/CO_2} = 4.8 mN/m at 45 °C and 80 bar) compared to **1**, which emphasizes the beneficial effect of the perfluorinated CO_2-philic tail. The same trend was previously reported for a series of hydrocarbonated and fluorinated AOT derivatives [7]. Additionally, we found that the AOT **3** only decreased the γ_{W/CO_2} to 6.2 mN/m at 80 bar and 45 °C. On this basis, the higher surface activity of the hydrocarbonated Man-C14 **2** as compared to the hydrocarbonated AOT **3** confirms the effectiveness of mannose as polar head and its advantage over the ionic sulfosuccinate group.

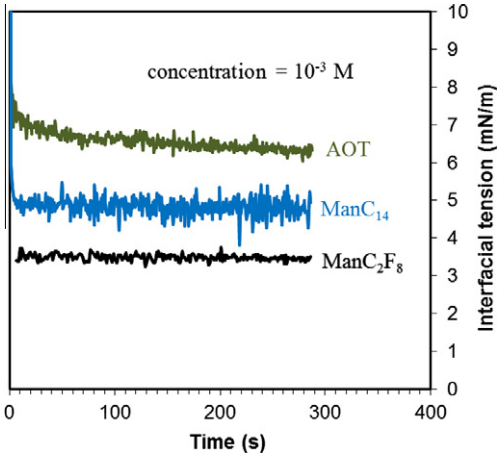


Fig. 2. W/CO_2 interfacial tension kinetics measured at 45 °C and 80 bar for Man-C2F8, Man-C14 and AOT at a 10^{-3} M concentration.

Finally, W/CO_2 emulsification experiments were performed at 45 °C in a 62 mL reactor equipped with aligned sapphire windows allowing the observation of the medium (Fig. 3). The aqueous phase containing 5 wt.% of Man-C2F8 was colored in red with amaranth dye in order to visualize the emulsification phenomenon and

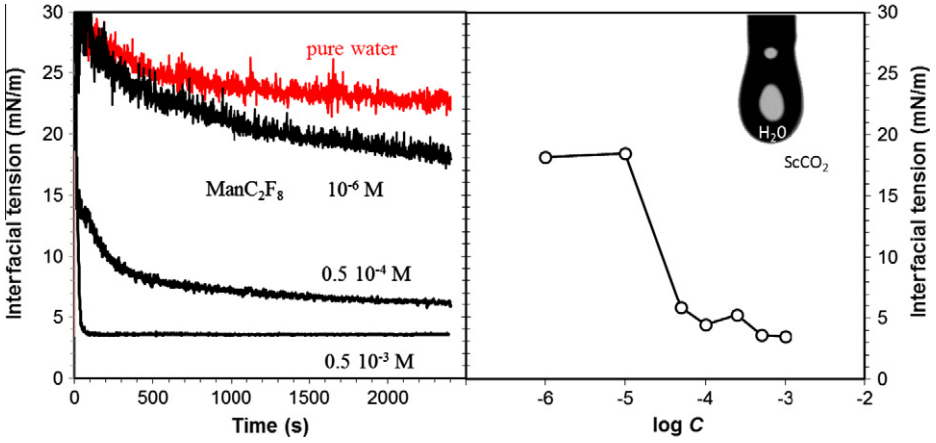


Fig. 1. Dependence of the W/CO_2 interfacial tension with the time (left) and the concentration (right) of Man-C2F8 at 80 bar and 45 °C. γ Values used for the plot on the right were recorded after 2400 s. The inset depicts a typical drop-shape tensiometry image ($C = 0.5 \times 10^{-3}$ M).

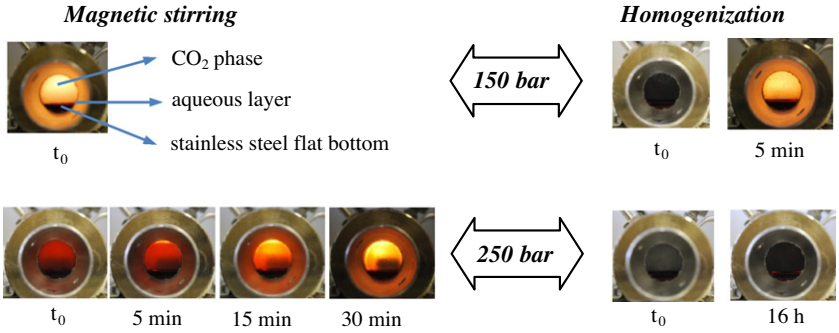


Fig. 3. W/CO_2 emulsification (V_{H_2O}/V_{CO_2} = 1/9) in the presence of Man-C2F8 (5 wt.% in water) at 45 °C. The aqueous phase is colored in red by amaranth. The medium was mixed for 15 min either by magnetic stirring or by means of a high-pressure homogenizer. t_0 Corresponds to the moment when the mixing is stopped. The dark lower part of the reactor corresponds to the flat stainless steel bottom of the cylindrical visualization cell.

the water/scCO_2 volume ratio was fixed at 1/9. After pressurization with CO_2, the medium was mixed either by magnetic stirring or by using a high-pressure homogenizer. At 150 bar, no stable emulsion was observed whatever the mixing method used. Although the reactor was completely opaque during homogenization step, suggesting a very efficient mixing process, the system immediately phase separated when homogenization was stopped. In contrast, **1** stabilized the W/CO_2 emulsions at 250 bar, thus above the cloud pressure (190 bar) at 45 °C. The whole reactor colored in red upon simple magnetic stirring at 250 bar followed by a slow phase separation whereas the emulsion prepared by high-pressure homogenization remained stable for more than 16 h. In contrast, W/CO_2 emulsions prepared under the same conditions with the aliphatic glycosurfactant **2** demixed in half an hour (Fig. S3).

In conclusion, the W/CO_2 interfacial activity of glycosurfactants was investigated for the first time and advantageously compared to the performance of AOT, previously reported as W/CO_2 microemulsifier [7]. At 80 bar and 45 °C, the fluorinated mannose **1** (Man-C2F8) exhibits the lowest W/CO_2 γ value (γ = 3.6 mN/m) followed by the aliphatic carbohydrate **2** (γ = 4.8 mN/m) and AOT (γ = 6.2 mN/m). This study demonstrates the emulsifying power of the glycosurfactants, and particularly of the fluorinated mannose **2**, at 45 °C and 80 bar and paves the way to the design of novel competitive surfactants in the field of W/CO_2 emulsions.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2013.02.023.

References

[1] J.L. Kendall, D.A. Canelas, J.L. Young, J.M. Desimone, Chem. Rev. 99 (1999) 543.
[2] R. Butler, C.M. Davies, A.I. Cooper, Adv. Mater. 13 (2001) 1459.
[3] J. Eastoe, S. Gold, D. Steytler, Langmuir 22 (2006) 9832.
[4] S. Cummings, K. Trickett, R. Enick, J. Eastoe, Phys. Chem. Chem. Phys. 13 (2011) 1276.
[5] J. Eastoe, S. Gold, D. Steytler, Aust. J. Chem. 60 (2007) 630.
[6] S.S. Adkins, X. Chen, Q.P. Nguyen, A.W. Sanders, K.P. Johnston, J. Colloid Interface Sci. 346 (2010) 455.
[7] M. Sagisaka, T. Fujii, Y. Ozaki, S. Yoda, Y. Takebayashi, Y. Kondo, N. Yoshino, H. Sakai, M. Abe, K. Otake, Langmuir 20 (2004) 2560.
[8] J. Eastoe, S. Gold, S. Rogers, P. Wyatt, D. Steytler, A. Gurgel, Angew. Chem. Int. Ed. 45 (2006) 3675.
[9] J.L. Dickson, P.G. Smith, V.V. Dhanuka, V. Srinivasan, M.T. Stone, P.J. Rossky, J.A. Behles, J.S. Keiper, B. Xu, C. Johnson, J.M. DeSimone, K.P. Johnston, Ind. Eng. Chem. Res. 44 (2005) 1370.
[10] A. Mohamed, M. Sagisaka, F. Guittard, S. Cummings, A. Paul, S.E. Rogers, R.K. Heenan, R. Dyer, J. Eastoe, Langmuir 27 (2011) 10562.
[11] R.S.R.P. Da, K.P. Johnston, Langmuir 16 (2000) 3690.
[12] F. Tewes, M.P. Krafft, F. Boury, Langmuir 27 (2011) 8144.
[13] K. Harrison, J. Goveas, K.P. Johnston, E.A. O'Rear III, Langmuir 10 (1994) 3536.
[14] J.-L. Salager, Drugs Pharm. Sci. 105 (2000) 73.
[15] S.R.P. da Rocha, P.A. Psathas, E. Klein, K.P. Johnston, J. Colloid Interface Sci. 239 (2001) 241.
[16] Y. Queneau, S. Chambert, C. Besset, R. Cheaib, Carbohydr. Res. 343 (2008) 1999.
[17] D. Coulon, A. Ismail, M. Girardin, B. Rovel, M. Ghoul, J. Biotechnol. 51 (1996) 115.
[18] A. Favrelle, C. Boyère, P. Laurent, G. Broze, C. Blecker, M. Paquot, C. Jérôme, A. Debuigne, Carbohydr. Res. 346 (2011) 1161.
[19] F. Tewes, F. Boury, J. Phys. Chem. B 108 (2004) 2405.
[20] F. Tewes, F. Boury, J. Phys. Chem. B 109 (2005) 3990.

My-Kien Tran

Nationalité vietnamienne
Né le 20/02/1984
Adresse de messagerie : mykien.tran@gmail.com



Objectif

Travailler dans un domaine concernant la formulation et/où l'encapsulation de principes actifs.

Formation-Diplômes:

2002-2007: Etude universitaire en préparation du diplôme d'état de pharmacien vietnamien.

2007-2008: Master 2, parcours "Technologies Innovantes en Formulation", Angers, France.

*Sujet de stage: "Microencapsulation de protéines dans des particules de carbonate de calcium préparés en milieu CO_2 supercritique"

2009-2013: Doctorat en Sciences Pharmaceutiques au sein du laboratoire INSERM U1066, Angers, France.

*Sujet de thèse: " Microencapsulation de protéines dans des systèmes polymériques par des procédés sans solvants toxiques, en particulier la technologie des fluides supercritiques"

*Formations principales suivies durant la thèse:

- "High Pressure Technology-From Basics to Industrial Applications" - summer school 07/2011, Belrade.
- Méthodologie de plan d'expérience (criblage, analyse factorielle, méthodologie de surfaces de réponses, formulation et mélange). Logiciels: Nemrodw®, Design-Expert®.
- Technique de réseaux de neurones. Logiciels: Neurosolution®, Matlab®
- "Physical properties for process engineers". Logiciel: Aspen Plus®
- Autres: spectroscopie vibrationnelle, microscopie électronique, analyse statistique avec SAS® et SPSS®, programmation avec SAS®, simulation de dynamique de système avec Stella®...

Expériences professionnelles:

2008-2009: Ingénieur d'étude au sein du laboratoire INSERM U646, Angers, France.
Sujet de recherche: "Microencapsulation dans des capsules lipidiques préparées par la coacervation complexe à partir des protéines végétales et la gomme arabique".
2009-2012: moniteur à la faculté Pharmacie de l'Université d'Angers
Assistant pour les travaux pratiques (émulsion et micro-émulsion, micro-encapsulation, gel,...)

Compétences:

Mise en place des procédés d'encapsulation; construction de matrices d'expérience pour étudier l'influence des facteurs opératoires et optimiser le procédé; caractérisation physico-chimique des systèmes dispersés; modélisation mathématique; modélisation des équilibres liquide-vapeur, liquide-liquide...

Publications:

[1] M.K. Tran, L.N. Hassani, B. Calvignac, T. Beuvier, F. Hindré, F. Boury, Lysozyme encapsulation within PLGA and $CaCO_3$ microparticles using supercritical CO_2 medium, The Journal of Supercritical Fluids, (2013).

[2] M.-K. Tran, A. Swed, F. Boury, Preparation of polymeric particles in CO_2 medium using non-toxic solvents: Formulation and comparisons with a phase separation method, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 82 (2012) 498-507.

[3] T. Beuvier, B. Calvignac, G.J.-R. Delcroix, M.K. Tran, S. Kodjikian, N. Delorme, J.-F. Bardeau, A. Gibaud, F. Boury, Synthesis of hollow vaterite $CaCO_3$ microspheres in supercritical carbon dioxide medium, Journal of Materials Chemistry, 21 (2011) 9757-9761.

[4] A. Favrelle, C. Boyère, M.K. Tran, D. Alaimo, B. Calvignac, M. Paquot, F. Boury, C. Jérôme, A. Debuigne, Surface activity of a fluorinated carbohydrate ester in water/carbon dioxide emulsions, Journal of Colloid and Interface Science, 398 (2013) 273-275.

Communications:

[1] M.-K. Tran, F. Boury, Préparation de particules de PLGA avec des solvants non-toxiques en vue de l'encapsulation de protéines, Journée de SCIAM, mars 2011, Angers *(Communication orale).*

[2] M.K. Tran, B. Calvignac, F. Boury**,** A Novel Preparation Method For PLGA Microspheres Using Non Toxic Solvent Emulsified In Supercritical CO_2, 13th European Meeting on Supercritical Fluids, 9-12 October 2011, The Hague, The Netherlands, *(Communication orale).*

[3] M.K. Tran, L. N. Hassani, B. Calvignac, T. Beuvier, F. Hindré, A. Gibaud, F. Boury**,** Protein Encapsulation in PLGA and $CaCO_3$ particles in CO_2 media**.** Proceedings of 10th International Symposium on SuperCritical Fluids (ISSF), 13-26 mai 2012, San Francisco, USA, *(Communication orale)*

l'université nantes angers le mans
PÔLE DE RECHERCHE ET D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

université angers

Thèse de Doctorat

My-Kien Tran

Microencapsulation de protéines dans des systèmes polymériques par des procédés sans solvants toxiques, en particulier la technologie des fluides supercritiques.

Résumé

Aujourd'hui, l'encapsulation de protéines dans le but de chercher une action prolongée reste un défi dans le domaine de microencapsulation. Ce sujet de recherche attire beaucoup l'attention des chercheurs depuis des décennies en raison des avantages que l'encapsulation de protéines pourrait apporter au confort du patient et à l'efficacité du traitement thérapeutique. L'encapsulation de protéines dans des systèmes polymériques comme par exemple des microparticules de PLGA (poly-lactique-glycolique-acide) est une des approches permettant d'atteindre ce objectif. Nombreuses méthodes d'encapsulation ont été décrites mais le point négative généralement observé dans ces méthodes est l'utilisation des solvants organiques volatiles, considérés toxiques pour la santé humaine et l'environnement. Le but de ce travail était d'élaborer de nouveaux procédés de préparation de particules de PLGA en vue de l'encapsulation de protéine. Des solvants miscibles avec l'eau, non-volatiles et peu-toxiques (glycofurol, ,isosorbide dimethyl ether) ont été choisis pour l'utilisation dans des procédés présentés dans ce travail. Le CO_2 pressurisé, possédant des propriétés physico-chimiques fortement modulables, a été utilisé pour le développement de ces nouveaux procédés. Différents procédés ont été développés en basant soit sur le phénomène de séparation de phase, soit sur la méthode d'émulsification/extraction. Des particules sphériques de taille variant de 0.3 à 30 µm ont été générés avec le rendement d'encapsulation satisfaisant (65-80%). Les détails de la formulation sont présentés et le mécanisme de formation de particules est discuté. La méthodologie de plan d'expérience a été utilisée pour évaluer l'influence des paramètres opératoires et pour prédire le rendement d'encapsulation dans le domaine expérimental choisi.

Mots clés
encapsulation de protéines, solvants injectables, PLGA, CO_2 pressurisé, DMI, glycofurol.

Abstract

To date, protein encapsulation for sustained-release purpose remains a challenge in the field of microencapsulation. Owing to many benefits that it can offer to patient comfort and therapeutic efficiency, protein encapsulation in drug delivery systems has been drawing the attention of reseachers since decades. Protein encapsulation in polymeric systems such as PLGA (poly-lactic-glycolic-acid) particles has been proven to be an useful approach to attain this objective. Many protein encapsulation methods have been developed; however, the main drawback in these methods lies in the use of volatile toxic solvents, which are considered toxic for the body and the environment . The goal of this work was then to elaborate formulation strategies to find ways of avoiding the use of volatile toxic solvents. Water-miscible non-volatile low-toxic solvents such as glycofurol, isosorbide dimethyl ether were chosen to be used in this work. Pressurized CO_2, with its highly flexible properties in fuction of pressure and temperature, was made use of for the development of these new processes.
Two formulation methods have been used: the phenomenon of phase separation and the emulsification/extraction method. Different processes for protein encapsulation were developed during this work. Spherical polymeric PLGA particles were successfully generated with satisfactory encapsulation yield of protein (65-80%). Depending on the chosen process, particle size can range from 0.3 to 30 µm. Details in the formulation of PLGA particles for protein encapsulation are presented and the mechanism of particle formation is discussed. Experimental design was used to ascertain the influence of operating factors on the encapsulation yield and to better predict the output in the chosen experimental space.

Key Words
protein encapsulation, non-toxic solvent, PLGA, CO_2, DMI, glycofurol.