



HAL
open science

Etude du cycle de vie du Ticagrelor par une approche combinée prédictive et caractérisation structurale

Hassane Sadou Yaye

► **To cite this version:**

Hassane Sadou Yaye. Etude du cycle de vie du Ticagrelor par une approche combinée prédictive et caractérisation structurale. Sciences pharmaceutiques. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS024 . tel-01766476

HAL Id: tel-01766476

<https://theses.hal.science/tel-01766476>

Submitted on 13 Apr 2018

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

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

Etude du cycle de vie du ticagrelor par une approche combinée prédictive et caractérisation structurale

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée
à l'Université Paris-Sud
Laboratoire Matériaux et Santé – EA 401

École doctorale n°425 Innovation Thérapeutique :
du fondamental à l'appliqué
Spécialité de doctorat: Pharmacotechnie et
Biopharmacie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 05 février, par

Hassane SADOU YAYÉ

Composition du Jury :

M Pedro DE OLIVEIRA Professeur, Université Paris Sud, LCP - UMR 8000 CNRS	Président du jury
M Bernard DO Maître de Conférences, Université Paris-Sud, EA 401	Directeur de thèse
Mme Najet YAGOUBI Professeur, Université Paris-Sud, EA 401	Co-directeur de thèse
M Denis GUILLOTEAU Professeur, Université François-Rabelais, Unité INSERM 930	Rapporteur
M Jérôme VIAL Maître de Conférences, ESPCI CNRS - UMR CBI 8231, Paris	Rapporteur
Mme Béatrice NICOLAÏ Maître de Conférences, Université Paris Descartes	Examinateur
M Ivo B. RIETVELD HDR, Normandie Université, Laboratoire SMS, EA 3233	Examinateur
M Noureddine GHERMANI Professeur, LCP, Institut Galien Paris Sud, UMR 8612	Examinateur

“La joie est le soleil des âmes ; elle illumine celui qui la possède et réchauffe tous ceux qui en reçoivent les rayons.” Carl Reysz

“Being a candle is not easy; in order to give light one must first burn.” Rumi

Remerciements

Immense est ma joie, au terme de ce travail de thèse mené conjointement avec mon poste d'assistant spécialiste à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, d'adresser mes remerciements à toutes celles et à tous ceux qui m'ont accompagné tout au long de cette aventure, et qui l'ont rendue possible

*A Monsieur le **Dr Bernard DO***

Je voudrais particulièrement vous remercier d'avoir accepté de diriger cette thèse, encadrement sans lequel ce projet n'aurait pas vu le jour. Les mots me manquent pour vous témoigner toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude. Au-delà d'être mon tuteur, vous m'avez soutenu et encouragé dans tous les projets entrepris. Ce fut un grand honneur de vous avoir comme encadrant !

*A Madame le **Pr Najet YAGOUBI,***

Vous m'avez ouvert les portes de votre Laboratoire, de mon Master 1 à la thèse de sciences ; bientôt dix années que dure notre collaboration, cela en dit long sur le plaisir que j'ai eu à travailler avec vous. Votre présence et vos conseils m'ont permis d'avancer et de progresser jour après jour. Merci pour tout !

*A Monsieur le **Pr Denis GUILLOTEAU** et à Monsieur le **Dr Jérôme VIAL,***

Vous avez accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Veuillez trouver ici l'expression de mon estime et de ma reconnaissance.

*A Monsieur le **Dr Ivo B. RIETVELD,***

Pour votre aide, vos précieux conseils et pour avoir accepté d'être rapporteur de ma mi-thèse et membre de ce jury. Vous avez contribué par vos nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de cette thèse. Je tiens à vous remercier du fond du cœur.

*A Monsieur le **Pr Noureddine GHERMANI,** à Monsieur le **Pr Pedro de OLIVEIRA,** et à Madame le **Dr Béatrice NICOLAÏ***

Vous avez spontanément accepté de faire partie de ce jury. Soyez assuré de mon estime et de ma considération.

A toute l'équipe Matériaux et santé EA401, plus particulièrement à Mehrez Sghaier et à Katia Maneurlax pour leur disponibilité et leur aide durant les manipulations.

A ma formidable équipe de la Pitié-Salpêtrière, merci pour votre soutien.

A mon chef de service le Pr Patrick Tilleul pour son soutien

A tous mes amis anciens internes qui sauront se reconnaître à travers ce travail

A toute ma famille, merci pour le soutien

A ma grand-mère qui m'a inculqué le sens des valeurs et qui n'a cessé de m'insuffler « Hassane, tu seras un homme ». J'espère de là où tu es que tu es fière de l'homme que je suis devenu !

A mon champion Amine, j'espère t'avoir montré le chemin !

A tous ceux que j'ai oublié...

Liste des abréviations

API(s) (active pharmaceutical ingredient(s)) : principe(s) actif(s)

APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization

APPI : Atmospheric Pressure Photoionisation

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ASA : Acide acétylsalicylique ou Aspirine

ASMR : Amélioration du Service Médical Rendu

ATG : Analyse thermogravimétrique

ATP (Analytical Target Profile) : Profil Analytique Cible

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CAD : Charged Aerosol Detection

CL : Chromatographie Liquide

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CQA (Critical Quality Attribute) : Attribut de Qualité Critique

CMAs (Critical Materials Attributes) : Attributs Matières Critiques

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CPPs (Critical Process Parameters) : Paramètres de Procédé Critiques

CTD : Common Technical Document

DBD : Détecteur à Barrettes de Diodes

DOE : Design of experiments

DP (Degradation product) : Produit de dégradation

DSC (Differential scanning calorimetry) : Calorimétrie différentielle à balayage

EMA : European Medicines Agency

ESI : Electrospray Ionisation

FDA : Food and Drug Administration

FT : Transformée de Fourier

FTIR : Infrarouges à transformée de Fourier

HILIC : Chromatographie d'interaction hydrophile

HR : Haute Résolution

HOMO : Highest Occupied Molecular Orbital

ICH : International Conference on Harmonization

IHD : Index of Hydrogen Deficiency

ISO (International Organization for Standardization) : Organisation internationale de normalization

LC : Chromatographie Liquide

LC-MS : Couplage chromatographie Liquide – Spectrométrie de Masse

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

LUMO : Lowest Unoccupied Molecular Orbital

MCV : Maladies cardiovasculaires

MSⁿ (Multistage Mass Spectrometry) : Spectrométrie de Masse à plusieurs dimensions

PAT : Technologie Analytique des Procédés (PAT)

PPM : Partie par million

QbD : Quality by Design (Qualité par la Conception)

QqQ : Triple Quadripolaires

QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship

QTMP (Quality Target Method Profil) : Profil Qualité Cible de la Méthode

QTPP (Quality Target Product Profil) : Profil Qualité Cible du Produit

R&D : Recherche et Développement

RDB : Ring plus double bonds

REACH : Registration, Evaluation, Authorization, and restriction of Chemicals

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RP (Reverse Phase) : Phase inverse

SCA : Syndrome Coronarien Aigu

SCR : Substance Chimique de Référence

SIM : Stability Indicating Method

SM : Spectrométrie de Masse

TIC : Ticagrelor

UV : Ultra-Violet

XRD : Diffraction des Rayons X

Sommaire

Liste des figures	11
Liste des tableaux	14
Introduction générale.....	16
Objectifs des travaux.....	19
Chapitre 1 : Cycle de vie du médicament	23
I. Introduction : Découverte du médicament.....	23
II. L'identification et la confirmation des cibles des médicaments.....	23
1. Apports de la bio-informatique (<i>in Silico</i>) :	25
III. Préformulation et développement galénique	29
IV. Phases précliniques et cliniques.....	31
1. Etape préclinique	31
2. Les études de phase I	32
3. Les études de phase II	32
4. Les études de phase III	32
5. Enregistrement – Lancement – Commercialisation.....	33
6. Les études de phase IV.....	34
V. Brevet et maintien de l'innovation	34
VI. Voies d'amélioration de la compétitivité.....	37
1. Maîtrise des coûts de R&D.....	37
2. Partage et réduction des risques par la recherche translationnelle	37
VII. Evolution du paradigme de développement.....	39
1. Précautions et prouesses	39
2. Adaptive pathways	39
3. Réserves sur la voie adaptative.....	40
VIII. L'amélioration de la compétitivité par la qualité le long du cycle de vie du médicament.....	41
1. La qualité le long du cycle de vie du médicament.....	41
2. Production en continue : Apport de la technologie analytique des procédés (PAT)	44
3. Article 1 - Illustration de l'importance de l'application combinée des ICH : « Management des risques appliqué au développement pharmaceutique du médicament ».	45
Chapitre 2 : Instrumentation	48
I. La chromatographie liquide haute performance (CLHP)	48
1. Introduction	48
2. Les phases stationnaires en chromatographie liquide	49

2.1.	Avancées technologiques	49
2.2.	Pureté des silices.....	51
2.3.	Comparaison des colonnes – Cas des colonnes RP.....	53
2.4.	Phase mobile et comparabilité des phases stationnaires	57
2.5.	Apport des phases stationnaires « mix-mode ».....	57
2.6.	Stabilité physico-chimique de la silice des phases RP	57
3.	Détecteurs.....	60
a)	Les détecteurs UV et à barrettes de diodes.....	61
b)	Interfaces LC–MS	62
II.	La Spectrométrie de Masse (SM).....	62
1.	Introduction	62
2.	La source d'ionisation.....	63
3.	L'analyseur.....	70
Chapitre 3 : Espace de connaissance (Knowledge Space) : Outil de maîtrise des changements en post-AMM (Cas du Ticagrelor : étude à l'état liquide).		80
I.	Etude de la stabilité intrinsèque du Ticagrelor.....	80
1.	Introduction	80
2.	Anti-agrégation via les Récepteurs P ₂ Y ₁₂ des plaquettes	81
3.	Objectif de l'étude du ticagrelor en post-AMM	82
4.	Etude de la stabilité intrinsèque du ticagrelor	84
II.	Evaluation de la sécurité des produits néoformés	127
1.	Contexte.....	127
2.	Méthodes <i>in silico</i> d'évaluation de la toxicité	129
3.	Profils toxicologiques des produits de dégradation du ticagrelor	130
4.	Limites des études <i>in silico</i> et perspectives	132
III.	Elucidation structurale : Outil qualité de prédiction de contrefaçon des médicaments 133	
IV.	Conclusion – Discussions.....	134
Article 2 : Identification of the major degradation pathways of ticagrelor		136
Communication Orale : Determination of Ticagrelor chemical stability and characterization of its degradants		138
Chapitre 4 : Espace de connaissance (Knowledge Space) : Source d'opportunités – Etudes de pré-formulation Ticagrelor – Aspirine à l'état solide		140
I.	Introduction – contexte de l'étude	140
II.	Matériels et méthodes.....	141
1.	Matières premières et réactifs	141
2.	Protocole d'étude de stress du mélange TIC-ASA à l'état solide	142

3.	Instrumentation	142
III.	Caractérisation des propriétés physiques des principes actifs	145
1.	Polymorphisme des substances actives pharmaceutiques	145
2.	Ticagrelor	146
3.	Aspirine : Caractérisation de la forme polymorphique de l'échantillon Cooper®	150
IV.	Stabilité physique du mélange solide ticagrelor – aspirine.....	151
1.	Préparation des échantillons pour l'analyse thermique.....	151
2.	Détermination des paramètres physiques du mélange	152
3.	Estimation de la composition de l'eutectique	153
V.	Stabilité chimique à l'état solide du mélange ticagrelor – aspirine	154
1.	Etude du mélange en condition de stress thermique	154
2.	Stabilité thermique des APIs purs.....	156
3.	Cinétique de dégradation du mélange solide TIC-ASA.....	157
4.	Caractérisation des produits d'interaction (IPs) et produits de dégradation (DPs)	159
5.	Proposition des voies de dégradation du mélange TIC-ASA	161
VI.	Investigation des phénomènes autour de la température eutectique	162
VII.	Preuves complémentaires par FT-IR.....	164
VIII.	La dégradation des mélanges TIC-ASA en analyse thermogravimétrique	167
IX.	Conclusions et implications pharmaceutiques des interactions	169
	Article 3 : Investigating therapeutic usage of combined Ticagrelor and Aspirin through solid-state and analytical studies.....	171
	Poster : Solid – liquid states interaction/degradation studies of Ticagrelor – acetylsalicylic acid combination by using sophisticated hyphenated techniques.....	173
	Conclusion générale et perspectives	176
	Annexes	179
	Annexe 1 :	179
	Annexe 2 :	180
	Annexe 3 :	181
	Annexe 4 :	182
	Références bibliographiques	184

Liste des figures

Figure 1 : Stratégies d'identification et de confirmation des cibles.	25
Figure 2 : Apport de l'approche <i>in silico</i> de la recherche assistée par ordinateur dans la découverte des nouveaux médicaments : de l'identification d'une cible au médicament candidat	29
Figure 3 : Espaces de conception du médicament.....	31
Figure 4 : Loi d'Eroom illustrant le nombre de médicaments approuvés par la FDA et les dépenses engagées en R&D et leur doublement dans le temps tous les 9 ans.....	33
Figure 5 : Triangle du Dossier Technique Commun (CTD). Le CTD est organisé en 5 modules. Le module 1 est spécifique à chaque région, les modules 2, 3, 4 et 5 sont communs à toutes les régions.....	34
Figure 6 : Représentation schématique du cycle de vie du médicament.....	36
Figure 7 : Qualité le long du cycle de vie du médicament	43
Figure 8 : L'approche QbD le long du cycle de vie du médicament.....	43
Figure 9 : Eléments essentiels de Technologie Analytique des Procédés.....	45
Figure 10 : Types de silanols à la surface de la silice	51
Figure 11 : Différenciation entre les activités des silanols et des métaux sur les colonnes C18 RP (pic 1, 4,4'-bipyridyl; pic 2,2,2'-bipyridyl): colonne A, faible activité des silanols, faible teneur en métaux; colonne B, forte activité des silanols, forte teneur en métaux; colonne C, faible activité des silanols, forte teneur en métaux.....	53
Figure 12 : Représentation des mécanismes de rétention correspondant aux différents paramètres de l'équation 1	55
Figure 13 : Comparaison de la sélectivité de la colonne Discovery C8 avec 3 colonnes C8 (a-d). F_s (Ace C8 - Discovery C8) = 1; F_s (Precision C8 - Discovery C8) = 4; F_s (Inertsil C8 - Discovery C8) = 38. Analytes : (1) N,N-diéthylacetamide; (2) nortriptyline; (3) 5,5-diphenylhydantoïne; (4) benzonitrile; (5) anisole; (6) toluene; (7) cis-chalcone; (8) trans-chalcone; (9) acide méfenamique.....	56
Figure 14 : Evolution du facteur de rétention en fonction de la longueur du greffon à pH = 2 et T = 50°C (eau + 0,2% TFA (pH=2) / ACN (gradient 0 à 100% ACN en 80 min).	59
Figure 15 : Influence de la nature du tampon sur la stabilité de la phase stationnaire de silice. pH = 10 et T = 25°C (MeOH/tampon 0,1M 50/50 v/v) Colonne Zorbax Rx-C18, 150 x 4,6 mm.	59
Figure 16 : Evolution des sources d'ionisation des années 70 à nos jours	64
Figure 17 : Champs d'application des différents modes d'ionisation à pression atmosphérique.....	65
Figure 18 : Représentation de la source d'ionisation par électro nébulisation	66
Figure 19 : Mécanisme de l'ionisation APCI à pression atmosphérique.	67
Figure 20 : Mécanisme de l'ionisation APPI à pression atmosphérique.	70
Figure 21 : Détermination de la largeur à mi-hauteur (FWHM) permettant de calculer le pouvoir de résolution.	72
Figure 22 : Représentation du système d'électrodes de l'analyseur quadripolaire (section hyperbolique)	74
Figure 23 : Représentation de l'analyseur à temps de vol (TOF).	75
Figure 24 : A) Représentation schématique de l'analyseur Orbitrap™; B) Représentation de la trappe orbitale et des trajectoires ioniques.....	76

Figure 25 : Structure de l'ADP, l'ATP et des inhibiteurs des récepteurs P2Y12 (Clopidogrel et Ticagrelor).....	83
Figure 26 : Le récepteur P2Y12 et ses ligands : A et B) : liaison à l'ADP et changement conformationnel ; C) Inhibition compétitive par le Clopidogrel ; D) Inhibition non compétitive par le ticagrelor.....	84
Figure 27 : Schéma de synthèse du ticagrelor.....	85
Figure 28 : Place des études de stress dans le cycle de vie du médicament.....	87
Figure 29 : Conditions de stress appliquées pour étendre l'espace de connaissances du médicament et des APIs.....	89
Figure 30 : Développement de méthode analytique par l'approche QbD.	96
Figure 31 : Diagramme d'Ishikawa montrant les phases de développement d'une méthode analytique avec les variables d'entrée.....	97
Figure 32 : Représentation des formes ioniques du ticagrelor pour le choix du pH de la phase mobile en fonction des valeurs du pKa (Données ChemAxon).....	101
Figure 33 : Spectre UV du ticagrelor.....	102
Figure 34 : Chromatogrammes résultant de l'exposition du ticagrelor aux conditions de stress testées : (a) Solution standard de ticagrelor; (b) Photolyse; (c) Oxydation; (d) Thermolyse.....	103
Figure 35 : Profil d'exactitude pour la validation du ticagrelor (n=9) (a) et des impuretés (n=5) (b); utilisant le modèle de régression linéaire (Limites d'acceptabilité à $\pm 2\%$).....	106
Figure 36 : Evolution de la concentration de ticagrelor en fonction du temps pour ces différentes conditions de stress.....	109
Figure 37 : Stratégie générale de conduite des études d'élucidation structurale et de proposition des principales voies de dégradation des substances actives pharmaceutiques.....	111
Figure 38 : Spectre Full MS du ticagrelor après l'optimisation de la méthode SM.....	114
Figure 39 : Densité électronique des orbitales frontières HOMO et LUMO du ticagrelor (Données Gaussian®).....	116
Figure 40 : Schéma de fragmentation du ticagrelor.....	118
Figure 41 : Schéma de fragmentation ESI-MS ⁿ proposé pour DP1.....	120
Figure 42 : Proposition du schéma de fragmentation ESI-MS ⁿ pour les ions protonés des produits de dégradation DP3, DP6, DP7, DP8 et DP9.....	122
Figure 43 : Proposition du schéma de fragmentation ESI-MS ⁿ pour DP2.....	123
Figure 44 : Proposition du schéma de fragmentation ESI-MS ⁿ pour DP4.....	124
Figure 45 : Proposition du schéma de fragmentation ESI-MS ⁿ pour DP5.....	125
Figure 46 : Mécanismes conduisant à la formation de DP3 par auto-oxydation et N-déalkylation en présence de lumière.....	126
Figure 47 : Mécanismes conduisant à la formation de DP2, DP4 et DP5 en présence de peroxyde d'hydrogène.....	127
Figure 48 : Représentation graphique des informations issues a) des bases de données et b) des analyses QSAR.....	130
Figure 49 : Thermogramme de l'échantillon de ticagrelor.....	147
Figure 50 : Profil de diffraction aux rayons X de la polymorphe II de ticagrelor.....	147
Figure 51 : Paramètres de maille de l'échantillon de ticagrelor Interchim® en fonction de la température. a, b et c : Paramètres de longueurs (a,b,c) ; e, f et g : paramètres d'angles (α , β et γ) et de volume (V).....	149
Figure 52 : Thermogramme de l'aspirine.....	150

Figure 53 : Profil de diffraction des rayons X de l'échantillon d'aspirine utilisé pour réaliser les mélanges avec le ticagrelor. L'échantillon d'aspirine (diffractogramme bleu) et la forme I d'aspirine caractérisée par Kim Y <i>et al.</i> (Profil en couleur noire).....	151
Figure 54 : Comportement à l'état solide du ticagrelor et de l'aspirine: a) courbes DSC typiques; b) diagramme de phase composition en fonction de la température avec un comportement eutectique (fraction molaire X du Ticagrelor indiquée en abscisse).....	152
Figure 55 : Courbe de Tammann de la transition eutectique.....	153
Figure 56 : Cinétique de décomposition du mélange TIC - ASA: (a) Evolution des teneurs en% molaire du mélange TIC-ASA des échantillons stressés en temps d'exposition en jours et en fonction de la température (°C) (b) Courbe d'Arrhenius obtenue à partir des constantes de vitesse de réaction avec le modèle de cinétique d'ordre zéro	159
Figure 57 : a) Chromatogramme du mélange Ticagrelor - Aspirine après thermolyse à 80 °C pendant 24h; b) Sites d'interactions possibles sur la molécule TIC.....	160
Figure 58 : Profil de fragmentation du produit d'interaction IP1 et du produit de dégradation DP1 correspondant.	162
Figure 59 : Dégradation du système Ticagrelor - Aspirine ($X_{TIC} = 0,30$) dans le liquide eutectique (a) et juste après le liquidus (b)	164
Figure 60 : Spectres IR de Ticagrelor, d'aspirine et de leur mélange ($X_{TIC} = 0,30$) maintenus dans diverses conditions: a) TIC à 25 °C à J0; b) TIC à 100 °C à J7; c) TIC-ASA à 25 °C à J0 ; d) TIC-ASA à 25 °C à J7; e) TIC-ASA à 100 °C à J7 ; f) ASA à 100 °C à J7; g) ASA à 25 °C à J0 (Les flèches indiquent des changements dans les spectres après exposition à haute température).....	166
Figure 61 : Courbes d'analyse thermogravimétrique du Ticagrelor, d'Aspirine et de plusieurs de leurs mélanges sous atmosphère inerte.	169

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractérisation du principe actif ou du médicament pendant l'étape de préformulation	30
Tableau 2 : Historique des avancées technologiques des colonnes.....	50
Tableau 3 : Acidité et abondance relative des silanols	51
Tableau 4 : Mécanisme d'ionisation en APCI ⁺ / APCI ⁻	68
Tableau 5 : Mécanisme d'ionisation en APPI ⁺ / APPI ⁻	69
Tableau 6 : Comparaison relative des systèmes LC/MS	73
Tableau 7 : Seuils pour produits de dégradation dans les nouveaux médicaments.....	88
Tableau 8 : Plan d'expérience de l'étude du ticagrelor spécialité ou SCR dans les différentes conditions de stress.....	94
Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques du ticagrelor	98
Tableau 10 : Programme pour la chromatographie liquide.....	100
Tableau 11 : Paramètres de validation de la méthode de quantification du ticagrelor et de détermination de ses impuretés.....	105
Tableau 12 : Résumé des constantes de vitesse de réaction d'ordre zéro du ticagrelor dans les conditions de stress étudiées	108
Tableau 13 : Principaux paramètres et leurs rôles dans l'optimisation de la SM.	113
Tableau 14 : Données de SM des masses exactes du ticagrelor et de ses fragments	118
Tableau 15 : Temps de rétention, structures et données HR-MS des produits de dégradation et de leurs principaux ions fragments.	119
Tableau 16 : Classification des impuretés des médicaments	130
Tableau 17 : Evaluation toxicologique <i>in silico</i> du ticagrelor et de ses produits de dégradation	133
Tableau 18 : Propriétés physico-chimiques du ticagrelor et de ses isomères (DP7, DP8 et DP9) (Source ChemAxon).....	134
Tableau 19 : Compositions des mélanges Ticagrelor - Aspirine utilisés pour l'étude (Fractions molaires de TIC).	151
Tableau 20 : Apparence physique des APIs de Ticagrelor et d'aspirine et de leurs mélanges (rapport molaire 1: 1) sous conditions de stress thermique.....	154
Tableau 21 : Résultats des analyses LC-HR-MS ⁿ : Temps de rétention et masses exactes des produits d'interactions du mélange Ticagrelor - Aspirine et leurs produits de dégradation correspondants obtenus par mécanisme de N-déalkylation.....	156
Tableau 22 : Equations de dégradation du mélange Ticagrelor – Aspirine en fonction de la température.....	158
Tableau 23 : Spectres FT-IR des APIs purs de Ticagrelor, d'Aspirine ainsi que de leur mélange physique (m:m) après 7 jours d'exposition à 25 °C et à 100 °C.....	167

Introduction générale

“Quality cannot be tested into products; quality should be built in by design” ICH Q8

Introduction générale

Le médicament ne constitue pas un produit de consommation comme les autres. C'est le produit de consommation le plus encadré par la réglementation. Vu la place occupée par le médicament dans la prise en charge des maladies humaines, la question de la qualité des médicaments a toujours été au centre des préoccupations. Dès le XIX^{ème} siècle, se sont affrontées 2 visions de la pharmacie, d'un côté les industriels et les chimistes mettant en avant les questions de qualité, de pureté des substances actives et de maîtrise des processus de fabrication pour justifier la brevetabilité marchande des médicaments et de l'autre les défenseurs de la pharmacie d'officine qui redoutent les conséquences néfastes du monopole garanti par le brevet sur les prix, l'accès aux spécialités et donc sur la santé publique. Pour protéger la santé publique, un compromis a été trouvé entre le monopole pharmaceutique et la réglementation. Aux Etats-Unis, après la création de la FDA en 1905, c'est un rapport de forces entre les différents pouvoirs représentés par des professionnels de la médecine, des industriels, des usagers et des autorités de santé publique qui a permis de renforcer la législation. Chaque scandale sanitaire lié au médicament replace le législateur au centre de l'appareil décisionnaire. Cela a été le cas aux USA après les affaires de la sulfanilamide frelatée par du diéthylène glycol en 1938 (plus de 100 morts) [FDA, 1981 ; Wax, 1995] et en 1962 de la thalidomide distribuée à titre expérimental comme somnifère chez les femmes enceintes (plusieurs milliers de malformations congénitales type phocomélie en Europe) [The Sunday Times, 1979 ; Baillargeon *et al.*, 2016 ; Rawson, 2016]. Les législateurs du Congrès américain ont défini comme préalables à toute demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) les résultats des essais de toxicité et des essais cliniques contrôlés [Daemmerich, 2004]. En Europe les essais cliniques randomisés deviennent obligatoires dans les années 80 avec l'harmonisation européenne des grands axes des politiques de santé.

Malgré la rigueur qui encadre la mise en place des essais, il n'en demeure pas moins que des efforts doivent être consentis pour fluidifier davantage les échanges et les prises de décisions entre les autorités réglementaires et l'industrie pharmaceutique. Le récent scandale de ce défaut d'organisation a été mis en lumière avec l'affaire sanitaire et judiciaire du benfluorex ayant eu pour conséquence la transformation de l'Afssaps (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) en ANSM

(Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé), pour avoir failli à l'une de ses principales missions de protection de la santé [JO n° 302 du 30 décembre 2011 ; Pouchard, 2012].

A côté des défauts qualités liés à une toxicité intrinsèque du médicament, de ses produits de dégradation ou de ses métabolites, peuvent exister d'autres non-conformités moins graves, liées au processus de fabrication, pouvant conduire à des retraits de lots, voire à une suspension transitoire de commercialisation comme cela a été le cas pour le polymorphisme du ritonavir [Morissette *et al.*, 2003].

L'identification et la quantification des produits de dégradation inconnus au sein des médicaments se révèlent d'une importance capitale pour les personnes et les systèmes de santé de par le monde.

Ainsi, comme le préconise l'ICH Q1A(R2) [ICH, 2003], une connaissance approfondie du médicament et de ses produits de dégradation doit être établie sur des bases scientifiques. La complexité des mélanges à analyser implique l'utilisation de méthodes analytiques très performantes avec de grandes capacités de séparation et d'identification des composés. A cet égard, les méthodes chromatographiques notamment la CLHP et la spectrométrie de masse sont des outils sophistiqués de premier plan, de loin les plus utilisés, permettant respectivement l'obtention de séparations fiables et l'élucidation structurale des mélanges de produits grâce à un haut pouvoir de résolution.

Objectifs des travaux

« Un problème sans solution est un problème mal posé » Albert Einstein

Objectifs des travaux

De sa conception à l'obtention de l'AMM, le médicament est testé dans un cadre restreint ou espace de conception qui peut être quelque peu différent des conditions réelles d'utilisation. Cette zone de contrôle reflète la sécurité et l'efficacité c'est-à-dire le rapport bénéfice-risque tel qu'exigé par les autorités de tutelles. L'assurance du niveau de qualité souhaité repose sur 4 attributs qualités critiques que sont l'identité, la pureté, la teneur et la sécurité. Or dans la vraie vie, tout au long de sa vie, le médicament ne reste pas dans cet espace protégé. Il arrive très souvent qu'il sorte de cet espace parfaitement maîtrisé. Dans ce cas, il va arriver dans un espace de non-maîtrise, non prévu par le fabricant et où résident des interrogations sur le maintien de ce rapport bénéfice-risque. En effet, au-delà des procédés de fabrication, libération, transport et stockage bien maîtrisés par l'industriel, de très nombreuses situations peuvent s'extirper de l'espace de contrôle. Par exemple, sans être exhaustif, on peut citer l'écart non volontaire comme les déviations des conditions de conservation ou l'écart volontaire comme la modification de la forme pharmaceutique. Cette dernière situation est surtout rencontrée en milieu hospitalier où des formes pharmaceutiques solides sont broyées, le plus souvent justifiée par des troubles de déglutition et du comportement. Deux évaluations des pratiques cliniques sur le broyage des médicaments effectuées par 2 équipes différentes à 5 ans d'intervalles trouvent des résultats similaires édifiants [[Caussin et al., 2012](#) ; [Fodil et al., 2017](#)]:

- Pratiquement 50% des médicaments broyés avaient une forme galénique contre indiquant cette pratique. Ce qui peut avoir un impact sur la teneur et la sécurité notamment pour les formes à libération prolongée ou modifiée.
- Dans plus de 95% des cas, les comprimés co-administrés sont broyés ensemble en raison de 2 à 6 médicaments / patient, avec un impact sur les 4 critères de qualité.

Ces mésusages peuvent avoir pour conséquences la dégradation du principe actif en produit inactif avec un manque d'efficacité et donc une perte de chance pour le patient, ou se transformer en produits toxiques mettant en cause sa sécurité d'emploi. La ligne directrice de la conférence internationale sur l'harmonisation (Q1A (R2)) suggère la mise en place d'études sur le médicament pour établir les

caractéristiques de sa stabilité intrinsèque non seulement pour l'identification de ses potentiels produits de dégradation, mais aussi pour une meilleure compréhension de la stabilité intrinsèque du principe actif du médicament. Si les différentes agences et institutions de santé internationales (OMS, FDA, EMA, ICH) s'accordent sur l'identification et la quantification des produits de dégradation, l'agence européenne du médicament va plus loin en introduisant l'évaluation de la génotoxicité potentielle des produits de dégradation et leur surveillance dans le produit fini [EMA, 2004].

La première partie de ce travail aborde le cycle de vie du médicament et a permis de mettre en lumière le cadre de développement du médicament en soulignant l'apport des ICH dans la conception et l'organisation des étapes clés du développement. Cette partie nous a permis de mettre l'accent sur la nécessité d'étendre l'espace de connaissance du médicament à travers la recherche scientifique et des outils de gestion des risques. Cette approche a fait l'objet du **premier article** « **Le management des risques appliqué au développement pharmaceutique** ».

La deuxième partie de mon travail est consacrée à l'évaluation de la stabilité intrinsèque du ticagrelor au regard des recommandations de l'ICH et de l'EMA. Ce dernier est un antiagrégant plaquettaire pour lequel aucune étude n'existe dans la littérature sur son comportement dans divers environnements.

Un premier objectif intermédiaire a consisté à la mise en place d'une méthode CLHP indicatrice de stabilité et la caractérisation des produits de dégradation. Pour cela, un plan d'expérience a été minutieusement conçu dans différentes conditions de stress. Le développement et l'optimisation de la méthode LC indicatrice de stabilité ont permis la séparation du principe actif de ses produits de dégradation. L'indisponibilité dans le commerce des substances chimiques de référence (SCR) des produits de dégradation nous a conduits à valider une méthode quantitative d'analyse de ces DP à partir du ticagrelor SCR. Par la suite, une stratégie de caractérisation structurale des produits de dégradation a été mise en place grâce à la complémentarité de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse haute résolution utilisées en couplage (LC-HR-MSⁿ). La dégradation d'une substance active génère des composés qui se caractérisent par la singularité de leurs propriétés physico-chimiques. La caractérisation structurale par un couplage de techniques différentes met à profit ces propriétés (groupements chromophores et

absorption dans l'UV, fonctions ionisables pour la SM, logP, etc.). La haute résolution permet d'accéder à la masse exacte à partir de laquelle se déduit la composition élémentaire. Il en découle la proposition des principales voies de dégradation du ticagrelor dans les différentes conditions de l'étude (**article 2**).

L'accès à la composition élémentaire et à la structure virtuelle des produits de dégradation a permis d'envisager un 2^{ème} objectif intermédiaire, qui a consisté en l'évaluation de ces produits néoformés afin de prédire leur sécurité et leur toxicité éventuelles. La méthode *in silico* fondée sur des bases de données et des algorithmes mathématiques a été utilisée pour cette approche. Elle présente l'avantage d'être facilement accessible, d'avoir une capacité de criblage rapide de nombreuses molécules et des coûts de mise en place réduits comparés aux essais classiques *in vitro* ou sur des animaux. Les principaux critères d'évaluation (Toxicological endpoints) étudiés ont été la carcinogénicité, la mutagénicité et la toxicité sur le développement. Les résultats ont été discutés au regard de la législation européenne REACH et de la guideline ICH M7.

Fort des premiers résultats sur l'espace de connaissances du ticagrelor, la troisième partie nous a permis d'évaluer une des possibles voies d'exploitation de ces données. Le ticagrelor est utilisé au long cours en association avec l'aspirine dans la prise en charge du syndrome coronarien aigu. La connaissance des voies de dégradation du ticagrelor a été mise à profit pour modéliser son comportement en présence d'aspirine, ceci renvoie à ce qui a été présenté en préambule quant au risque lié au broyage des produits. Ce qui permet d'envisager par la suite une étude de préformulation avec l'aspirine à l'état solide. Ce travail a fait l'objet du **troisième article** avec une évaluation de la stabilité physico-chimique de l'association. Après une caractérisation des structures cristallines par la diffraction des rayons X, l'évaluation des interactions physico-chimiques a été réalisée grâce au couplage LC-HR-MSⁿ et à la calorimétrie à balayage différentiel (DSC), complétés par l'infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et l'analyse thermogravimétrique (TGA).

Chapitre 1 : Cycle de vie du médicament

“Tout est cycle, cercle vicieux, éternel retour.” Morgan Sportès

Chapitre 1 : Cycle de vie du médicament

I. Introduction : Découverte du médicament

La prévention et le traitement des maladies ont prolongé l'espérance de vie, et contribué de manière significative à des progrès socio-économiques colossaux. La découverte et le développement de médicaments sont essentiels au maintien de la recherche et de l'innovation de l'industrie pharmaceutique. La découverte de médicaments est un processus interdisciplinaire, complexe, long et coûteux, où l'échec est la norme. Le temps moyen pour mettre sur le marché un nouveau médicament varie de 10 à 15 ans. De même, le coût moyen investi en recherche et développement est estimé entre 1,3 et 1,8 milliard de dollars [Myers *et al.*, 2001 ; Paul *et al.*, 2010 ; Collier, 2009 ; Munos, 2009].

Le développement de nouveaux médicaments nécessite au moins trois étapes : 1) une phase de découverte, comportant souvent la synthèse et le criblage de composés candidats, 2) une phase d'optimisation nécessitant la synthèse et l'analyse de variantes structurales 3) et une phase de fabrication, nécessitant une synthèse efficace et à grande échelle du médicament optimisé.

Si historiquement les molécules naturelles (végétales, animales et minérales) étaient les plus utilisées notamment pour la découverte de médicaments antibiotiques et anticancéreux [Cragg *et al.*, 2004 ; Oberlies *et al.*, 2004], la découverte de nouveaux médicaments candidats fait appel de nos jours aux bibliothèques de molécules obtenues par synthèse chimique totale ou partielle [Nielsen *et al.*, 2008].

II. L'identification et la confirmation des cibles des médicaments

L'identification, la confirmation des cibles ainsi que les mécanismes d'action des molécules candidates sont complexes et représentent des facteurs limitant la découverte et la mise sur le marché de nouveaux médicaments. Les avancées technologiques dans divers domaines tels que la connaissance de la biologie cellulaire et moléculaire, les techniques d'imagerie et les techniques innovantes de bio-informatique ont bouleversé la recherche biomédicale permettant des capacités d'explorations d'un large panel de cibles et une meilleure compréhension des mécanismes d'action des médicaments.

La découverte d'un nouveau médicament requiert une optimisation de l'efficacité thérapeutique et une maîtrise des données de sécurité d'emploi, en minimisant les effets indésirables à court et à long terme. Si traditionnellement, l'identification de cibles thérapeutiques avait consisté à la mise en œuvre de méthodes expérimentales variées dans le but de mettre l'accent sur une potentielle interaction physique entre la cible et son ligand, démarches qui se sont avérées très longues et coûteuses [Ursu *et al.*, 2015], les méthodes modernes ont évolué et se déclinent en deux approches fondamentales (Figure 1) [Schenone *et al.*, 2013] :

- La première est basée sur des essais biochimiques, qui permettent dans un premier temps de déterminer une protéine cible, qui sera par la suite exposée à différentes petites molécules dont les interactions et les modifications de conformations et d'activités sont évaluées. L'identification et la confirmation d'une protéine cible sont un processus long, et nécessite de démontrer la pertinence de la protéine pour une voie biologique particulière, un processus ou une maladie d'intérêt. Une fois qu'une cible est validée, on présume que l'action du médicament candidat affectera cette protéine, et modifie la physiopathologie de la maladie. La suite des essais pour caractériser ces interactions est réalisée sur des cellules ou des animaux.
- La deuxième fait appel à des essais phénotypiques où les molécules testées sont ajoutées à des cellules ou des animaux et les effets mesurés. [Wagner *et al.*, 2009].

Des bases de données publiques comme PubChem ou ChEMBL [Seiler *et al.*, 2007] constituent une mine d'informations pour des études de criblages multidimensionnels de petites molécules. A titre d'exemple, l'étude effectuée par l'institut National de Cancer des Etats Unis (NCI-60) ayant pour objectif d'évaluer l'impact phénotypique de petites molécules sur des lignées cellulaires de 60 types de cancers [Paul *et al.*, 1989]. Selon les molécules testées, les résultats de ces essais peuvent conduire, sur la base des relations structure-activité, à envisager le développement et l'optimisation structurale de nouvelles molécules.

L'identification de la cible n'intervient que dans un second temps.

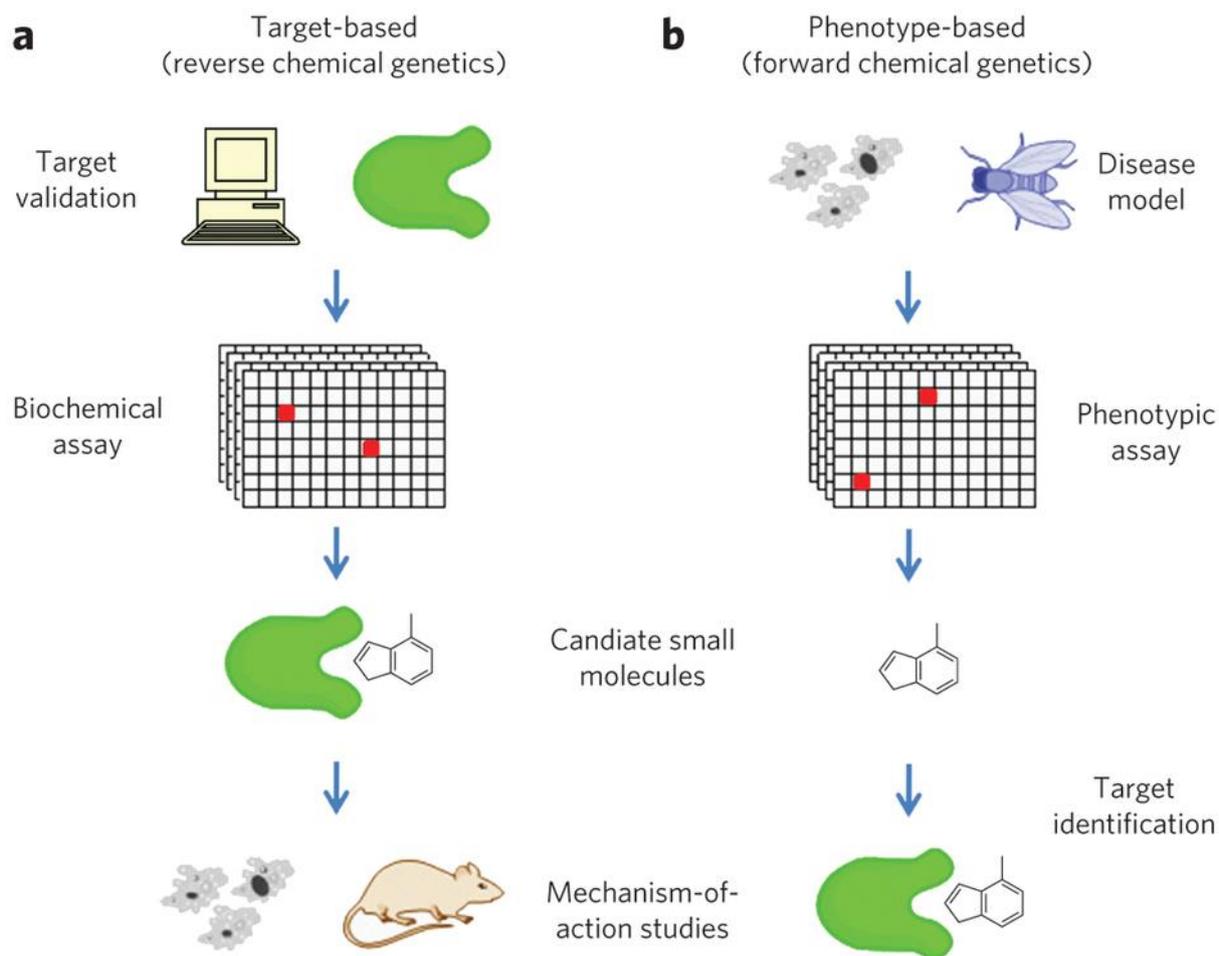


Figure 1 : Stratégies d'identification et de confirmation des cibles.

(D'après Schenone *et al.*, 2013)

1. Apports de la bio-informatique (*in Silico*) :

Les trente dernières années ont été marquées par des changements importants dans le paysage de la recherche biomédicale [Jorgensen, 2004].

Depuis l'apparition de la diffraction des rayons X et son utilisation pour l'élucidation structurale et la géométrie 3D des petites molécules en 1932, les structures de nombreuses protéines ont été résolues grâce aux rayons X et à la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN). La dernière grande découverte fut l'élucidation structurale et l'étude fonctionnelle des récepteurs couplés aux protéines G, couronnée par le prix Nobel de chimie en 2012 de Robert J. Lefkowitz et Brian Kobilka [Bockaert, 2012]. En 1997, le nelfinavir mésylate, antiprotéase indiquée dans

le traitement du VIH, est le premier médicament dont la conception était uniquement basée sur l'étude des structures de la cible [Kaldor *et al.*, 1997].

Avec la détermination de la composition chimique et la position relative de chaque atome au sein de la structure 3D des protéines cibles, l'apport de la bio-informatique (*in silico*) réside dans la recherche de ligands sur la base des interactions physiques entre les atomes du ligand et de la cible. En plus de la structure 3D, sont pris en compte lors des modélisations les paramètres électrostatiques, dipolaires, les liaisons de van der Waals, les liaisons atomiques et leurs torsions ou encore les angles diédraux entre atomes. Les méthodes *ab initio* de chimie quantique permettent de calculer avec une grande précision les paramètres géométriques des molécules [Hillisch *et al.*, 2001].

Des bases de données à accès libre facilitent aux chercheurs la compréhension et la caractérisation des mécanismes d'interaction entre les protéines et les ligands. La connaissance des structures fonctionnelles des protéines a permis l'essor de méthodes de simulation *in silico* à la recherche de nouveaux traitements.

Des avancées majeures des techniques innovantes de bio-informatique ont considérablement augmenté le pouvoir analytique exploité dans la tâche complexe de découverte de nouveaux médicaments. Une fois la cible identifiée, de nombreux logiciels de modélisation peuvent être utilisés pour la phase de conception du médicament. Ces outils *in silico* se sont révélés particulièrement efficaces en augmentant le taux de réussite dans l'identification de nouveaux ligands comparés à la méthode expérimentale de criblage à haut débit. Cela a été démontré par Doman *et al.* évaluant le pouvoir d'inhibition des médicaments sur l'enzyme tyrosine phosphatase-1B : la simulation informatique sur 365 composés, montrent que 127 exercent une activité inhibitrice sur cette enzyme, soit un taux de succès de 35%, alors que la méthode traditionnelle de criblage haut débit effectué sur 400 000 molécules, seuls 81 présentent cette capacité d'inhibition soit 0,021% des structures testées. [Doman *et al.*, 2002]. Les techniques *in silico* ont révolutionné la conception du médicament, permettant le criblage d'un grand nombre de molécules dans des délais courts, ont réduit les coûts de la recherche et ont optimisé le choix des molécules candidats en favorisant celles ayant le moins d'effets indésirables et permettant de constituer des librairies de composés chimiques pour des analyses

ultérieures plus fines. Ces avancées réalisées grâce à la bio-informatique sur les modélisations des molécules ainsi que la compréhension des interactions ligands-récepteurs sur la base des propriétés physico-chimiques ont été récompensées par le prix Nobel de chimie attribué à Martin Karplus, Mickael Levitt et Arieh Warshel en 2013 [Alan R, 2013].

Deux méthodes *in silico* se distinguent généralement pour la conception de nouveaux médicaments, toutes basées sur la disponibilité de données sur la cible (récepteur) (Figure 2) [Sliwoski *et al.*, 2014] :

1.1. Les méthodes basées sur le ligand

Les méthodes basées sur le ligand permettent de prédire les cibles à partir des structures chimiques des ligands. Ces méthodes utilisent les connaissances sur les médicaments existants pour prédire les nouvelles substances chimiques qui présentent des propriétés similaires [Martin *et al.*, 2002]. Des produits ayant des similitudes structurales ont plus de chances d'avoir des profils d'activité similaires. A partir d'une substance active connue, une librairie de molécules peut être utilisée pour définir un modèle de pharmacophore sur la base d'un certain nombre de propriétés structurales auxquelles doivent répondre les molécules candidates pour interagir avec la cible [Mishra *et al.*, 2011]. Cette méthode est généralement utilisée quand les structures 3Ds des cibles sont inconnues.

1.1.1. Voies d'identification de nouveaux ligands

1.1.1.1. Identification basée sur les propriétés physicochimiques

Une description moléculaire sur la base des propriétés physicochimiques des molécules, (poids moléculaire, volume, géométrie, atomes, moment dipolaire, polarisation, coefficient de partage octanol – eau (logP), structures planes, électronégativité ou propriétés de solvation) peut être utilisée pour décrire et comparer une molécule de référence avec une bibliothèque de composés.

1.1.1.2. Identification basée sur un pharmacophore

Par définition, un pharmacophore désigne un ensemble de caractéristiques stériques et électroniques nécessaires pour permettre les interactions supramoléculaires optimales avec une cible et déclencher une réponse (ou une inhibition) donnée

[Wermuth *et al.*, 1998]. Ainsi, des propriétés de structures comme les interactions stériques, les charges des fonctions moléculaires, les groupements donneurs ou accepteurs d'hydrogènes, les zones hydrophobes, les groupements aromatiques, ou encore les déformations géométriques sont utilisées pour évaluer les propriétés de pharmacophore des composés au sein d'une librairie [Yang, 2010].

1.1.1.3. Identification basée sur les relations quantitatives structures activités (QSAR)

Le QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) utilise une équation pour évaluer quelques propriétés à partir de la structure d'un composé. Les calculs des modèles QSAR prennent en compte les propriétés physicochimiques ou les données théoriques moléculaires des composés chimiques, et exprimés par une simple équation mathématique.

1.2. Les méthodes basées sur la structure :

Contrairement aux méthodes basées sur le ligand, celles basées sur la structure utilisent directement les structures tridimensionnelles (3D) des protéines cibles pour prédire les interactions avec les petites molécules. Ces méthodes présentent l'avantage de ne pas nécessiter une connaissance préalable sur le ligand. Ces informations sur la structure permettent de déterminer le degré d'affinité entre le ligand et sa cible, et d'établir la corrélation avec l'activité thérapeutique attendue. C'est une méthode de choix pour améliorer ou moduler l'effet des ligands connus sur la base des informations existantes et qui peut conduire à des modifications pour accroître l'affinité avec la cible. La figure 2 résume les techniques de modélisation qui mettent à profit les connaissances sur la structure des cibles [Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009].

De plus en plus de modèles utilisent des algorithmes combinant les méthodes basées sur la structure et le ligand pour consolider davantage les résultats *in silico*.

Les avantages de la recherche assistée par ordinateur (CADD) semblent évidents par rapport à la technique traditionnelle [Lahana, 1999 ; Zoete *et al.*, 2009].

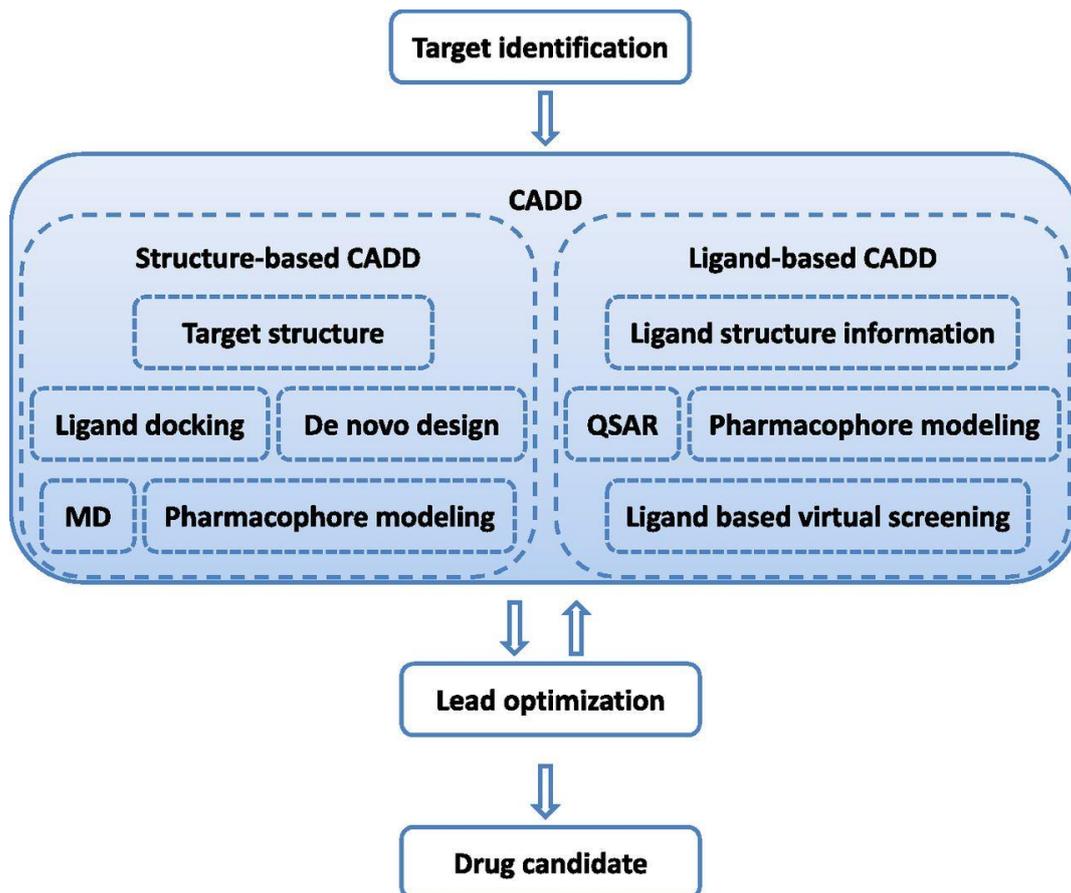


Figure 2 : Apport de l'approche *in silico* de la recherche assistée par ordinateur dans la découverte des nouveaux médicaments : de l'identification d'une cible au médicament candidat

(D'après Sliwoski *et al.*, 2014)

III. Préformulation et développement galénique

Après le choix du médicament candidat à l'issue de longues séquences d'optimisation, le passage à l'étape de préformulation se base sur l'étude approfondie de ses propriétés physico-chimiques et mécaniques qui pourraient impacter l'efficacité biologique du médicament, la forme galénique ou la fabrication.

Parmi ces paramètres physico-chimiques, se distinguent la solubilité, la lipophilie (logP), la taille des particules, les constantes d'ionisation (pKa), les formes cristallines et les polymorphes éventuels (Tableau 1). Ces propriétés sont étroitement liées à la structure chimique de la molécule. Des connaissances approfondies de ces paramètres dépendent les propriétés pharmacocinétiques (d'absorption, de

distribution, de métabolisme et d'élimination), les stratégies de formulation, ainsi que l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité du médicament.

Ces informations clés constituent l'espace de connaissances dans lequel est défini un espace de conception du médicament (Figure 3).

Tableau 1 : Caractérisation du principe actif ou du médicament pendant l'étape de préformulation

Structure chimique et masse molaire	Propriétés organoleptiques : odeur, couleur, goût	Constantes d'ionisation : Systèmes aqueux et non-aqueux
Solubilité non-aqueuse : solvants purs, mélanges de cosolvants, effet du pH	Tests de dissolution : Principe actif et médicament ; effet de la taille des particules, de la surface	Propriétés mécaniques : Propriétés de viscoélasticité, de compressibilité, et d'écoulement
Pureté chimique et identité : spécifications des impuretés, propriétés spectrales (IR, UV)	Coefficient de partage et lipophilie : Systèmes Octanol / eau, Systèmes alcane/eau	Stabilité à l'état solide : Effets de la température, de l'humidité, de la lumière, en présence d'oxygène / azote, d'additifs
Propriétés physiques : Taille, forme et distribution des particules, densité volumique, surface spécifique, activité surfacique, effet du broyage/micronisation	Stabilité en solution : Dégradation en fonction du pH, de la température, de la lumière, d'oxydation / hydrolyse, en présence de métaux, en milieu non-aqueux, de la force ionique, en présence d'additifs	Propriétés cristalline: Point de fusion, Polymorphisme (effet sur la biodisponibilité), Analyses thermiques (DSC, ATG), Isomérisation
Solubilité aqueuse : Solubilité en fonction du pH, effet de la température, d'agents solubilisants, de tampons, de la force ionique	Propriétés Biopharmaceutiques : Propriétés In-vitro transport/absorption, Perméabilité chez l'homme	

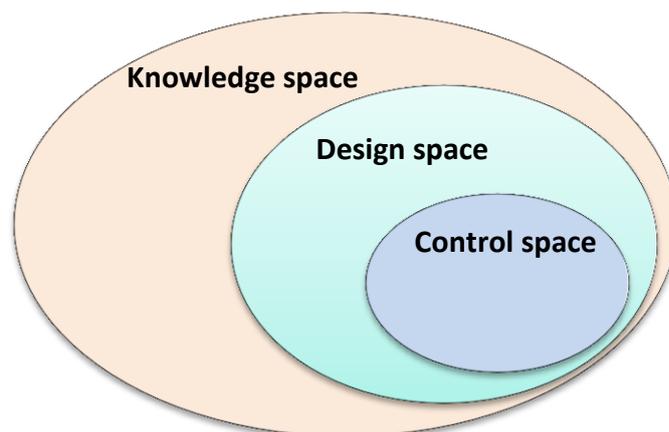


Figure 3 : Espaces de conception du médicament

IV. Phases précliniques et cliniques

Il est largement admis que l'industrie pharmaceutique passe actuellement beaucoup plus de temps sur la recherche et le développement, mais produit moins de nouvelles molécules qu'il y a 20 ans. Cette tendance est très bien explicitée par la loi d'Eroom qui illustre la régression du nombre de nouveaux médicaments approuvés, mettant en évidence le doublement des coûts de développement de nouveaux médicaments environ tous les neuf ans (Figure 4) [Scannell *et al.*, 2012]. Sur 10^5 composés chimiques candidats, un seul parvient sur le marché.

1. Etape préclinique

Après les étapes d'optimisation, de préformulation et de formulation, le médicament candidat intègre l'étape d'évaluation préclinique (1 à 2 ans). Cette étape concerne 5 à 20 candidats sur 5000 à 10000 composés testés [Ciociola *et al.*, 2014]. Il s'agit de l'étape d'expérimentation chez l'animal, qui permet une évaluation préliminaire des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, la biodisponibilité et la bioéquivalence, l'étude des toxicités aiguë et chronique, la carcinogénicité / mutagénicité et l'immunogénicité du médicament. A ce stade préclinique, près de 11% des échecs de développement sont dus à des problèmes de toxicité chez l'animal [Taylor *et al.*, 2006]. Les essais précliniques notamment les études chez l'animal constituent l'une des étapes les plus chères du développement du médicament, estimée à environ 185,6 millions de dollars [DiMasi *et al.*, 2007].

Le succès de l'étape préclinique justifie l'introduction d'un dossier auprès des autorités réglementaires pour essai clinique du nouveau médicament expérimental.

Le processus de développement passe au stade clinique chez l'homme et comporte 4 phases.

2. Les études de phase I

Elles sont réalisées sur 2 à 5 candidats médicaments issus de la phase préclinique [Ciociola *et al.*, 2014]. Elle est généralement effectuée à petite échelle sur quelques dizaines de volontaires sains pendant plusieurs mois, pour un coût évalué à environ 30,5 millions de dollars [DiMasi *et al.*, 2003]. Cette phase permet d'évaluer la tolérance du médicament et, potentiellement, les paramètres pharmacocinétiques du médicament. A ce stade, les problèmes de sécurité sont les plus fréquents et précipitent l'arrêt des essais dans environ 40% des cas [Waring *et al.*, 2015]. Environ 54% des médicaments passent à la phase suivante [Blass, 2015].

3. Les études de phase II

Effectuées sur plusieurs centaines de personnes, elles permettent d'obtenir des données initiales sur l'efficacité du médicament, la posologie ainsi que les données de toxicités chroniques et de carcinogénicité chez l'animal. Les mauvaises pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sont responsables d'environ 39% d'échecs. Cette étape peut durer jusqu'à deux ans et seulement 34% des médicaments passent à la phase suivante [Khanna, 2012 ; Blass, 2015]. Son coût est estimé à 41,6 millions de dollars [DiMasi *et al.*, 2003].

4. Les études de phase III

C'est une étape coûteuse au regard des moyens mobilisés et de sa position stratégique avant l'obtention de l'AMM. Ce sont généralement des études multicentriques, qui durent de 1 à 4 ans, sur un échantillon de plusieurs milliers de patients avec pour objectif principal de collecter des données supplémentaires sur la sécurité et l'efficacité du médicament et d'établir son profil thérapeutique (indications, posologies, contre-indications, effets indésirables et interactions médicamenteuses). Ces études généralement menées en double aveugle, permettent de positionner le médicament dans l'arsenal thérapeutique existant. A ce stade, 70% des médicaments font l'objet d'une demande d'AMM [Khanna, 2012 ; Blass, 2015].

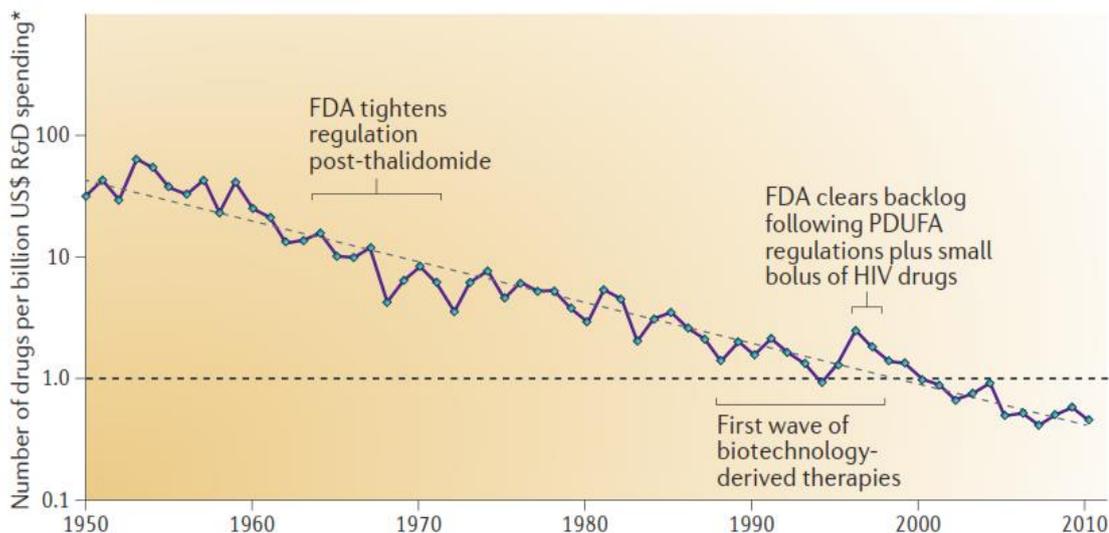


Figure 4 : Loi d'Eroom illustrant le nombre de médicaments approuvés par la FDA et les dépenses engagées en R&D et leur doublement dans le temps tous les 9 ans.

(D'après Scannell *et al.*, 2012).

5. Enregistrement – Lancement – Commercialisation

Le laboratoire pharmaceutique dépose un dossier auprès des autorités de santé pour l'enregistrement du médicament. Ce dossier nommé Common Technical Document (CTD) est formalisé au niveau mondial par la Conférence Internationale pour l'Harmonisation (ICH) (Japon, États-Unis et Europe) [ICH, 2016]. Le CTD doit fournir aux autorités de régulation une illustration compréhensive du profil du médicament, sa performance et l'histoire de son développement. Le CTD s'articule autour de trois axes (Figure 5) :

- Qualité (Module 3) : détail du procédé de fabrication de la substance active en (3.2.S), du procédé de fabrication du produit fini en 3.2.P, et les contrôles correspondants. Cela comporte de manière non exhaustive la description des méthodes analytiques et des spécifications, des processus et de leurs paramètres critiques, des lots fabriqués, des excipients, des matériaux de conditionnement et éventuellement des fournisseurs et sous-traitants.
- Sécurité (Module 4) : décrit l'ensemble des données non-cliniques
- Efficacité (Module 5) : recueille et détaille les données cliniques lors de l'usage du médicament chez l'homme.

6. Les études de phase IV

De coûts variables, l'utilisation du médicament à large échelle permet de collecter des données conséquentes sur la sécurité et l'efficacité. Les programmes de pharmacovigilance tels que prévus par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) permettent un suivi minutieux du médicament en post-AMM et peuvent entraîner à tout instant le retrait du médicament du marché comme cela a été le cas pour l'inhibiteur sélectif de la cyclo-oxygénase 2, le rofecoxib (Vioxx[®]) [Solomon *et al.*, 2004 ; White *et al.*, 2003 ; Konstam *et al.*, 2001] ou plus récemment le Benfluorex (Mediator[®]) [Frachon *et al.*, 2010 ; Etienne *et al.*, 2011]. Compte tenu des coûts faramineux engagés dans les phases précédentes, le retrait du médicament durant la phase IV peut conduire à la faillite du laboratoire pharmaceutique.

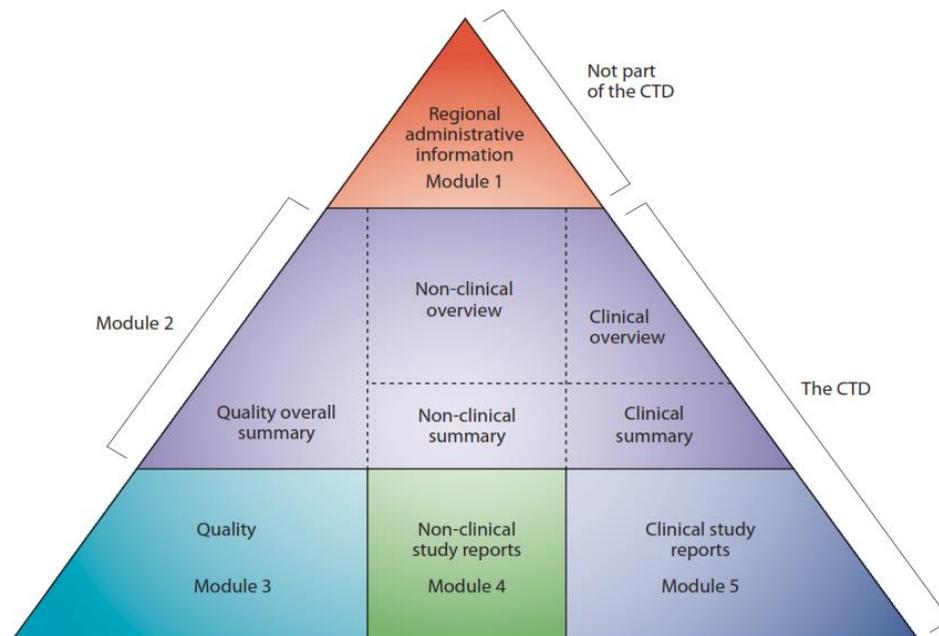


Figure 5 : Triangle du Dossier Technique Commun (CTD). Le CTD est organisé en 5 modules. Le module 1 est spécifique à chaque région, les modules 2, 3, 4 et 5 sont communs à toutes les régions.

(D'après ICH M4, 2016)

V. Brevet et maintien de l'innovation

L'industrie pharmaceutique fait face à de gros défis ces dernières décennies avec le déclin de la recherche et développement (R&D) auquel s'ajoutent les pressions économiques et réglementaires avec l'augmentation du coût des soins,

l'augmentation de la pression des organismes d'assurance maladie, le contrôle des prix sur le plan international. De même, les laboratoires pharmaceutiques sont de plus en plus confrontés à l'expiration de leurs brevets et l'apparition rapide des génériques [LaMattina, 2011]. Bien que les génériques soient un excellent modulateur des prix des médicaments, ils représentent des parts de marché importantes. On estime que 70% des prescriptions aux Etats-Unis sont des génériques [Murray *et al.*, 2008]. En France, les politiques publiques de l'assurance maladie prônent une politique de substitution par des génériques avec un objectif national de substitution pour les génériques porté à 86 % pour l'année 2016. Ce taux de substitution global était de 83,3 % à fin décembre 2014 [JORF, n°0149 du 28 juin 2016].

Le risque financier dû aux expirations de brevets clés entre 2010-2014 a été estimé à plus de 209 milliards de dollars annuel, ce qui a entraîné la perte d'environ 113 milliards de dollars liée à la substitution générique [Evaluate Pharma Alpha World Preview 2014 ; Evaluate Pharma report (2009)].

En règle générale, les laboratoires ne parviennent pas à remplacer systématiquement les brevets qui arrivent à terme par de nouvelles molécules. On estime que pour chaque dollar perdu avec l'expiration des brevets en 2012, seuls 26 centimes sont compensés par les revenus des nouveaux produits [Goodman *et al.*, 2008]. Face à la concurrence féroce du marché des génériques, les détenteurs des brevets répliquent en pensant au mieux et en maîtrisant le cycle de vie du médicament dès sa phase de conception (Figure 6). Des efforts considérables ont été consentis, afin de rendre le produit unique, difficile à copier par la concurrence et éventuellement prétendre à des extensions de leurs AMM. Cela passe par la conception de formes et de couleurs originales, le brevetage des systèmes d'administration ou encore en jouant sur les posologies avec les formes pégylées [Monfardini *et al.*, 1998]. Glaxo[®] a voulu utiliser la forme polymorphique de son principe actif le chlorhydrate de ranitidine (Azantac[®]) pour étendre son brevet ; ce qui lui a valu un litige de brevets avec Novopharm[®] qui a proposé un autre polymorphe [Bernstein, 2002].

Malgré les difficultés de l'industrie pharmaceutique qui résident en réalité dans la chute du développement des médicaments innovants, l'innovation médicale a un

impact réel dans l'amélioration des indicateurs de santé. Des nombreuses études ont montré les effets de l'innovation dans l'amélioration de la qualité de vie et de l'espérance de vie. La contribution des nouveaux médicaments à ces avancées est plus importante que celle des dépenses de santé au niveau global [Lichtenberg *et al.*, 2005 ; Fuchs *et al.*, 2001 ; Lichtenberg *et al.*, 2001 ; Cutler *et al.*, 2001]. L'exemple récent est l'apport de l'immunothérapie dans la prise en charge du mélanome, la forme la plus grave de cancer de la peau. Avant 2011, le pronostic moyen des patients atteints de mélanomes avancés était inférieur à un an avec un traitement basé sur la chimiothérapie seule. Grâce à l'immunothérapie, 40 % des patients étaient en vie à trois ans, et le pronostic du mélanome a changé à tout jamais [ASCO Annual Meeting, 2016].

Parmi les challenges de l'industrie pharmaceutique, l'augmentation de la productivité en R&D demeure de loin le plus important. Les solutions passent par une augmentation durable du nombre, de la qualité de l'innovation, mais aussi et surtout par une réduction raisonnable du coût de la recherche et du développement des nouveaux médicaments.

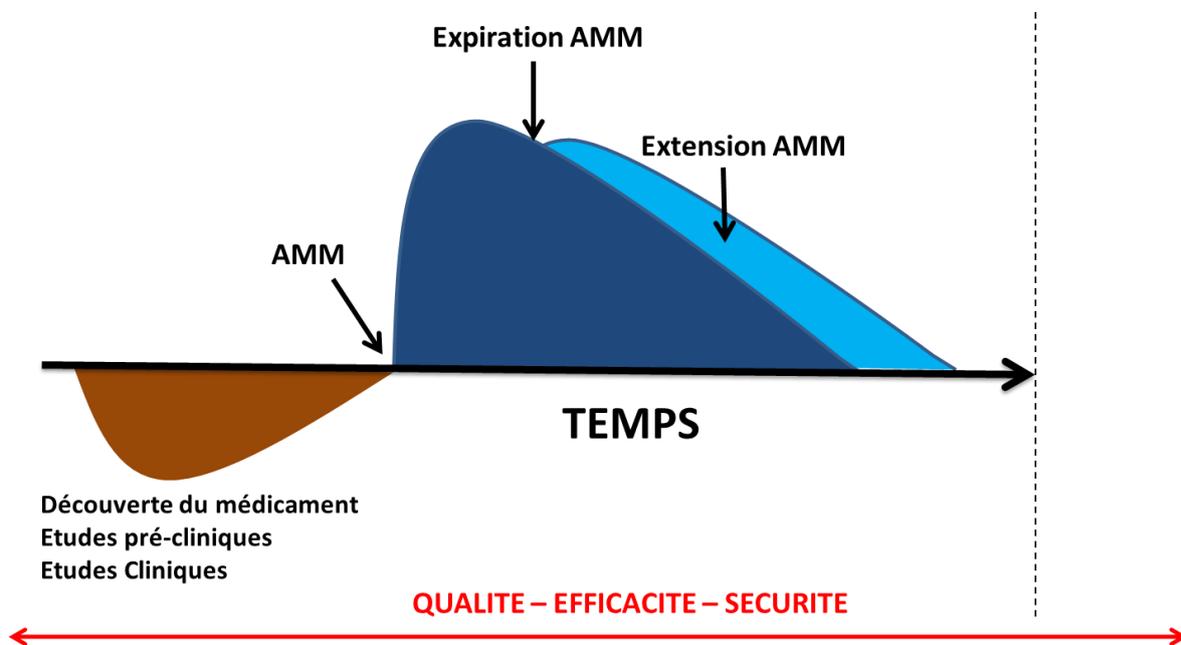


Figure 6 : Représentation schématique du cycle de vie du médicament

VI. Voies d'amélioration de la compétitivité

1. Maîtrise des coûts de R&D

La R&D se doit d'augmenter sa productivité en réfléchissant aux moyens à mettre en œuvre pour transformer efficacement les éléments d'entrée (investissements humains et matériels) en éléments de sortie bien maîtrisés (médicament innovant pour les patients et la collectivité). Des modèles pour améliorer la productivité de la R&D ont été proposés dans le but d'identifier les paramètres clés contributifs à son coût important. Le taux d'échecs important dans les études de phases II et III, la diminution des durées des phases II et III, la valeur ajoutée du nouveau médicament par rapport à l'existant ou encore le coût du projet et sa faisabilité dans les temps impartis sont tant de paramètres dont la modélisation permet d'accroître la productivité à juste coût et de réduire les échecs préjudiciables pour la pérennité de l'activité de la R&D [Paul *et al.*, 2010].

2. Partage et réduction des risques par la recherche translationnelle

La recherche translationnelle en médecine ou recherche de transfert est une collaboration interdisciplinaire (recherche académique, clinique et industrie pharmaceutique) ayant pour but la promotion, l'amélioration de la prévention, le diagnostic et le traitement au bénéfice des patients [Cohrs *et al.*, 2014]. Se côtoient principalement deux mondes se caractérisant par la singularité de leur culture, de leur logique et de leur approche qualité. La recherche translationnelle est donc une interface d'échanges et d'interconnexion entre le monde académique et le monde industriel, amenés à travailler, à échanger et à s'enrichir mutuellement pour le bénéfice du patient. [Tralau-Stewart *et al.*, 2009].

2.1. Point de vue de la recherche académique :

La recherche académique, financée essentiellement par des subventions, est guidée par le souci d'innovation et non de commercialisation, le nombre de publications avec des facteurs d'impact élevés, l'enseignement et la reconnaissance académique. Les domaines de recherche englobent des sujets vastes et variés avec une place importante occupée par l'intelligence artificielle avec des sujets comme les études basées sur le « Big Data » et médecine de précision intégrant des données biologiques et cliniques, l'« Evidence Based Medicine » permettant de mieux répondre aux besoins des patients, l'analyse des données du web en santé,

l'utilisation de systèmes experts d'aide aux diagnostics précoces, la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques ou de biomarqueurs prédictifs. A travers l'expression d'un besoin donné, une idée germe et aboutit après transfert à une valorisation et une capacité de retour sur investissement suffisant. Cependant, l'efficacité des résultats et leurs implications potentielles cliniques imposent au monde académique des efforts considérables permettant d'adopter les mêmes codes et langages que l'industrie, de comprendre les forces qui guident les opportunités commerciales d'une idée, mais aussi la connaissance et la réduction des risques inhérents à la R&D à travers une évaluation régulière des objectifs fixés selon des grilles lisibles des partenaires industriels.

2.2. Point de vue industriel

Contrairement à l'ancien modèle économique où l'innovation n'était pas le critère principal pris en compte pour le remboursement d'un médicament (mais l'efficacité et la sécurité), de nos jours, le produit se caractérise par son amélioration du service médical rendu (ASMR), qui définit son taux de remboursement. Cette nouvelle donne a complètement transformé l'économie de marché de l'industrie du médicament, avec pour conséquence une exacerbation de la concurrence, avec des établissements pharmaceutiques toujours à la recherche de valorisation par l'innovation. A cela s'ajoutent les grandes pressions financières rencontrées par l'industrie pharmaceutique, qui l'ont poussée à une maîtrise de ses dépenses, notamment celles consacrées à la R&D. Cela a eu pour conséquence une augmentation des fusions au sein de l'industrie pharmaceutique. Ces 2 dernières décennies, 60 laboratoires pharmaceutiques ont fusionné, engendrant 10 grandes entités [[Pharma Industry Merger and Acquisition Analysis 1995 to 2015](#)]. Ce qui leur confère une très grande influence vis-à-vis des exigences réglementaires (souvent aperçues comme un frein à la croissance du secteur), l'acquisition des innovations issues de la recherche translationnelle ou encore l'acquisition de Start-ups commercialisant des produits novateurs. Dès lors, le paradigme du risque lié au développement du médicament se trouve modifié grâce à une meilleure maîtrise de l'investissement en R&D et une réduction des échecs lors des phases précoces des essais cliniques.

VII. Evolution du paradigme de développement

1. Précautions et prouesses

Il est admis que la durée nécessaire pour mettre un médicament sur le marché (10 à 15 ans) est à l'origine des coûts élevés du développement. Si les différents scandales sanitaires (phocomélie de la thalidomide, cardiopathies du benfluorex et du rofécoxib, etc.) justifient le principe de précaution d'utilisation des nouveaux médicaments, l'utilisation des médicaments avant la fin des études cliniques peut se justifier en présence de résultats très prometteurs du nouveau médicament expérimental, avec des pertes de chances pour le groupe témoin (placebo ou médicament de référence). C'était le cas des antirétroviraux contre le VIH [Woodcock, 2012]. Les autorités et les agences de régulation sont pris en étau entre d'une part les chercheurs, les consommateurs et les professionnels de santé qui supportent l'insuffisance des données de sécurité du médicament et d'autre part, la nécessité pour les industriels et certaines associations de défense des patients de mettre rapidement les nouveaux médicaments sur le marché. Elles ont répondu à ce défi en mettant en place un début de flexibilité qui s'est traduite aux Etats-Unis par la mise en place d'une autorisation accélérée, et par une autorisation conditionnelle de mise sur le marché en Europe et au Japon [Baird *et al.*, 2014]. On parlait alors de licence adaptative. Ce concept est défini comme « une approche prospective planifiée et flexible de la réglementation des médicaments et des produits biologiques. Grâce à des phases itératives de collecte de données probantes afin de réduire les incertitudes suivies par l'évaluation réglementaire et l'adaptation des licences, la licence adaptative cherche à maximiser l'impact positif des nouveaux médicaments sur la santé publique en équilibrant l'accès en temps opportun aux patients avec le besoin d'évaluer et de fournir des informations évolutives adéquates sur les avantages et les risques de sorte que des décisions plus éclairées en matière de soins aux patients puissent être prises ». [Eichler *et al.*, 2012]. Ce concept a évolué pour donner lieu à l'approche dite des voies adaptatives (Adaptive pathways).

2. Adaptive pathways

Après l'affaire de la thalidomide et les efforts de réglementation sur les essais cliniques qui ont suivi pour sécuriser l'utilisation du médicament, l'industrie pharmaceutique, certains défenseurs des droits des patients, des lobbies et des investisseurs estiment que le paradigme actuel du développement du médicament et

la réglementation sont obsolètes et ont lancé un appel pour une évolution de ce paradigme (paradigm shift). Ce nouveau paradigme (adaptive pathways) doit permettre à un grand nombre de nouveaux médicaments d'avoir des approbations sur la base des résultats préliminaires, avec une collecte des informations clés sur l'efficacité et la sécurité seulement une fois le médicament est sur le marché et utilisé par les patients [Eichler *et al.*, 2015].

En mars 2014, l'Agence européenne des médicaments (EMA) a lancé le projet pilote de la voie adaptative [EMA, 2014]. De nombreuses voix se sont levées pour dénoncer les dérives de cette approche, notamment des experts qui trouvent les normes réglementaires actuelles trop laxistes sans avoir pour autant permis d'inciter une véritable innovation thérapeutique [Banzi *et al.*, 2015 ; Naci *et al.*, 2012 ; Lexchin, 2015].

L'aspect clé de ce projet défendu par l'EMA est l'implication de toutes les parties prenantes dans le processus tout au long de la vie du médicament, y compris ceux qui décident de l'accès des patients dans les États membres : aider à déterminer quels médicaments pourraient être appropriés pour le développement adaptatif (itératif); convenir conjointement d'une stratégie de génération de données pour répondre aux besoins des organismes de réglementation et d'évaluation des technologies de la santé (HTA) et veiller à ce que l'utilisation du médicament soit bien surveillée et gérée. L'objectif de cette collaboration est d'obtenir un meilleur accès des patients à des médicaments importants. La coopération entre les parties prenantes et un système performant de pharmacovigilance sont à la base du suivi systématique de la sécurité et de la performance générale d'un médicament dans la pratique clinique. La voie adaptative va sans doute changer le paradigme actuel du développement du médicament, avec potentiellement l'apparition de nouvelles aires thérapeutiques pour certaines pathologies très mal prises en charges comme la maladie d'Alzheimer, les maladies orphelines, les maladies dégénératives, les maladies infectieuses et certains cancers rares.

3. Réserves sur la voie adaptative

Il n'en demeure pas moins que des questions légitimes soulevées par certains experts et associations de défense des patients restent pertinentes :

- L'approbation sur la base, de données limitées, présente un risque pour le patient et une inquiétude sur la dérégulation annoncée pour les essais et l'autorisation des nouveaux médicaments [Gonsalves *et al.*, 2015].
- L'autorisation de mise sur le marché sur la base d'études préliminaires sur un petit échantillon, de sous-groupes bien définis ou de critères de jugement secondaires peuvent avoir pour conséquence un contournement de la phase III des essais cliniques [EMA, 2014].
- Quelle place pour les études randomisées avec la collecte des données dans les conditions réelles d'utilisation du médicament ?
- Sur les données de sécurité, même si le « Big Data » permet une collecte efficace des données, l'expérience montre que les méta-analyses peuvent produire des résultats conflictuels, rendant les conclusions difficiles [Reynolds *et al.*, 2016].
- Risque pour la santé, avec potentiellement l'utilisation des médicaments prescrits et remboursés sur la base d'une efficacité trompeuse, le coût pour la communauté et la santé publique, le coût pour le patient risquant d'être exposé à un traitement dangereux [Davis *et al.*, 2016].
- Difficultés pour les autorités de régulation de veiller à l'application des obligations inhérentes à la gestion du cycle de vie du médicament en lien avec le rapport bénéfique – risque, ce qui a valu des critiques à la FDA et à l'EMA pour négligence et non-respect des engagements des études pour certaines AMM conditionnelles [US GAO, 2015 ; Banzi *et al.*, 2015].

VIII. L'amélioration de la compétitivité par la qualité le long du cycle de vie du médicament

1. La qualité le long du cycle de vie du médicament

La qualité garantit la constance de l'efficacité et de la sécurité d'utilisation du médicament, répondant donc aux besoins des clients (patients, autorités réglementaires, investisseurs, etc.). La qualité constitue une opportunité pour la production pharmaceutique, sa maîtrise dans les procédés est essentielle pour affronter la concurrence internationale à laquelle font face les laboratoires pharmaceutiques. Elle se structure autour de 3 lignes directrices des Conférences Internationales pour l'Harmonisation (ICH) :

- ICH Q10 (Pharmaceutical Quality System) : décrit une gestion efficace du système qualité en prenant en compte les exigences des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) pour le management de la qualité et les concepts qualité des normes ISO (Organisation internationale de normalisation). L'ICH Q10 Complète les ICH Q8 et ICH Q9. La mise en œuvre de l'ICH Q10 tout au long du cycle de vie du produit facilite l'innovation et l'amélioration continue (Figure 7).
- ICH Q9 (Quality Risk Management) : fournit les outils d'évaluation nécessaires pour mettre en place un management basé sur la compréhension et la maîtrise des risques (Figure 7).
- ICH Q8 (Pharmaceutical Development) : mise en place dès l'étape initiale du développement (Figure 7), met à profit les connaissances scientifiques à savoir les attributs qualité critiques sur la matière (CMA), le processus (CPP) et le produit (CQA), afin de définir un espace maîtrisé de conception du produit (QTPP). De cette approche naît le concept de qualité par la conception (QbD) (Figure 8), nouvelle approche révolutionnaire du développement pharmaceutique, conjointement soutenu par les industriels, la recherche académique et les autorités réglementaires. Elle doit conduire à des formulations robustes et à un taux de réussite élevé des approbations réglementaires [ICH, 2005 ; ICH, 2008 ; ICH, 2009 ; Garcia *et al.*, 2008 ; Poechlauer *et al.*, 2012].

L'utilisation conjointe des ICH Q8, Q9 et Q10 constitue une opportunité pour les industriels en matière de conformité réglementaire.

Ces lignes directrices sont complétées par l'ICH Q11 (Development and Manufacture of Drug Substances), qui fournit des clarifications sur les principes et les concepts décrits dans les précédents guides mentionnés ci-dessus sur le développement et la fabrication du médicament [ICH, 2012].

La méthodologie de travail fournie par les ICH constitue une avancée majeure dans le développement du médicament, leur utilisation conjointe une richesse. Elles seront complétées par l'ICH Q12 (Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management) qui donnera des éléments sur le management des changements (Matière, fabrication, contrôles) post-AMM de

manière prédictible et efficace tout au long du cycle de vie du médicament [ICH, 2014].

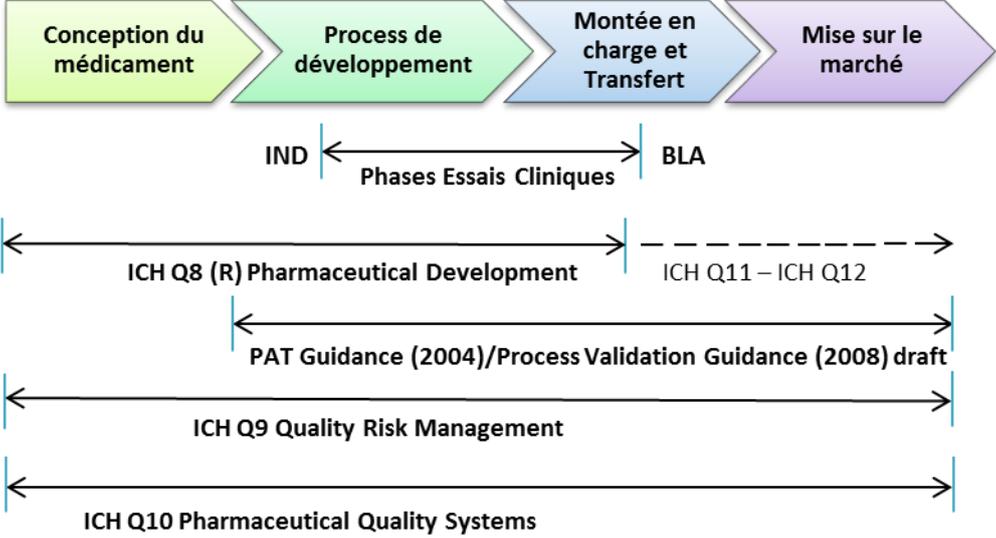


Figure 7 : Qualité le long du cycle de vie du médicament

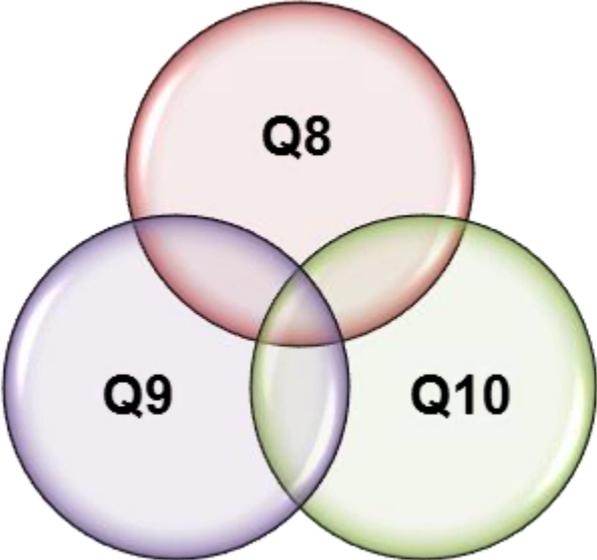


Figure 8 : L'approche QbD le long du cycle de vie du médicament

2. Production en continue : Apport de la technologie analytique des procédés (PAT)

Dans la guideline ICH Q8, il est stipulé que la qualité ne peut être testée dans le produit final, elle devrait y être intégrée ou devrait y être dans la conception [ICH, 2009] : ce qui présage un changement sur les modes de production. La méthode traditionnelle de production par lot demande beaucoup de temps dus aux interruptions multiples dans le processus de fabrication. De même, la mise en œuvre d'une montée en charge avec la méthode par lot constitue un grand défi. L'investissement dans les équipements de production en continue confère des avantages certains d'ordre économique et en qualité, une montée en charge facile et une réduction des variabilités interlots et une augmentation coût – efficacité par une réduction des coûts de production et une libération rapide des produits comparée à la méthode traditionnelle par lot. [Poehlauer *et al.*, 2012 ; Vanarase *et al.*, 2010]. L'optimisation de la qualité du produit fini peut s'effectuer par une surveillance en temps réel de la chaîne de fabrication (at-line, on-line and in-line monitoring) avec des outils du PAT et l'analyse statistique des données. Le PAT est une approche scientifique et d'analyse de risque permettant d'acquérir une compréhension du processus à travers des mesures à temps utile et constitue une véritable variable d'ajustement et d'amélioration continue. Le PAT déploie les techniques d'analyses (en temps réel) et chimométriques (RMN, FTIR) (Figure 9) et permet la surveillance des attributs physico-chimiques (CQAs) ou même des paramètres physiques (Température, la pression, le débit, etc.).

L'incertitude quant à l'exigence réglementaire, l'investissement initial élevé et l'incertitude du retour sur investissement ont entraîné une réticence au sein de l'industrie pharmaceutique en matière de traitement continu par PAT [Bakeev, 2010 ; Desai *et al.*, 2015].

A travers une meilleure compréhension du process (meilleur contrôle), et des prises de décisions basées sur le risque, QbD et PAT partagent des objectifs communs pour la production pharmaceutique. Elles permettent également un management approprié des changements (Matière, Produit ou Processus), ce qui constitue une opportunité au regard de la réglementation et un gain de temps et donc une opportunité économique.

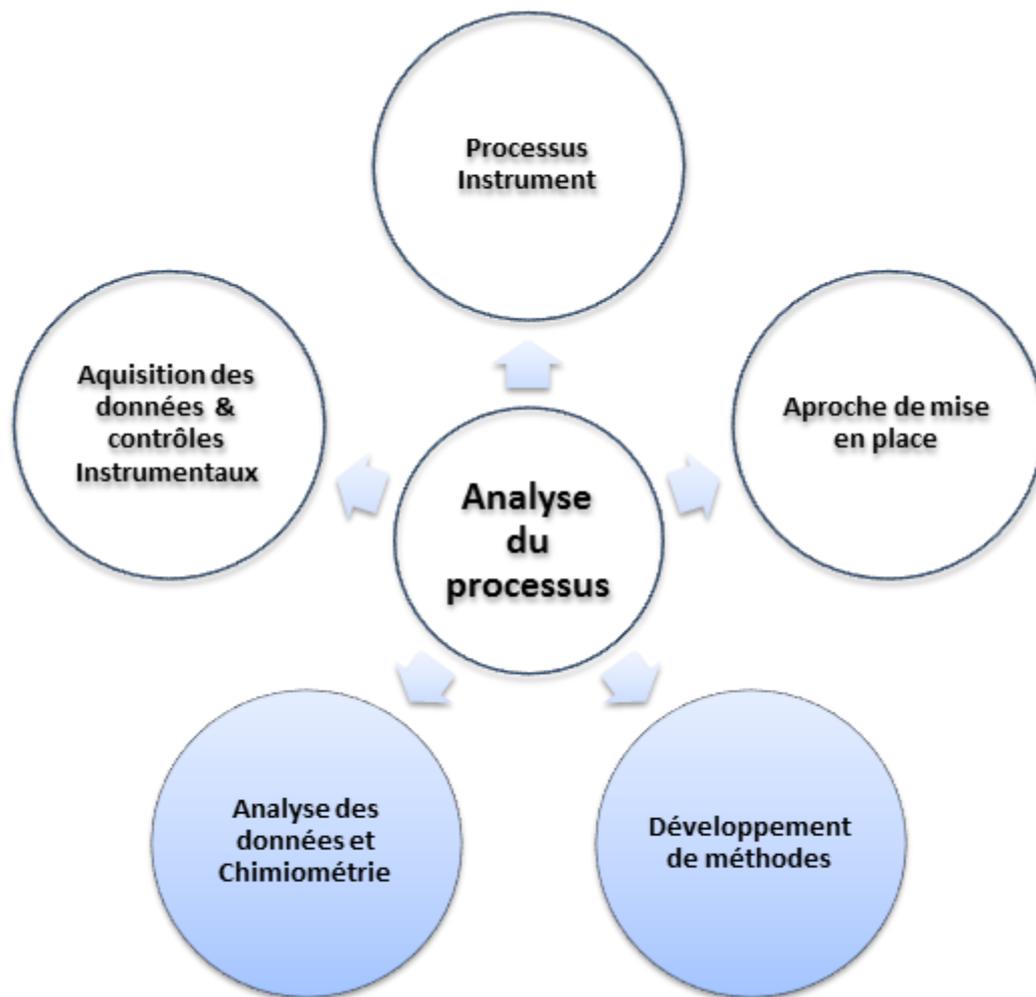


Figure 9 : Eléments essentiels de Technologie Analytique des Procédés

(Modifiée d'après [Bakeev K.A, 2010](#))

3. Article 1 - Illustration de l'importance de l'application combinée des ICH : « Management des risques appliqué au développement pharmaceutique du médicament ».

Article 1 : Management des risques appliqué au développement pharmaceutique du médicament

Ed Techniques de l'ingénieur PHA3051, 10 février 2016

Jean-Jacques HOURI, Mélisande BERNARD, Hassane SADOU YAYE, Bernard DO.



TECHNIQUES
DE L'INGÉNIEUR

Réf. : PHA3051 V1

Date de publication :
10 février 2016

Management des risques appliqué au développement pharmaceutique du médicament

Cet article est issu de : **Biomédical - Pharma | Médicaments et produits pharmaceutiques**

par **Jean-Jacques HOURI, Mélisande BERNARD, Hassane SADOU-YAYE, Bernard DO**

Mots-clés

management des risques
qualité | développement
pharmaceutique | qualité par la
conception | forme orale solide
| nouvelle forme
pharmaceutique

Résumé Cet article présente un exemple de gestion des risques liés aux procédés mis en œuvre dans le cadre du développement pharmaceutique d'une forme orale solide, avec intégration de la démarche de gestion des risques liés au procédé. Cette dernière consiste à identifier les situations à risque pour chaque attribut ou paramètre du procédé et à les analyser par rapport à leur probabilité de survenue, leurs conséquences et leur détectabilité. Les niveaux de risque correspondant peuvent ainsi être définis, permettant d'ajuster les conditions et les moyens de maîtrise complémentaires.

Keywords

quality risk management |
pharmaceutical development |
quality by design | solid oral
form | new pharmaceutical
form

Abstract This article presents an example of a quality-by-design approach used in the development of a solid oral dosage form, integrating the risk-based approach. The latter consists in identifying risk situations for each attribute or process parameter and analyzing them for their probability of occurrence, consequences and detectability, so as to establish associated risk levels, and allow appropriate conditions and a suitable control strategy to be implemented.

Chapitre 2 : Instrumentation

*"An essential condition for all fruitful research is to have at one's disposal a satisfactory technique. All scientific progress is progress in a method." M. Tswett
1910*

Chapitre 2 : Instrumentation

Les performances des méthodes analytiques modernes ont eu un impact sur la conception de la qualité du médicament, et ont fait évoluer positivement la réglementation des produits de santé. Il est possible avec ces techniques d'identifier, de suivre et de quantifier le comportement des produits tout au long de leur cycle de vie. Parmi ces méthodes, les méthodes séparatives et de caractérisation structurale (CLHP, MS, RX, FT-IR, RMN, etc.). Ce travail étant basé essentiellement sur les méthodes LC et MS, dans cette partie sont abordées les grandes évolutions ayant marqué ces instruments.

I. La chromatographie liquide haute performance (CLHP)

1. Introduction

En toute fin de XIX^{ème} siècle et début du XX^{ème} siècle, un jeune botaniste, M.S. Tswett s'est intéressé dans le cadre de ses recherches, à la séparation de la chlorophylle des caroténoïdes. Il a utilisé une colonne avec du carbonate de calcium comme adsorbant et un mélange éthanol / eau comme éluant, et a compris et décrit les phénomènes d'adsorption des pigments qui sont fonction de la force des solvants employés [Ettre, 2008]. Ses travaux étaient présentés le 30 décembre 1901 lors du XI^{ème} congrès du Russian Society of Natural Scientists qui s'est tenu du 20 au 30 Décembre 1901 à Saint Pétersbourg. Tswett est ainsi devenu le pionnier de la chromatographie, qui dès lors n'a cessé d'évoluer grâce à ses « disciples » qui ont repris le flambeau et décliné la chromatographie en ses différentes facettes.

Le 7 juin 1941, deux jeunes chercheurs A.J.P. Martin et R.L.N. Synge présentent leurs travaux sur la chromatographie de partage à la 214^{ème} rencontre du British Biochemical Society à Londres. Ils précisent la nature de la phase mobile qui peut être liquide, mais aussi gazeuse, ce qui a clairement posé les bases de la chromatographie de partage liquide – gaz et a permis également de comprendre que la phase stationnaire peut être solide ou liquide. Ces travaux leurs ont valu le prix Nobel de chimie en 1952.

En mars 1944 Martin et ses collaborateurs décrivent pour la première fois la chromatographie sur papier lors du meeting annuel du Biochemistry Society. Cette technique a permis à F. Sanger d'élucider les séquences d'acides aminés et de caractériser la séquence complète de l'insuline, travail couronné par le prix Nobel de chimie en 1958 [Majumdar, 2001].

La chromatographie d'échange d'ions est développée avec les premières publications sur les métaux rares en 1949 ; et les premiers instruments de chromatographie liquide haute performance (CLHP) et de chromatographie en phase gazeuse (CPG) font leur apparition dans les années 60.

Ainsi, la CLHP occupe de nos jours une place importante dans les sciences de la vie. En sciences pharmaceutiques, les méthodes chromatographiques ont constitué des méthodes de référence et de choix pour la recherche fondamentale, la production et le contrôle des substances actives pharmaceutiques, comme l'illustrent les monographies des pharmacopées internationales. Aussi, elle sert en pharmacologie – toxicologie comme outil de pointe pour l'observance thérapeutique et l'étude des métabolites. De même, la chromatographie est précieuse pour les sciences de l'environnement et de l'agroalimentaire pour la caractérisation et le suivi des polluants et leur impact sur divers écosystèmes. Parmi les paramètres chromatographiques, la phase stationnaire de la colonne et les paramètres de phase mobile sont de loin les plus importants et se trouvent au cœur des stratégies des développements analytiques, conditionnant le succès de la méthode de séparation.

2. Les phases stationnaires en chromatographie liquide

2.1. Avancées technologiques

Du début de la chromatographie moderne à nos jours, les progrès technologiques dans le domaine des colonnes ont été les plus remarquables et ont dépassé de loin l'instrumentation. Cette mutation a débuté dans les années 70, avec la mise en œuvre de réflexions par les constructeurs de colonnes afin d'améliorer l'efficacité et la rapidité des séparations. De progrès majeurs ont vu le jour et ont permis de comprendre les propriétés physico-chimiques des phases stationnaires avec la proposition de supports de grandes puretés chimiques, la grande maîtrise de la taille et de la nature des particules indispensable pour la reproductibilité des analyses,

ainsi que la miniaturisation des colonnes leur conférant des propriétés spécifiques de séparation (Tableau 2).

Tableau 2 : Historique des avancées technologiques des colonnes

Période	Evènements majeurs en lien avec les colonnes de CLHP
1970 – 1980	<ul style="list-style-type: none"> - Phases greffées - Phases pelliculaires - Phases poreuses de faible diamètre de particules - Switch de la phase normale à la phase inversée
1980 – 1990	<ul style="list-style-type: none"> - Phases greffées et géométrie des particules - Particules sphériques - Phases chirales - Systèmes de pompages - Evaluation des gradients d'élution - Miniaturisation des colonnes
1990 – 2000	<ul style="list-style-type: none"> - Couplage des colonnes CL avec la spectrométrie de masse - Colonnes « narrow-bore » - Particules perfusives et particules « Core Shell ou Fused-Core » - Particules hybrides inorganiques / organiques - Phases stationnaires monolithiques - Réduction de la taille des particules à 5 et 3 μm et réduction de la longueur des colonnes à 15 cm - Particules non poreuses < 2μm
2000 – 2011	<ul style="list-style-type: none"> - Introduction du concept UPLC avec les particules « sub – 2 μm » et une séparation rapide - Amélioration de l'efficacité des colonnes - Redécouverte du lien central entre sélectivité et résolution

Parmi les différents types de phases stationnaires, celles à base de silice sont de loin les plus largement utilisées en chromatographie liquide haute performance [Berthod, 1991]. Cela réside dans ses propriétés spécifiques telles que la grande efficacité du fait de la structure poreuse, la résistance mécanique aux fortes pressions de la pompe, les propriétés rapides de transfert de masse ou encore les bonnes capacités de rétention et de sélectivités.

2.2. Pureté des silices

La silice est un produit amorphe comportant plusieurs types de groupes silanol à sa surface (Figure 10), se caractérisant par leur abondance relative et leur acidité (Tableau 3).

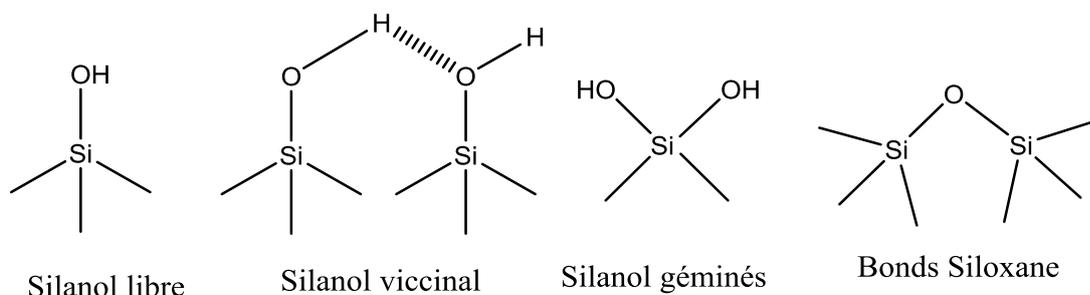


Figure 10 : Types de silanols à la surface de la silice

Tableau 3 : Acidité et abondance relative des silanols

Différents types de silanols	Acidité	Concentration
Silanols libres	Plus acides	Plus faible
Silanols géminés	Moyenne	Moyenne (25 à 30 %)
Silanols liés (liaisons H)	Plus faible	Plus grande

Les matières premières de départ comportent des métaux lourds (fer ferrique) et d'autres impuretés comme de l'aluminium. La présence d'ions métalliques influence

la liaison de ligands de phases stationnaires, tels que les C18, à la surface de la silice. Les ions métalliques peuvent également augmenter l'acidité des groupes silanols adjacents, conduisant à l'élargissement de pics des composés basiques ou même à une adsorption irréversible sur la phase stationnaire (Figure 11).

Les plus anciens dits du type A sont moins purs, avec des silanols plus acides sont peu adaptés à la séparation des composés acides et basiques et présentent beaucoup de variabilités interlots. Les silices du type B, de mode de production différent des précédents (tetraéthylorthosilicate (TEOS) polycondensé), sont plus purs, avec des silanols moins acides, plus adaptés pour les composés acides et basiques, et une très grande reproductibilité [Engelhardt *et al.*, 1999]. Récemment des silices du type C, constitués de matériels hybrides de silice de très hautes puretés ont été développés. A la place des groupements silanols (Si – OH), la surface de ces nouvelles phases stationnaires est faite de groupements non polaires hybrides de silicium (Si – H) [Pesek *et al.*, 2012 ; Pesek *et al.*, 2013]. Avec la diminution des groupements silanols, les silices hybrides sont adaptées à l'analyse des composés pharmaceutiques, avec une résolution maximale et des pics très pointus.

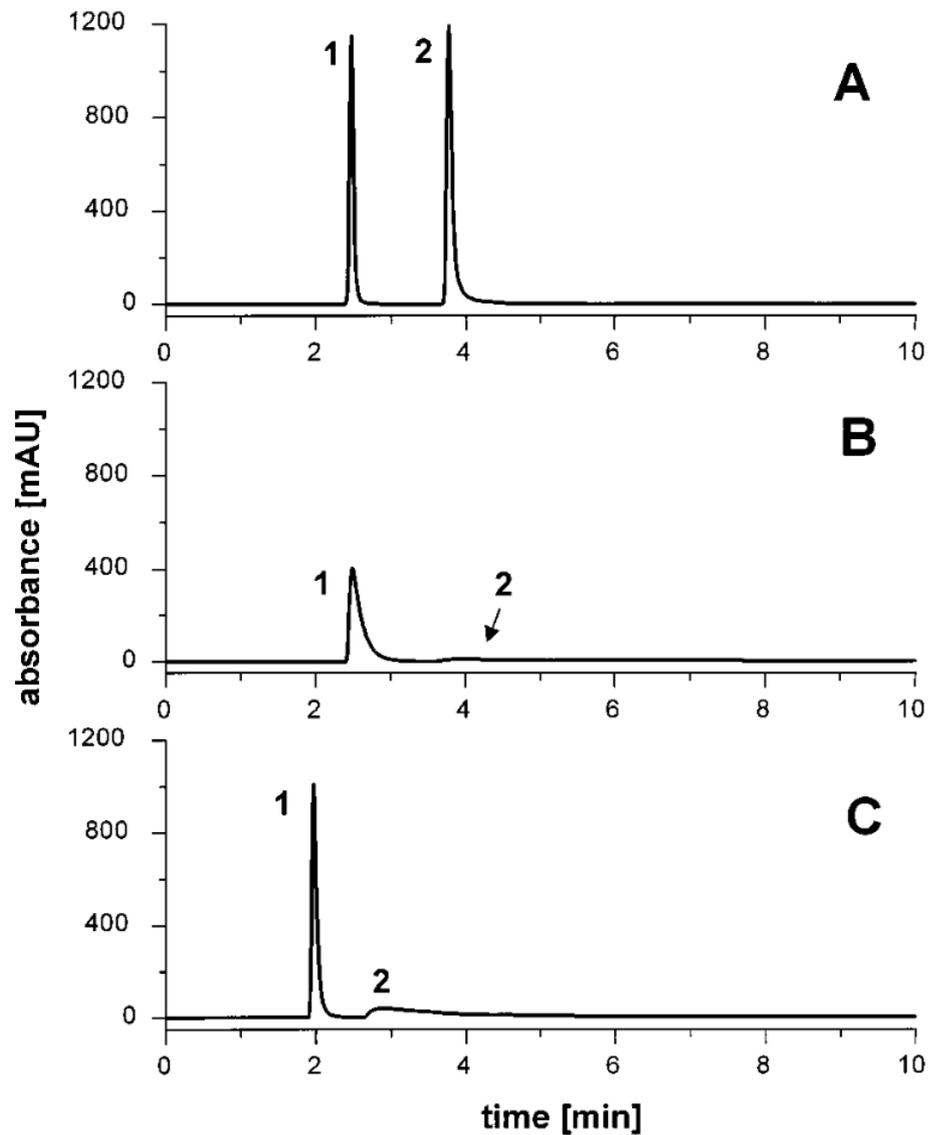


Figure 11 : Différenciation entre les activités des silanols et des métaux sur les colonnes C18 RP (pic 1, 4,4'-bipyridyl; pic 2,2,2'-bipyridyl): colonne A, faible activité des silanols, faible teneur en métaux; colonne B, forte activité des silanols, forte teneur en métaux; colonne C, faible activité des silanols, forte teneur en métaux

(D'après Engelhardt *et al.*, 1999).

2.3. Comparaison des colonnes – Cas des colonnes RP

De nos jours, un nombre croissant de colonnes sont disponibles dans le commerce, d'où l'importance de choisir une colonne adéquate pour des applications spécifiques

(séparation de composés de mélanges complexes). Le développement de méthodes de caractérisation fournit de solides informations sur les propriétés des colonnes et guide à l'orientation minutieuse pour leur choix.

La qualité de la séparation chromatographique se mesure grâce à la résolution (R_s) qui dépend de l'efficacité de la colonne (N), de la sélectivité (α) et du facteur de rétention (k) :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{2} \times \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \right] \times \left[\frac{k}{k + 1} \right]$$

La sélectivité des colonnes utilisées pour la chromatographie liquide en phase inverse peut être caractérisée quantitativement par la relation [Kaliszan et al, 1999 ; Wilson et al., 2002 ; Abraham et al., 2004]:

$$\log(k/k_{ref}) \equiv \log \alpha = \eta'H + \sigma'S + \beta'A + \alpha'B + \kappa'C \quad (1)$$

(i) (ii) (iii) (iv) (v)

où k est le facteur de rétention d'un soluté donné et k_{ref} celui du soluté de référence l'éthylbenzène. Les paramètres de sélectivité η' , σ' , β' , α' et κ' sont liés aux propriétés de l'analyte, alors que H, S, A, B et C sont liés aux propriétés de la colonne. Les termes (i), (ii), (iii), (iv) et (v) représentent les contributions des paramètres de rétention de l'analyte et la sélectivité de la colonne. Comme l'illustre la figure 12, chaque colonne se caractérise par :

- ✓ Son caractère hydrophobe (H), qui augmente quand l'hydrophobicité augmente
- ✓ Son accessibilité stérique (S), qui diminue quand l'encombrement stérique augmente
- ✓ Ses caractères acide (A), basique (B) et échangeur de cation (C). A et C augmentent quand l'accessibilité des silanols libres augmente et que le taux de greffage baisse.

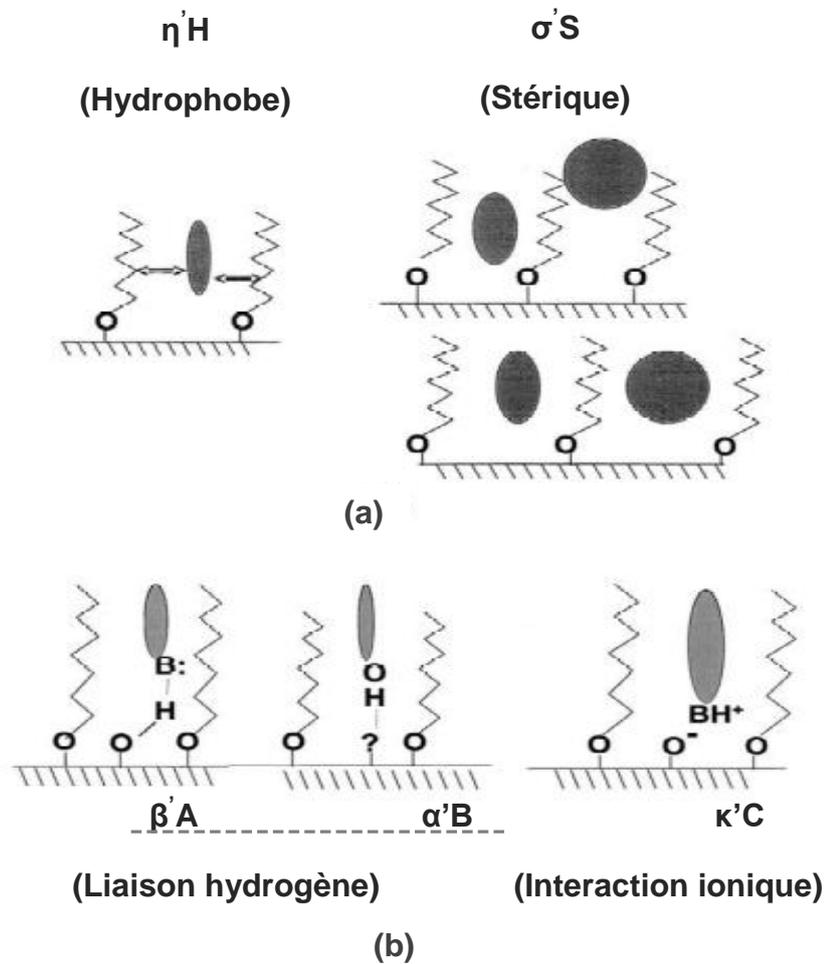


Figure 12 : Représentation des mécanismes de rétention correspondant aux différents paramètres de l'équation 1

(Modifiée d'après Wilson *et al.*, 2002).

L'expérimentation permet de déterminer les données quantitatives de ces paramètres. L'hydrophobicité peut être déterminée par exemple, par injection de pentylbenzène et de butylbenzène, en utilisant une phase mobile composée de méthanol et d'eau (80:20, v/v) [Euerby *et al.*, 2003 ; Euerby *et al.*, 2005].

La sélectivité représente ainsi le paramètre le plus critique permettant de comparer l'équivalence de 2 colonnes (Figure 13) [Gilroy *et al.*, 2003 ; Gilroy *et al.*, 2004].

Partant des données quantitatives de l'équation (1), il est possible de comparer la sélectivité de 2 colonnes avec la fonction de sélectivité F_s :

$$F_s = [(H_2 - H_1)^2 + (S_2 - S_1)^2 + (A_2 - A_1)^2 + (B_2 - B_1)^2 + (C_2 - C_1)^2]^{1/2} \quad (2)$$

où les indices 1 et 2 se réfèrent aux colonnes 1 et 2.

Il en découle que :

- ✓ Si $F_S \leq 3$, la sélectivité et la séparation entre les 2 colonnes sont identiques
- ✓ Si $F_S > 3$, la sélectivité ainsi que les séparations des 2 colonnes ne sont pas équivalentes.

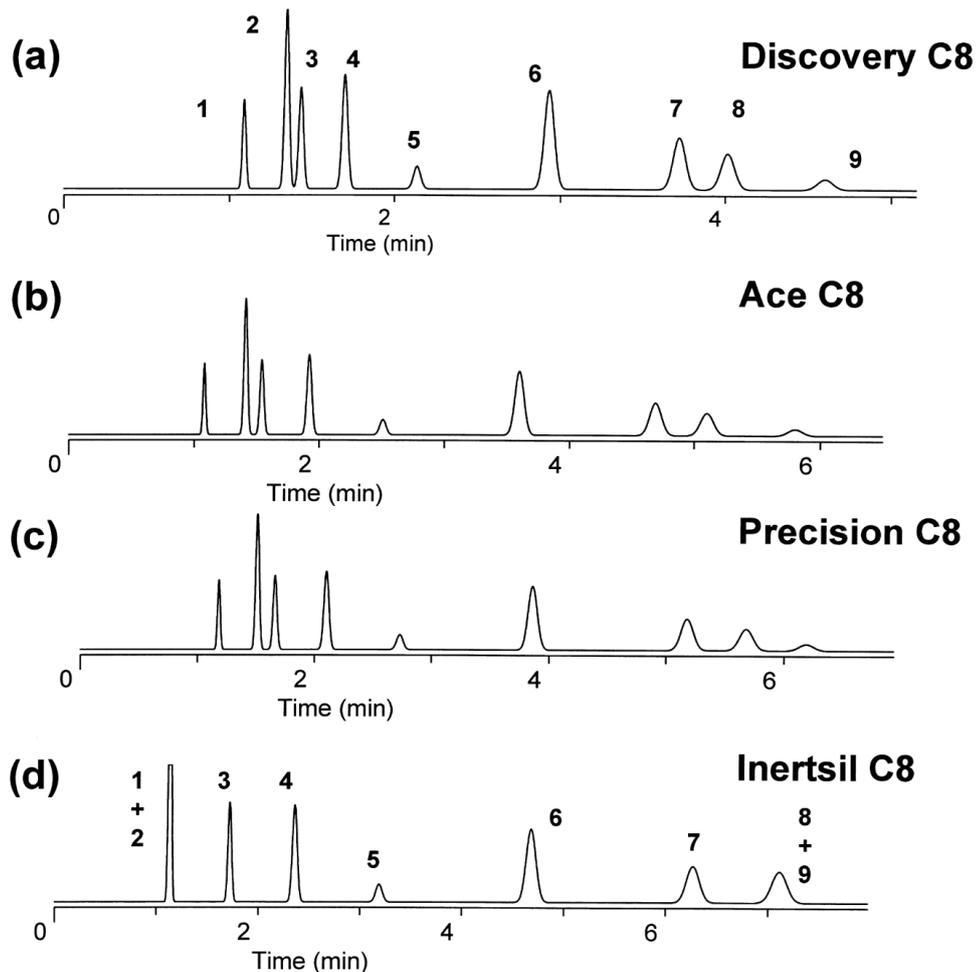


Figure 13 : Comparaison de la sélectivité de la colonne Discovery C8 avec 3 colonnes C8 (a-d). F_S (Ace C8 - Discovery C8) = 1; F_S (Precision C8 - Discovery C8) = 4; F_S (Inertsil C8 - Discovery C8) = 38. Analytes : (1) N,N-diethylacetamide; (2) nortriptyline; (3) 5,5-diphenylhydantoïne; (4) benzonitrile; (5) anisole; (6) toluene; (7) cis-chalcone; (8) trans-chalcone; (9) acide méfenamique.

(D'après Gilroy *et al.*, 2003)

2.4. Phase mobile et comparabilité des phases stationnaires

Le solvant a une très grande influence dans la comparaison des colonnes pour être considéré comme un facteur mineur. Les paramètres de phases mobiles sont aussi importants que l'architecture de la phase stationnaire. La nature du solvant a un impact sur les facteurs de rétention, les sélectivités et les symétries des pics pour les composés neutres ou basiques [Le Mapihan *et al.*, 2003 ; Le Mapihan *et al.*, 2005]. En outre, il a été démontré que la robustesse des analyses peut dépendre en plus de la proportion de la phase mobile, du pH, de la température et de la concentration du tampon [Le Mapihan *et al.*, 2004 ; Al Bakain *et al.*, 2017].

2.5. Apport des phases stationnaires « mix-mode »

Si les phases stationnaires traditionnelles utilisées en chromatographie en phase normale, inverse, d'échange d'ions ou d'exclusion stérique font appel essentiellement à des mécanismes d'interaction hydrophobe, hydrophile et d'interaction ionique respectivement, de nouvelles phases récemment développées appelées « mix-mode stationary phase », utilisent une combinaison de deux ou plusieurs de ces modes d'interaction [Issaq *et al.*, 1988 ; Ordoñez *et al.*, 2012 ; Nogueira *et al.*, 2015 ; Alvarez-Segura *et al.*, 2016]. La chromatographie liquide utilisant plusieurs modes de séparations permet de retenir et de séparer les petites molécules, les médicaments polaires et les substances apparentées qui ne sont pas retenus par la CLHP RP classique [Zimmermann *et al.*, 2014 ; Qiao *et al.*, 2015].

2.6. Stabilité physico-chimique de la silice des phases RP

L'analyse des composés acides ou basiques sous leurs formes non ioniques requiert l'utilisation de supports munis de grandes résistances aux pH extrêmes. Aux pH acides les phases stationnaires à base de silice subissent une hydrolyse de la liaison siloxane de greffage entraînant la perte du greffon. En milieu alcalin, c'est une dissolution de la silice qui est redoutée [Kirkland *et al.*, 1989]. De même, la température est un paramètre important duquel dépend le taux de dissolution de la silice et l'hydrolyse des liaisons siloxanes. Ainsi, selon la technologie de la colonne, la nature chimique des liaisons de greffage et les groupements fonctionnels, les

colonnes n'auront pas la même longévité vis-à-vis des conditions de stress auxquelles elles peuvent être soumises (pH, température, tampon, phase organique, ...) [Claessens *et al.*, 2004 ; Borges *et al.*, 2012]. Deux types d'études de stabilité sont réalisés par les fabricants pour évaluer la stabilité des phases stationnaires : une étude de stabilité dans les conditions réelles d'utilisation des colonnes (20 – 40 °C, 5 – 25 mM de tampon et un pH 2 – 8) et une étude dans des conditions de stress à la température (80 – 150 °C), à des pH extrêmes (1 – 5% TFA ou un pH basique de 10 – 12) et à de fortes concentrations de tampon (< 100 mM). Les résultats sont exprimés en temps d'exposition ou sont fonction du volume de la colonne [Claessens *et al.*, 2004 ; Borges *et al.*, 2013].

De façon générale, les phases stationnaires hybrides de par leur faible taux de silanols libres sont plus stables aux pH alcalins que les phases stationnaires RP traditionnelles [Claessens *et al.*, 2004]. Pour la résistance aux pH acides, comme illustré à la figure 14 [Borges *et al.*, 2013], la longueur des chaînes utilisées pour le greffage ou la coiffe (endcapping) confère une protection vis-à-vis des pH acides.

Pour ce qui est de la température, de nombreuses études ont démontré l'augmentation des taux de dissolution de la silice avec l'augmentation de la température avec les phases stationnaires RP traditionnelles [Claessens, 2001]. A cet égard, les phases stationnaires hybrides dénotent d'une bonne robustesse avec une bonne stabilité aux hautes températures [Wiese *et al.*, 2011].

De façon générale, les silices greffées ont une durée de vie plus grande avec des tampons borate, glycine (ou tampons de base organique) qu'avec des tampons phosphate ou carbonate. Ces derniers sont des bases dures de Lewis, plus agressives que les bases molles (Figure 15) [Claessens *et al.*, 1996].

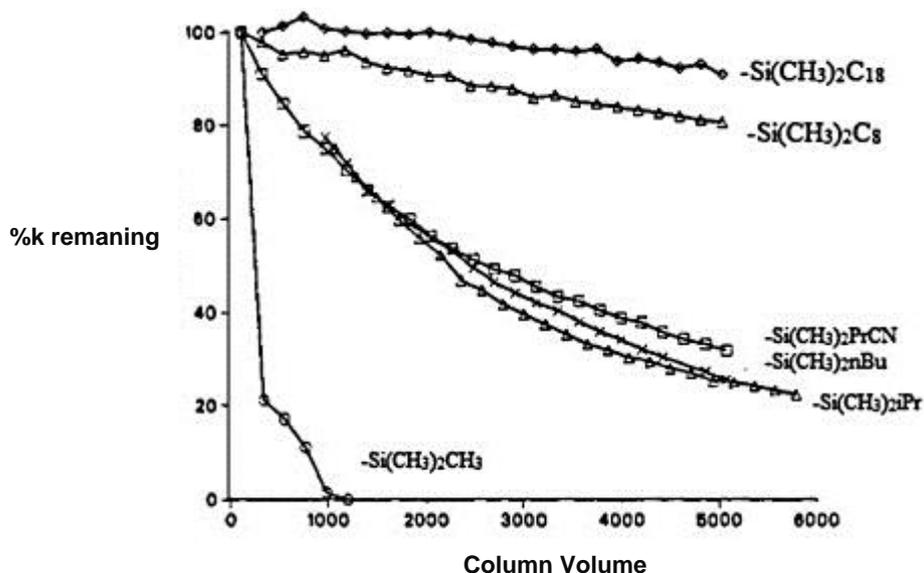


Figure 14 : Evolution du facteur de rétention en fonction de la longueur du greffon à pH = 2 et T = 50°C (eau + 0,2% TFA (pH=2) / ACN (gradient 0 à 100% ACN en 80 min)).

(D'après Borges *et al.*, 2013)

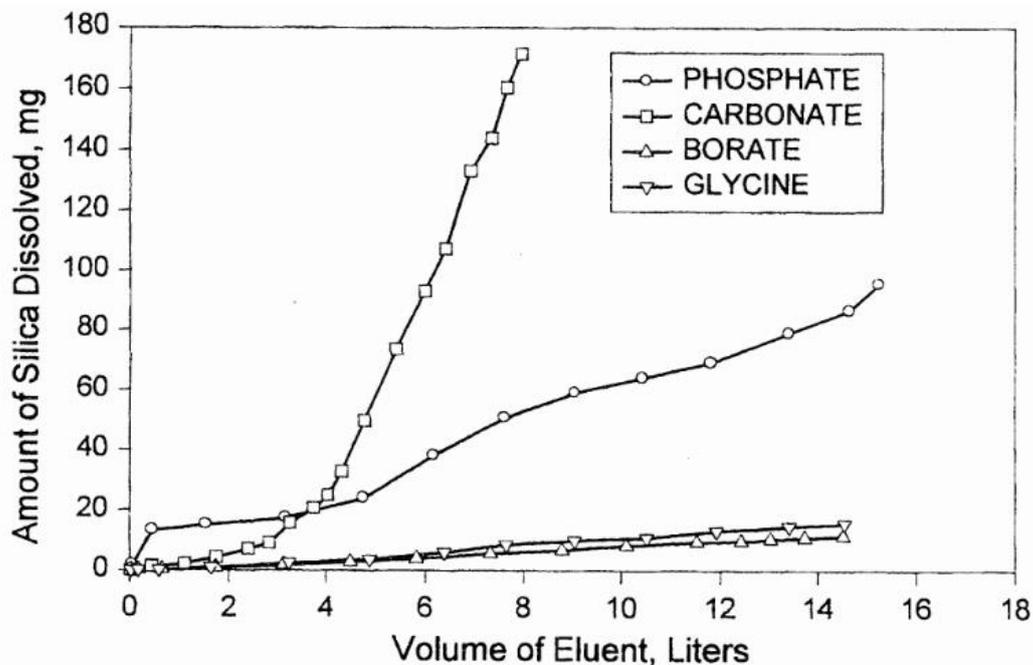


Figure 15 : Influence de la nature du tampon sur la stabilité de la phase stationnaire de silice. pH = 10 et T = 25°C (MeOH/tampon 0,1M 50/50 v/v) Colonne Zorbax Rx-C18, 150 x 4,6 mm.

(D'après [Claessens et al., 1996](#)).

3. Détecteurs

Le détecteur est le second composant le plus important d'un système CLHP après la colonne. Après l'étape d'élution des composés sur la colonne, la qualité de la séparation est inextricablement liée aux performances du détecteur. La sphère des détecteurs a également connu une évolution fulgurante ces cinquante dernières années. Quatre principes physiques ont donné naissance aux quatre modes de détection universelles, parmi les plus utilisés aujourd'hui : l'absorption ultraviolet – visible (UV-Vis), la réfractométrie, la conductimétrie et la fluorescence. De nos jours, la miniaturisation et la complexification des analyses ont engendré l'apparition de nouvelles variétés de détecteurs comme la spectrométrie de masse, la détection électrochimique ou encore la détection par fluorescence induite par laser.

Le choix d'un détecteur en CLHP prend en compte un certain nombre d'éléments essentiels parmi lesquels [[Danilo Corradini, CRC Press 2010](#) ; [Serban et al., Elsevier 2012](#)] :

- ✓ La disponibilité du détecteur,
- ✓ Le but de l'analyse,
- ✓ Les performances du détecteur,
- ✓ Les propriétés de l'analyte,
- ✓ Le type d'élution (isocratique ou gradient),
- ✓ Les propriétés de la phase mobile utilisée,
- ✓ La stabilité / fiabilité du détecteur,
- ✓ La facilité de maintenance et d'utilisation.

Pour une analyte donnée, un détecteur se caractérise par sa sensibilité, sa linéarité, la reproductibilité de sa réponse, sa limite de détection, sa stabilité aux changements de flux et aux paramètres environnementaux et sa capacité à ne pas contribuer à l'élargissement des pics.

Plusieurs types de détecteurs peuvent être couplés à la chromatographie liquide de haute performance. Les plus utilisés sont les détecteurs Ultraviolet (UV), le détecteur à barrettes de diodes (DBD) et les spectromètres de masse (SM). La plupart des

détecteurs permettent une identification à travers une comparaison par rapport à une substance chimique de référence (SCR), mais ne donnent pas d'informations sur la structure, ce qui est limitant notamment pour l'identification de composés inconnus. Par exemple, la détection UV est limitée aux composés ayant des groupes chromophores (structures comportant des doubles liaisons conjuguées), mais n'est pas adapté aux composés qui n'absorbent pas dans la région de l'UV.

A cet égard, les spectromètres de masse et les détecteurs à barrettes de diodes fournissent des informations supplémentaires utiles pour l'identification des composés.

a) Les détecteurs UV et à barrettes de diodes

La détection UV en CLHP à longueur d'onde fixe a été utilisée pour la première fois en 1966 par Horvath et Lipsky [[Horvath et al., 1966](#)]. La découverte de la détection à barrettes de diodes en 1982 a apporté une avancée substantielle par rapport à la détection à longueur d'onde fixe [[Danilo Corradini, CRC Press 2010](#)].

Avec la détection UV ou à barrettes de diodes, la réponse d'une analyte est fonction de sa concentration telle que définie par la loi Beer – Lambert :

$$A = \epsilon lc$$

où A est l'absorbance, ϵ représente le coefficient d'extinction molaire très variable d'un composé à l'autre, l est la longueur du trajet optique et c la concentration molaire de l'analyte. L'absorbance varie en fonction de la température, du pH, la polarité du solvant et sa longueur d'onde de cut-off dans l'UV [[Roe, 1956](#)].

Les détecteurs à barrettes de diodes restent largement utilisés. Ils sont capables d'enregistrer le spectre d'absorption complet en un temps court, avec une faible perte de sensibilité. Les spectres tridimensionnels sont enregistrés en fonction du temps et de la longueur d'onde. De ce fait, l'accès à tout moment au spectre UV-Visible de la phase mobile éluée aide à l'identification des solutés inconnus par comparaison des spectres UV des solutés avec ceux des SCR stockées en bibliothèque. Ce type de détecteur permet de sélectionner la longueur d'onde optimale de détection pour chaque soluté.

Le couplage de la CLHP avec un DBD peut également servir à la vérification des puretés des pics chromatographiques.

b) Interfaces LC–MS

L'avènement du couplage chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse (LC – MS), avec les progrès réalisés sur l'instrumentation a complètement changé le visage des sciences séparatives, et constituent des outils de première intention dans la découverte de nouveaux médicaments.

Le couplage LC – MS constitue un défi analytique physico-chimique, de telle sorte qu'il est nécessaire de prendre en compte la compatibilité des solvants (solvants volatils), du comportement des analytes dans ces solvants et du débit de la phase mobile. De même, il est important de tenir compte de la restriction possible des composés analysables : les composés peuvent se dissoudre dans des solvants en LC, cependant pour la MS, il est important de considérer aussi la masse moléculaire, la polarité et la stabilité des analytes.

II. La Spectrométrie de Masse (SM)

1. Introduction

L'avènement de la spectrométrie de masse dans l'étude des produits organiques a débuté dans l'industrie pétrolière dans les années 40, et a beaucoup été influencé par la seconde guerre mondiale avec l'augmentation des demandes de production et des produits dérivés du pétrole. D'imminents chercheurs comme McLafferty, Fales ou Beckey étaient directement impliqués dans la guerre, servant l'armée [Nier *et al.*, 2015].

La spectrométrie de masse a complètement bouleversé l'analyse élémentaire des composés organiques. Les dernières technologies donnent accès à la masse exacte avec des pouvoirs de résolution de l'ordre de la ppm. La SM couplée à de bonnes bases de données est capable de permettre l'identification de composés inconnus, ce qui remet en cause l'assertion de Roberts L., : « As any analytical chemist knows, what you see depends on what you look for » [Roberts L, 2000].

Un spectromètre de masse nécessite l'utilisation de trois entités différentes interconnectées:

- ✓ **La source d'ionisation** : les molécules de l'échantillon sont soumises à un faisceau d'électrons à haute énergie, convertissant certaines en ions
- ✓ **L'analyseur des ions** : soumis à l'accélération d'un champ électrique, les ions sont séparés selon le ratio de leur masse sur leur charge (m/z)
- ✓ **La détection des ions** : après la séparation, le spectromètre assure pour chaque catégorie de populations d'ions, une analyse qualitative et quantitative.

Un vide poussé ($\sim 10^{-6}$ torr) est généré tout au long du dispositif, de l'introduction de l'échantillon à sa détection. Les spectromètres de masse se distinguent par la nature de ces 3 composants essentiels.

2. La source d'ionisation

2.1. Introduction

La séparation et la détection des molécules en spectrométrie de masse requièrent nécessairement leur ionisation. Dans ses débuts dans l'analyse des hydrocarbures et des composés organiques, l'ionisation par impact électronique était la méthode de choix. Puis sont apparues vers la fin des années 50, les méthodes d'ionisation au moyen de champs (Field Ionisation et Field Desorption) dans un souci de simplifier le spectre de masse. L'ionisation chimique quant à elle, est introduite en 1966 grâce aux travaux de Munson. B *et al.* [Munson *et al.*, 1966].

Ces développements ont été motivés par le besoin d'augmenter l'abondance relative des ions moléculaires et d'améliorer les informations sur les masses moléculaires et de simplifier la complexité des spectres de masse. Ces efforts ont permis de nouvelles prouesses dans le domaine des sources d'ionisation avec l'amélioration des méthodes de désorption par champ (matrix assisted laser desorption ionization [MALDI]), et l'apparition de l'ionisation par électro-nébulisation (Figure 16). Toutes ces évolutions ont révolutionné l'analyse chimique des composés organiques.

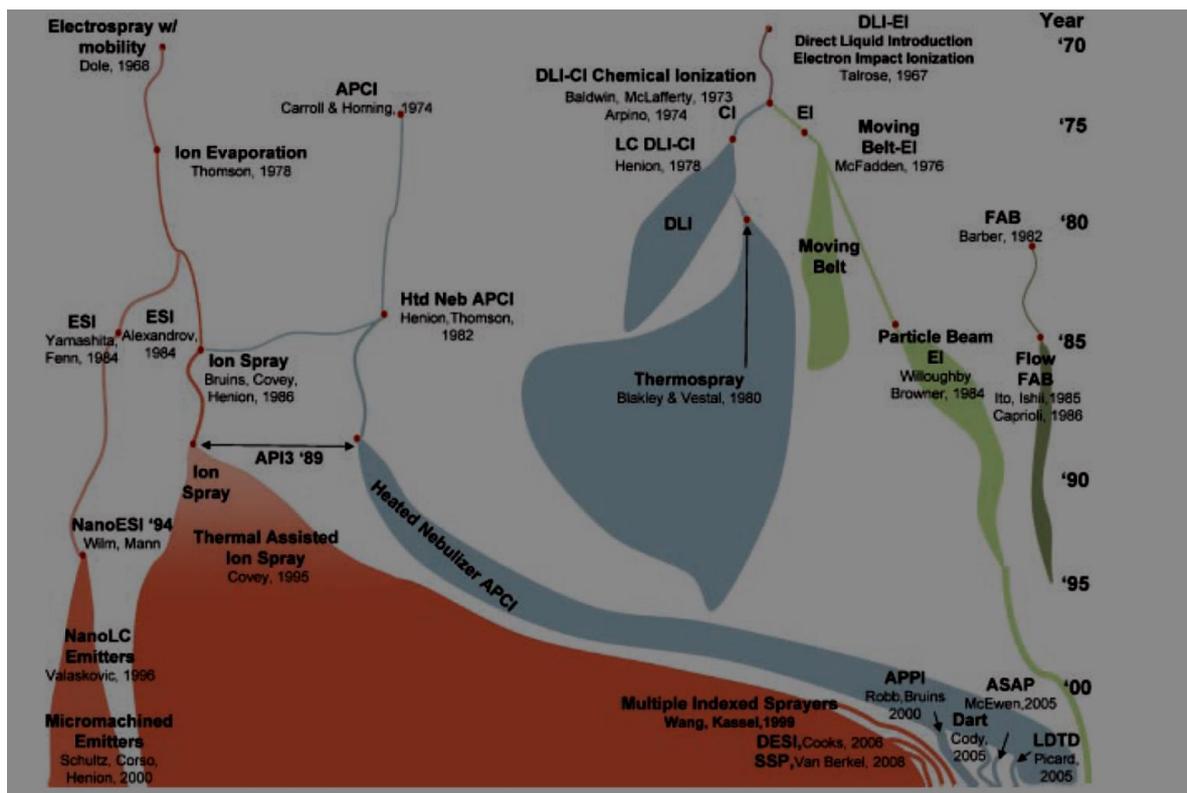


Figure 16 : Evolution des sources d'ionisation des années 70 à nos jours

(D'après Covey *et al.*, 2009).

2.2. Techniques d'ionisation à pression atmosphérique

Les molécules sont ionisées à la pression atmosphérique, collectées puis transférées au spectrophotomètre de masse. Trois méthodes sont décrites et disponibles dans le commerce et se caractérisent par leurs propriétés : l'application de champs électriques à haute tension (ESI), de décharge électrique (APCI) et d'irradiation par une source UV (APPI) (Figure 17).

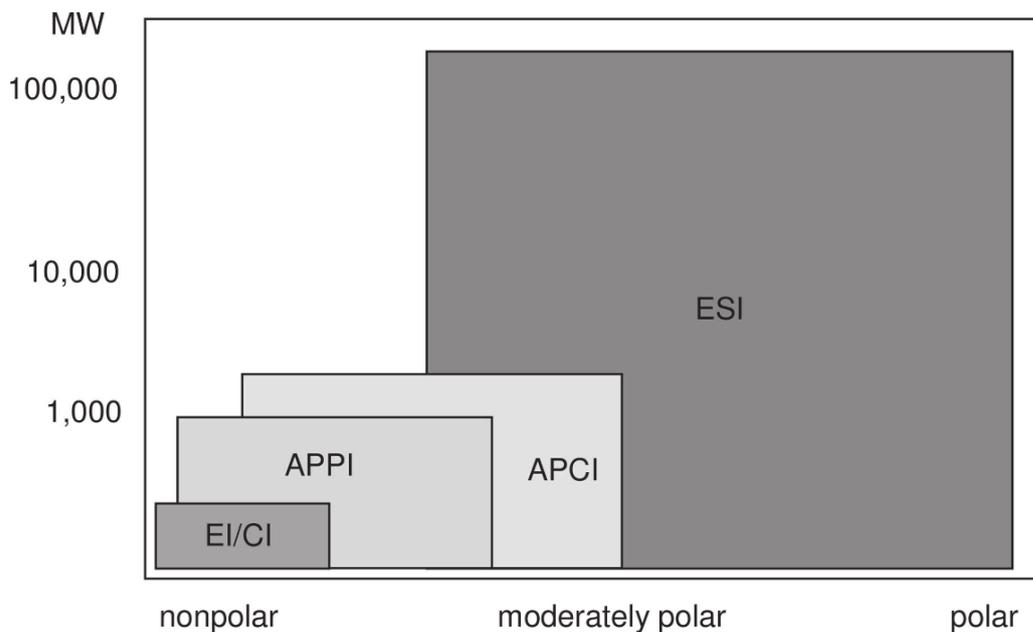


Figure 17 : Champs d'application des différents modes d'ionisation à pression atmosphérique

(D'après Thermo Fisher Scientific, 2007).

2.2.1. Ionisation par électro-nébulisation : Electrospray Ionisation (ESI)

La découverte de l'ionisation par électrospray (ESI) par Fenn *et al.* à la fin des années 1980 a supprimé la barrière de volatilité pour la SM des très grosses molécules et a fait de la spectrométrie de masse un outil essentiel pour la recherche, permettant des ionisations à pression atmosphérique et à température ambiante. L'ionisation par electro spray est la technique la plus performante des méthodes d'ionisation à pression ambiante du fait de son large domaine d'application allant des petites molécules aux protéines (Figure 17).

L'échantillon en solution est introduit à l'aide d'un capillaire dont l'extrémité traverse une aiguille métallique portée à une tension de 3 à 5 kilovolts. Il en résulte la formation de gouttelettes, puis d'un cône (cône de Taylor) dû à la tension de surface du liquide liée aux répulsions électrostatiques mutuelles de surface. Les espèces mono- ou poly-chargées subissent l'action du champ électrophorétique et l'électro-nébulisation est générée pour une valeur du champ électrique E_0 égale à :

$$E_0 = \left(\frac{2\gamma \cos 49^\circ}{\epsilon_0 r_c} \right)^{1/2}$$

où γ est la tension de surface du liquide, 49° est le demi-angle du cône de Taylor, ϵ_0 est la permittivité du vide et r_c le rayon du capillaire.

Un flux d'azote, généralement dirigé à contre-courant du trajet des ions réduit la taille des gouttelettes par désolvatation, augmente la densité de charge sur leur surface, et génère la formation des ions en phase gazeuse après explosion coulombienne (Figure 18).

Les ions sont de types $(M + nH)^{n+}$ ou $(M - nH)^{n-}$ respectivement en modes positif ou négatif et où M est la masse moléculaire, n le nombre de charge porté par l'ion considéré, et H la masse du proton. Des adduits cationiques peuvent également se former [Yamashita *et al.*, 1984 ; Fenn *et al.*, 1990].

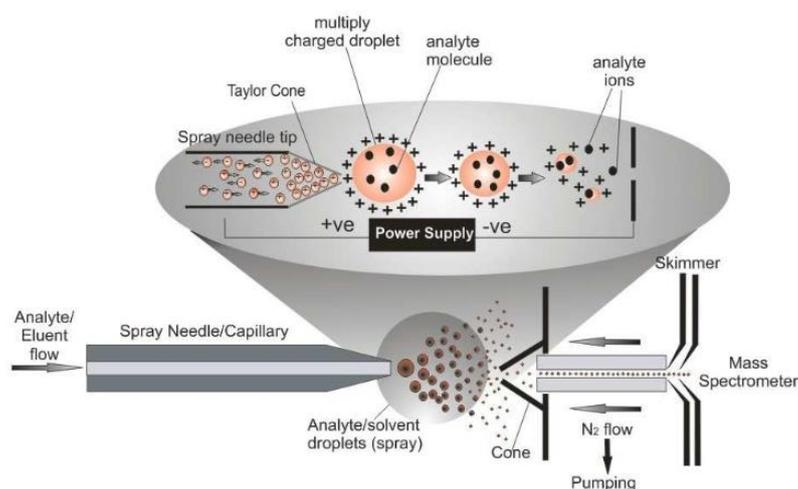


Figure 18 : Représentation de la source d'ionisation par électro nébulisation

(D'après Crotti *et al.*, 2006).

2.2.2. L'ionisation chimique à pression atmosphérique : Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

L'APCI a été introduite au milieu des années 1970 par les équipes de Horning *et al.* et de Carroll *et al.* [Horning *et al.*, 1974a ; Horning *et al.*, 1974b ; Carroll *et al.*, 1975]. La source APCI est équipée d'un nébuliseur pneumatique chauffé et d'une pointe électrode (aiguille de décharge couronne) à haut voltage qui émet des électrons ionisants par un phénomène de décharge couronne (Figure 19) [Tsipi *et al.*, 2015]. L'APCI est préférée à l'ionisation par électro-nébulisation pour les molécules de

faible masse moléculaire (<1000 Da) et pour les molécules de moyenne à faible polarité (Figure 17). La solution contenant les composés à analyser est vaporisée en fines gouttelettes par un flux d'azote ou d'air, puis complètement vaporisée par échange thermique (350 – 550 °C). L'application d'un haut voltage (3 à 5 kV) à l'aiguille de décharge couronne provoque une décharge électrique lumineuse de ~2-3 μA qui constitue une source constante d'électrons. Quand le potentiel appliqué est positif, des électrons sont captés. Des électrons sont émis en présence d'un potentiel négatif. Ces électrons émis ou captés par l'aiguille de décharge couronne sont à l'origine d'une série de réactions chimiques en phase gazeuse qui débute par l'ionisation de l'air autour de la pointe de l'aiguille, puis d'une cascade de réactions entre les ions formés et les molécules neutres, formant des ions réactifs susceptibles d'interagir à leur tour avec les molécules pulvérisées.

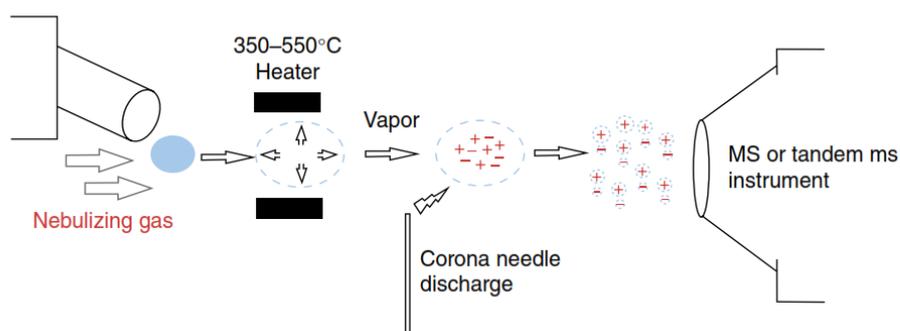


Figure 19 : Mécanisme de l'ionisation APCI à pression atmosphérique.

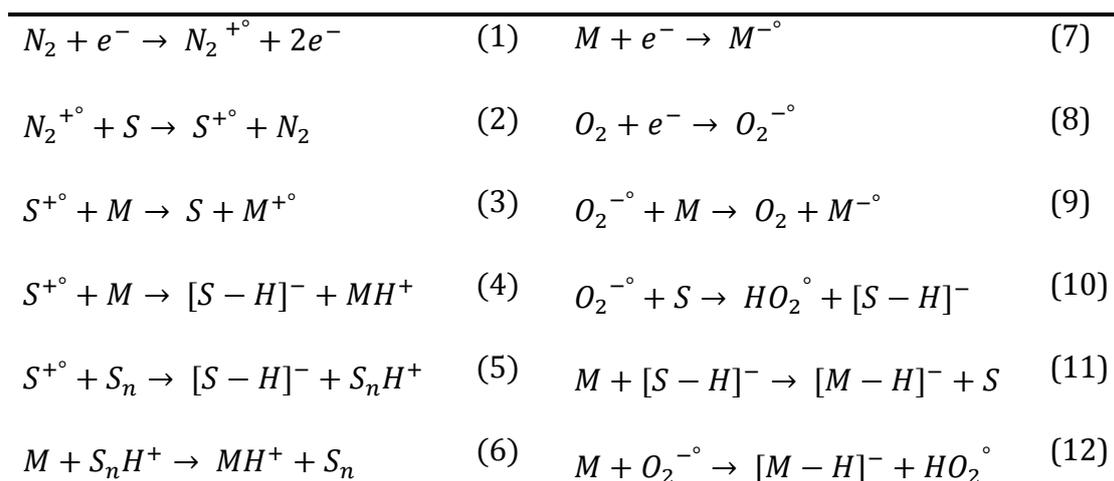
(D'après Tsipi *et al.*, 2015).

A la différence de l'ESI, l'APCI ne génère que des ions mono-chargés. L'ionisation dans la source donne lieu à un ensemble d'ions. En ionisation positive, la première étape passe par l'ionisation de l'azote, gaz vecteur de nébulisation par la décharge couronne formant des ions N_2^+ (tableau 4, équation (1)). L'excès d'azote explique cette réaction, même si l'énergie d'ionisation du N_2 est supérieure à celles du solvant (S) ou de l'analyte (M). S'ensuivent les réactions d'échanges de charges avec le soluté pour générer le cation radical $\text{S}^{\bullet+}$ (2). L'ionisation des molécules de solutés (M) par les radicaux cationiques du solvant se fait soit par ionisation directe ($\text{M}^{\bullet+}$) (3), soit par abstraction de proton au solvant qui requiert que l'affinité protonique du soluté soit supérieure à l'affinité protonique du solvant (MH^+) (4). Les radicaux

cationiques $S^{+\circ}$ peuvent également former des clusters S_nH^+ qui en retour cèdent leur proton au soluté (équations 5-6, [tableau 4](#)) [Carroll *et al.*, 1981].

Le mode négatif exhibe plusieurs types d'ions du soluté tels que l'anion déprotoné $[M - H]^-$, l'anion radicalaire $M^{-\circ}$, ou encore des adduits $[M + anion]^-$. La formation de l'anion radical peut se faire soit directement par capture électronique direct (équation 7, [tableau 4](#)), soit par échange de charge avec l'anion superoxyde formé à partir de l'oxygène de l'air (équation 8 et 9, [tableau 4](#)), avec la condition que l'affinité électronique de (M) soit supérieure à celle de l'oxygène. L'échange de charge peut également se faire entre l'anion superoxyde et le solvant (S), qui via un transfert au soluté génère l'anion déprotoné $[M - H]^-$ (équation 10 et 11, [tableau 4](#)) [Carroll *et al.*, 1981 ; Herrera *et al.*, 2008 ; Terrier *et al.*, 2011].

Tableau 4 : Mécanisme d'ionisation en APCI⁺ / APCI⁻.



(Modifié de Herrera *et al.*, 2008 ; Terrier *et al.*, 2011 ; Carroll *et al.*, 1981).

2.2.3. Source : Atmospheric Pressure Photoionisation (APPI)

La source sous photoionisation à pression atmosphérique APPI est une variante de l'APCI, développée dans le souci d'étendre le domaine de la LC-MS aux molécules peu polaires ([Figure 20](#)) [Tsipi *et al.*, 2015]. La source APPI est similaire à l'APCI, hormis le remplacement de la décharge couronne par une lampe UV de krypton émettant des raies de 10 et 10,6 eV. L'ionisation des molécules de soluté se fait soit directement, soit par l'ionisation d'un solvant appelé également dopant (D) pour améliorer l'efficacité de l'ionisation. Les dopants se caractérisent par leur énergie

d'ionisation, ainsi que leur affinité protonique. Les plus généralement utilisés sont le toluène (EI = 8,83 eV, AP = 784,0 kJ/mol), l'acétone (EI = 9,70 eV, AP = 812.0 kJ/mol) [Robb *et al.*, 2000], l'anisole (EI = 8,20 eV, AP = 839,6 kJ/mol) [Kauppila *et al.*, 2004] et le chlorobenzène (EI = 9,07 eV, AP = 753,1 kJ/mol) [Robb *et al.*, 2008].

En mode positif, l'ionisation direct de M ou par l'agent dopant tiennent compte respectivement des énergies d'ionisation de la source ($EI_{(M)} < 10,6$ eV) et de l'agent dopant ($EI_{(M)} < EI_{(D)}$) (tableau 5) [Kauppila *et al.*, 2004].

En mode négatif, l'initiation des réactions émane de la photoionisation du dopant (équation 19, tableau 5). Par conséquent le mode d'ionisation est similaire à celui observé en APCI. L'électron issu de la réaction avec le dopant peut interagir avec les solvants ou analytes, à condition de présenter une affinité électronique positive (équation 20 et 22, tableau 5).

Tableau 5 : Mécanisme d'ionisation en APPI⁺ / APPI⁻.

$M + h\nu \rightarrow M^{+\circ} + e^{-}$ si $EI(M) < 10.6$ eV (13)	$D + h\nu \rightarrow D^{+\circ} + e^{-}$ (19)
$D + h\nu \rightarrow D^{+\circ} + e^{-}$ (14)	$M + e^{-} \rightarrow M^{-\circ}$ si $AE(M) > 0$ eV (20)
$M + D^{+\circ} \rightarrow M^{+\circ} + D$ si $EI(M) < EI(D)$ (15)	$O_2 + e^{-} \rightarrow O_2^{-\circ}$ (21)
$M + D^{+\circ} \rightarrow MH^{+} + [D - H]^{\circ}$ (16)	$M + O_2^{-\circ} \rightarrow M^{-\circ} + O_2$ si $AE(M) > AE(O_2)$ (22)
$S_n + D^{+\circ} \rightarrow S_nH^{+} + [D - H]^{\circ}$ (17)	$S + O_2^{-\circ} \rightarrow [S - H]^{-} + HO_2^{\circ}$ (23)
$S_nH^{+} + M \rightarrow S_n + MH^{+}$ (18)	$[S - H]^{-} + M \rightarrow S + [M - H]^{-}$ (24)
	$M + O_2^{-\circ} \rightarrow [M - H]^{-} + HO_2^{\circ}$ (25)

(Modifié de Kauppila *et al.*, 2004).

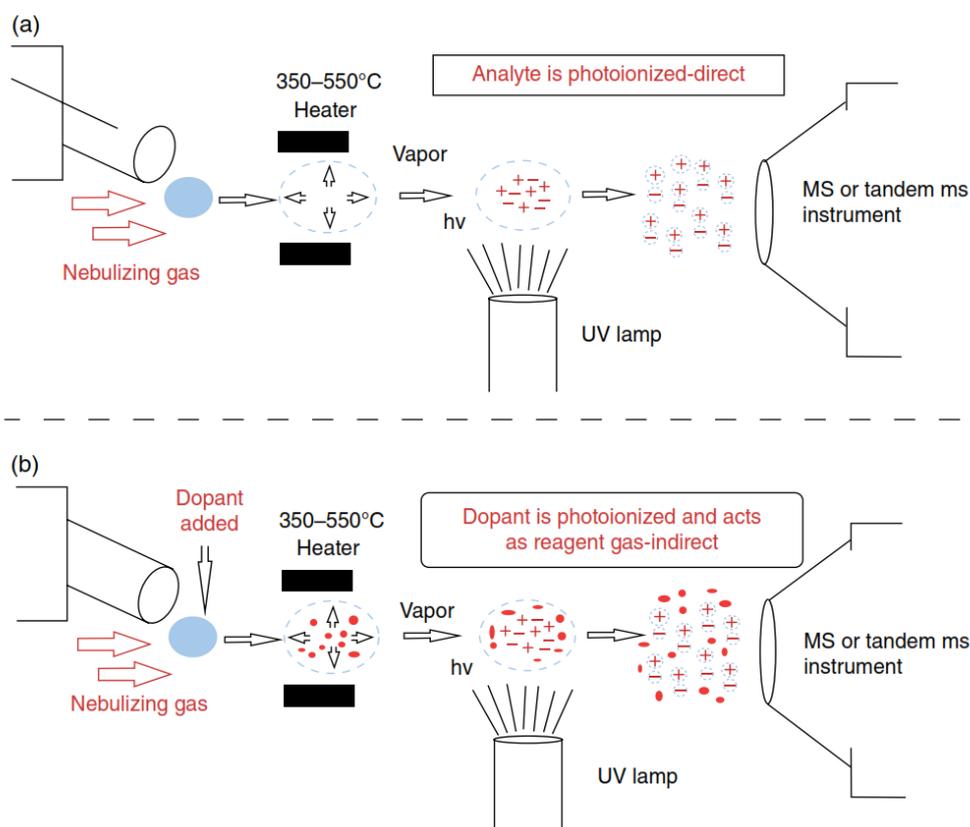


Figure 20 : Mécanisme de l'ionisation APPI à pression atmosphérique.

(D'après Tsipi *et al.*, 2015).

3. L'analyseur

Alors que les méthodes d'ionisation se révèlent d'une importance capitale pour la détermination des catégories de substances analysables, c'est une combinaison de l'analyseur de masse avec le détecteur qui détermine finalement la qualité et la fiabilité de l'analyse. Ces deux dernières décennies ont été marquées par des transformations profondes dans le domaine du développement des analyseurs, avec l'introduction des notions de « haute résolution » (HR) et de « masse exacte » dans les analyses de routines. Cela a débuté avec la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique (FT-ICR-MS) basée sur le piégeage et l'excitation des ions dans une cellule ICR (résonance cyclotronique des ions) sous l'action d'un champ électromagnétique [Marshall *et al.*, 1996], suivi de l'analyseur à temps de vol (TOF) [Chernushevich *et al.*, 2001] et plus récemment de l'Orbitrap [Makarov, 2000 ; Hu *et al.*, 2005].

Des formes hybrides ont été développées (Q-TOF, triple quadripolaire, LTQ-Orbitrap, LIT-Orbitrap, etc.) pour une grande finesse d'analyse des substances et de leurs fragments.

3.1. Eléments de comparaison des analyseurs (Tableau 6).

Une comparaison des analyseurs est difficile dans la mesure où la performance des instruments dépend également de la source d'ionisation. Néanmoins, tout analyseur se caractérise par :

- ✓ Sa linéarité (Dynamic range) : ce sont les domaines de concentration de l'analyte avec des signaux proportionnels, sans saturation du détecteur.
- ✓ Sa sensibilité : Mesure la limite de détection (LOD) de l'analyseur pour une analyte donnée dans sa matrice et en prenant en compte les interférences analytiques. Un rapport signal sur bruit (S/N) de 3 est admis pour la détermination de la LOD. La LOD est affectée par les propriétés physico-chimiques de l'analyte telle que son LogP, sa capacité d'ionisation, les conditions chromatographiques en cas de couplage (pH, composition de la phase mobile, ...) ou encore le réglage des paramètres du spectromètre de masse.
- ✓ Sa résolution (R) : Elle est calculée en divisant la masse (M) de l'ion (m/z) par la largeur du pic m/z à mi-hauteur (ΔM) (Figure 21) : $R = \frac{M}{\Delta M}$ [Ferrer *et al.*, 2003 ; Briois *et al.*, 2016]. La résolution permet de classer les analyseurs qualifiés de :
 - Faible pouvoir de résolution, $\frac{M}{\Delta M} < 2500$, permet la séparation de pics avec différentes masses nominales
 - Moyen pouvoir de résolution, $2500 < \frac{M}{\Delta M} < 10000$, permet la séparation de pics d'ions isobariques mais de $m/z < 50$
 - ou de haut pouvoir de résolution, $10000 < \frac{M}{\Delta M} < 100000$, permet la séparation de pics d'ions isobariques jusqu'à des valeurs de m/z de 500.

- ✓ La détermination de la masse exacte (mass accuracy) : C'est l'erreur exprimée en partie par million (ppm) entre la masse (m/z) vraie et la masse (m/z) mesurée. Au fur et à mesure que la résolution des nouveaux appareils augmente, la masse exacte est améliorée. Des publications rapportent des valeurs de masses exactes inférieures ou égales à 1 ppm. Le SANCO Européen définit la masse exacte à 5 ppm [[SANCO AQC Guidance, 2009](#)].

La résolution et la masse exacte sont liées notamment pour l'analyse de mélanges complexes ou la masse exacte peut ne pas suffire, une haute résolution est également nécessaire.

L'avènement de la haute résolution a complètement révolutionné la spectrométrie de masse.

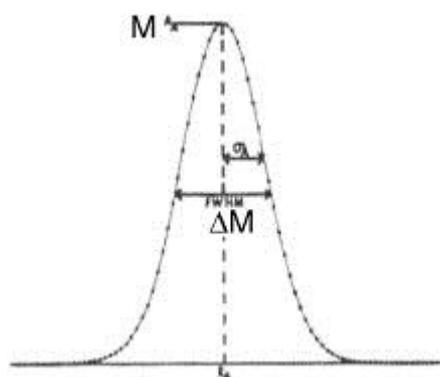


Figure 21 : Détermination de la largeur à mi-hauteur (FWHM) permettant de calculer le pouvoir de résolution.

- ✓ Sa sélectivité : c'est la capacité de l'analyseur à discriminer les signaux des analytes d'intérêts des interférences du système.
- ✓ Sa fréquence de balayage (scan rate) : définit le temps mis par l'analyseur pour enregistrer un spectre complet. Il est nécessaire d'augmenter le nombre de points scannés pour une meilleure précision des analyses. Cela passe par une augmentation de la vitesse d'enregistrement notamment avec les couplages LC. L'augmentation de la vitesse de scan ne doit pas se faire au détriment de la sélectivité et de la sensibilité.

Tableau 6 : Comparaison relative des systèmes LC/MS

	Sensitivity in full-scan	Selectivity	Accuracy (ppm)	Resolving power	Dynamic range	Unique features
Triple Quadrupole	Medium	High	Low (50-200 ppm)	<2000	High	Neutral loss
Ion Trap MS/MS	High	High	Low Low (50-200 ppm)	<2000	Medium	MS ⁿ
LC/TOF/MS	High	Low	High Low (3-5 ppm)	10 ⁴ -2.10 ⁴	Low	Accurate mass and sensitivity
LC/Q-TOF/MS	Medium	High	High Low (3-5 ppm)	10 ⁴ -2.10 ⁴	Medium	Accurate mass of fragments
Orbitrap	High	High	High (1 ppm)	10 ⁵ -10 ⁶	High	Accurate mass of fragments

(Modifié d'après Ferrer *et al.*, 2003 ; Denisov *et al.*, 2012 ; et de Pérez *et al.*, 2016).

3.2. L'analyseur quadripolaire

Les spectromètres de masse quadripolaires sont probablement les instruments de spectrométrie de masse les plus simples. Comme son nom l'indique, un analyseur quadripolaire est constitué de quatre électrodes parallèles de section hyperbolique ou cylindrique. Les électrodes opposées distantes de $2r_0$, reliées entre elles sont soumises au même potentiel qui est la résultante d'une tension continue U et d'une tension alternative V haute fréquence, selon l'équation :

$$\Phi_0 = 2(U - V \cos \omega t)$$

La séparation des masses est basée sur l'oscillation des ions sous les effets combinés des tensions continue et alternative générées par le quadripolaire. Ainsi, des mouvements longitudinaux sont conférés aux ions et seuls ceux ayant des valeurs de m/z spécifiques ont des trajectoires d'oscillation stables selon les axes x, y du quadripolaire et dirigés vers le détecteur (Figure 22) [Austin *et al.*, 1976 ; Campana, 1980].

Les analyseurs quadripolaires se caractérisent par leur pouvoir de résolution faible, la faible précision des masses mesurées, ce qui entraîne des capacités d'analyses quantitatives limitées, mais présente l'avantage de présenter une bonne transmission des ions et une simplicité d'utilisation.

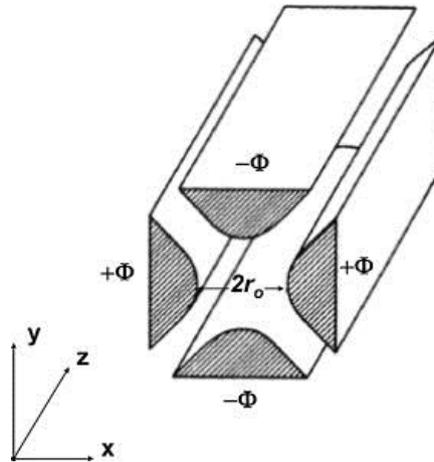


Figure 22 : Représentation du système d'électrodes de l'analyseur quadripolaire (section hyperbolique)

(D'après Austin *et al.*, 1976 ; Campana, 1980).

3.3. L'analyseur à temps de vol (TOF).

L'analyseur TOF, de par son haut pouvoir de résolution a profondément amélioré l'analyse des analytes. Le premier instrument TOF a été commercialisé à la fin des années 50. Depuis, l'instrumentation a connu des développements majeurs qui ont permis de vulgariser les applications dans divers domaines.

Le principe de l'analyseur TOF est simple : des ions pulsés sont accélérés de la source à un tube analyseur, et le temps pour un ion de parcourir une région donnée au détecteur est mesuré. Ce temps de parcours pour un ion dépend de son énergie d'accélération (E), de la distance parcourue (d) et de sa masse (m). L'énergie cinétique est la même pour tous les ions, de telle sorte que ceux qui ont un rapport m/z faible traverseront rapidement et parviendront au détecteur les premiers, suivis de ceux ayant un rapport m/z les plus élevés (Figure 23) [Pérez *et al.*, 2016]. Ces relations sont données par les équations :

$$E = \frac{1}{2}mv^2 \rightarrow m = 2E/v^2$$

La vitesse est liée à la distance parcourue et au temps (t) par la relation

$$v = d/t ; \text{ d'où } m = (2E/d^2)t^2$$

Si conceptuellement, la spectrométrie à temps de vol est probablement la plus simple, sa complexité émane des applications liées à la haute résolution.

L'avantage de l'analyseur TOF réside dans sa sensibilité à travers sa capacité de collecter des données dans une large gamme de masses, la possibilité de pallier aux interférences grâce à son pouvoir de résolution élevé et la détermination de la masse exacte indispensable pour l'analyse élémentaire [Ferrer *et al.*, 2003].

La linéarité qui était médiocre avec les premiers analyseurs TOF due à la saturation des détecteurs a été nettement améliorée avec des algorithmes mathématiques comme le TDC (time-to-digital correction), avec lesquels, seule une partie des ions atteignent le détecteur entraînant une atténuation du signal.

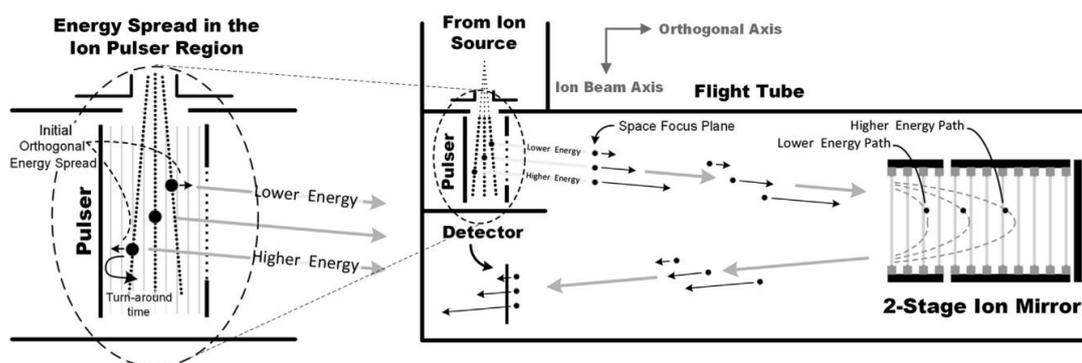


Figure 23 : Représentation de l'analyseur à temps de vol (TOF).

(D'après Pérez *et al.*, 2016)

3.4. Les analyseurs hybrides triple quadripolaire et Q-TOF

Devant les inconvénients de la TOF et du quadripolaire, une combinaison de certains modules a été mise à profit pour engendrer des instruments plus performants tels que le triple quadripolaire (TQ), le quadripolaire associé à la TOF (Q-TOF) ou encore les associations avec l'Orbitrap. Une sélection des ions est effectuée au niveau du quadripolaire, suivie de l'injection par paquets des ions dans le TOF ou l'Orbitrap

améliorent la sensibilité des analyseurs hybrides [Shevchenko *et al.*, 1997 ; Ferrer *et al.*, 2003].

3.5. L'analyseur Orbitrap

3.5.1. Appareillage

Apparaissant d'abord comme une curiosité scientifique lors d'une conférence de l'American Society for Mass Spectrometry en 1999, l'analyseur Orbitrap™ a fait ses débuts en 2005 en tant que détecteur de masse [Makarov *et al.*, 2006]. La cellule Orbitrap se compose de quatre électrodes principales : une électrode centrale en forme de fuseau, deux électrodes externes et une électrode de déviation (Figure 24) [Makarov *et al.*, 2006 ; Perry *et al.*, 2008].

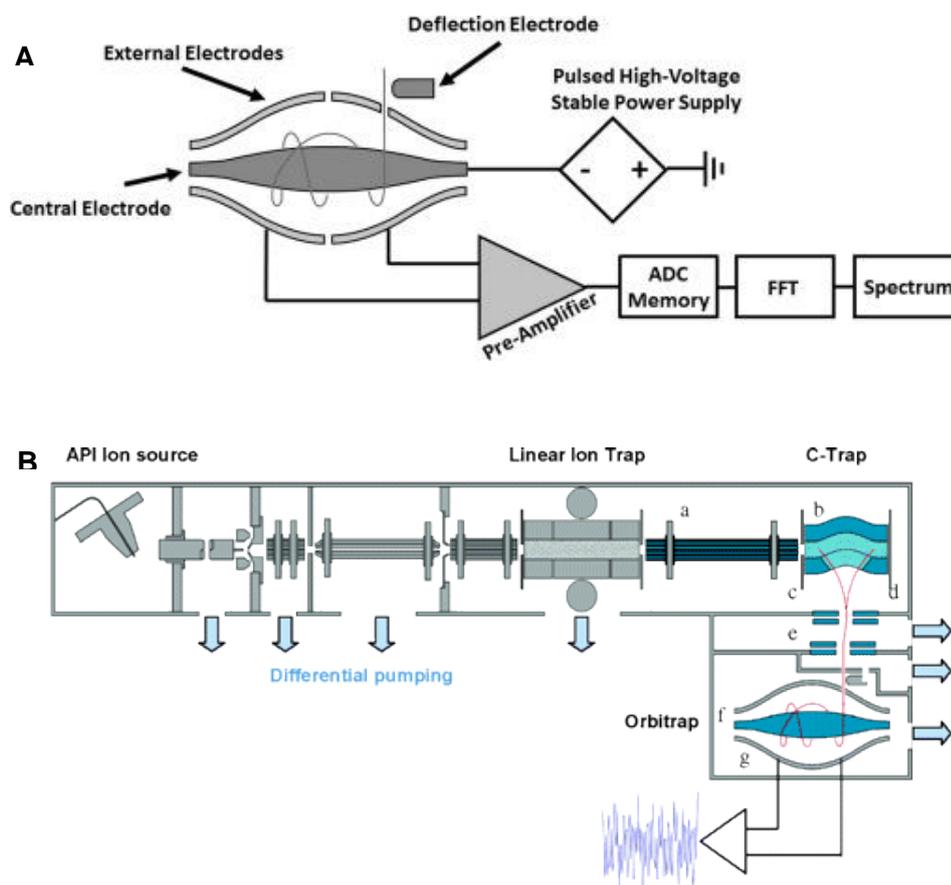


Figure 24 : A) Représentation schématique de l'analyseur Orbitrap™; B) Représentation de la trappe orbitale et des trajectoires ioniques.

(D'après Makarov *et al.*, 2006 ; Perry *et al.*, 2008)

3.5.2. Principe :

Lorsque la tension est appliquée entre les électrodes externes et centrales, le champ électrique résultant est strictement linéaire selon l'axe. Les oscillations dans cette direction seront donc purement harmoniques. En même temps, la composante radiale du champ attire fortement les ions sur l'électrode centrale.

Le principe de mesure est basé sur l'injection pulsée d'ions à l'intérieur de la cellule, dans laquelle un champ électrostatique est produit en polarisant l'électrode centrale à haute tension par rapport aux électrodes extérieures. Une haute tension à deux niveaux est appliquée sur l'électrode centrale. Les formes des électrodes centrales et extérieures sont telles qu'un champ électrostatique quadro-logarithmique est généré à l'intérieur de la cellule selon l'équation :

$$U(r, z) = \frac{k}{2} \left(z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left[\frac{r}{R_m} \right] + C$$

Où r et z sont des coordonnées cylindriques, R_m : Rayon caractéristique, C : Constant, k : Paramètre déterminé par la forme de l'électrode centrale et la tension appliquée.

L'électrode de déviation, qui peut être polarisée entre 0 et 350 V, optimise l'injection des ions et compense l'aberration interne provoquée par l'ouverture à l'injection. La force du champ est modifiée pendant le processus d'injection par une augmentation transitoire de la tension absolue appliquée sur l'électrode centrale. La capture d'ions sur la gamme de masse la plus large possible exige que le faible niveau de la haute tension (typiquement -2500 V pour les ions positifs) soit appliqué sur l'électrode centrale avant l'injection d'ions [Hu *et al.*, 2005]. Pendant l'injection des ions, la haute tension est augmentée jusqu'à son niveau élevé (typiquement -3500 V pour les ions positifs), avec un temps de montée entre 20 et 100 μ s, ce qui permet de piéger les ions à l'intérieur de la cellule. Ce procédé est appelé compression électrodynamique (electrodynamic squeezing) [Makarov, 2000]. Les ions pulsés injectés dans la cellule sont piégés dans des orbites autour de l'électrode centrale. Les ions en orbite piégés oscillent harmoniquement le long de l'électrode axiale avec des fréquences proportionnelles à $(m / z)^{-1/2}$, selon l'équation :

$$z(t) = z_0 \cos(\omega t) + \left(\frac{2E_z}{k}\right)^{\frac{1}{2}} \sin(\omega t)$$

où z_0 est l'amplitude axiale initiale. E_z l'énergie cinétique initiale selon la direction z et ω est la fréquence sinusoïdale du mouvement de l'ion selon l'axe z , définie par l'équation :

$$\omega = \left(\frac{q}{m} k\right)^{\frac{1}{2}}$$

Le mouvement des ions dans l'orbitrap adopte une trajectoire spirale autour de l'électrode centrale, qui se scinde en un mouvement circulaire qui n'est pas exploitable, et un mouvement axial. Grâce à la division de l'électrode extérieure en deux moitiés, l'oscillation axiale des ions piégés génère un courant qui produit un signal transitoire, qui peut être amplifié, numérisé et converti en spectre de fréquence par des techniques de transformation de Fourier (FT). La gamme de fréquences typiques des ions piégés dans un analyseur de masse standard Orbitrap est de 0,1 à 7 MHz pour des rapports m/z dans une fourchette 1 – 4000 [Zubarev et Makarov, 2013] (Figure 24).

Le signal obtenu dans le domaine fréquentiel après le traitement FT est converti en un spectre de masse avec un pouvoir de résolution supérieur à 10^5 jusqu'à $m/z = 400$. Ce pouvoir de résolution peut atteindre $m/\Delta m \sim 10^6$ à m/z 200 avec des modèles plus sophistiqués d'Orbitrap. De plus, l'Orbitrap présente l'avantage de permettre une collecte rapide de données, sans perte de sensibilité, une réduction drastique des interférences avec le haut pouvoir de résolution, la détermination de masse exacte pour l'analyse élémentaire et enfin la discrimination des ions isobariques [Olsen *et al.*, 2009 ; Denisov *et al.*, 2012 ; Zubarev *et al.*, 2013].

Chapitre 3 : Espace de connaissance (Knowledge Space) : Outil de maîtrise des changements en post-AMM (Cas du Ticagrelor : étude à l'état liquide).

“Those who have knowledge, don't predict. Those who predict, don't have knowledge.” Lao Tzu

Chapitre 3 : Espace de connaissance (Knowledge Space) : Outil de maîtrise des changements en post-AMM (Cas du Ticagrelor : étude à l'état liquide).

I. Etude de la stabilité intrinsèque du Ticagrelor

1. Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité dans le monde. On estime à 17,5 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardio-vasculaires, soit 31% de la mortalité mondiale totale. Parmi ces décès, on estime que 7,4 millions sont dus à une cardiopathie coronarienne, essentiellement les syndromes coronariens aigus (SCA) et 6,7 millions à un AVC (OMS chiffres 2012). La prévalence de la fibrillation auriculaire aux États-Unis devrait passer de 5,2 millions en 2010 à 12,1 millions de cas en 2030 [Colilla *et al.*, 2009]. En France, les maladies cardiovasculaires représentent la deuxième cause de mortalité après le cancer. Le nombre de décès par MCV par an était estimé à 147 000 en 2008 [Fédération française de cardiologie. Chiffres 2008]. Cependant, il n'en demeure pas moins que ce sont les pays en voie de développement qui payent le lourd tribut des MCV, près de $\frac{3}{4}$ de décès y sont recensés, constituant un frein au développement de ces pays. Une connaissance approfondie de la physiopathologie des MCV et des facteurs de risque associés (âge, sexe, antécédents familiaux de MCV, diabète de type 2, HTA, l'obésité, l'hypercholestérolémie, etc.) a permis de mettre en place des mesures de prévention primaire (actes destinés à diminuer l'incidence d'une maladie dans une population en réduisant le risque d'apparition de nouveaux cas), secondaire (actes destinés à diminuer la prévalence d'une maladie dans une population en en réduisant l'évolution et la durée) et tertiaire (actes destinés à diminuer la prévalence des incapacités chroniques dues à une maladie) efficaces, telles que préconisées par l'OMS.

Les médicaments occupent une place centrale dans la prise en charge des MCV, utilisés en association avec les techniques médico-chirurgicales. Pour les syndromes coronariens aigus, les plus fréquentes des MCV, le traitement médicamenteux est très varié et dépend de la clinique, des stratégies

thérapeutiques en constante évolution au regard des innovations thérapeutiques et peut comporter :

- ✓ Un traitement anti-ischémique : sont utilisables dans cette indication les médicaments bêtabloquants, les dérivés nitrés et les inhibiteurs calciques avec des précautions liées à la clinique du patient.
- ✓ Un traitement anticoagulant : généralement à base d'héparine non fractionnée (HNF) et d'héparine de bas poids moléculaire (HBPM). La première est à privilégier en cas d'altération de la fonction rénale. Le fondaparinux a également sa place dans les stratégies thérapeutiques, avec un risque de thrombopénie induite par l'héparine faible.
- ✓ Un traitement anti-thrombotique : une double anti-agrégation plaquettaire (aspirine et un inhibiteur des récepteurs P2Y12) est généralement utilisée associée à un anticoagulant chez les patients à haut risque ischémique, mais adapté en cas de risque hémorragique.
- ✓ Un traitement antiagrégant plaquettaire (AAP) : se base sur une double anti-agrégation plaquettaire reposant sur l'association aspirine et inhibiteur des récepteurs P2Y12 (ticagrelor ou clopidogrel).

2. Anti-agrégation via les Récepteurs P₂Y₁₂ des plaquettes

2.1. Les récepteurs P₂Y₁₂

Les récepteurs P₂Y (P₂YRs), appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. A ce jour, un total de huit P₂YRs fonctionnels distincts sont découverts chez l'homme, et se subdivisent en récepteurs P₂Y₁ et P₂Y₁₂ [Abbracchio *et al.*, 2006]. Leurs ligands sont des molécules chargées avec des valeurs de biodisponibilité et de demi-vie très faibles, ce qui limite la compréhension de cette famille de récepteurs. Parmi ces ligands naturels, l'adénosine diphosphate (ADP) (Figure 25) qui active ces récepteurs et entraîne une cascade de réactions conduisant à l'agrégation plaquettaire. Du fait de son ubiquité dans l'organisme et de son rôle dans l'accroissement et la stabilisation du thrombus [Jagroop *et al.*, 2003], il a constitué une cible de choix pour le développement de certains médicaments antagonistes comme des prodrogues (clopidogrel et prasugrel) ou du ticagrelor (Figure 25).

2.2. Inhibiteurs des récepteurs P_2Y_{12} : Clopidogrel et Ticagrelor

L'agrégation plaquettaire et la formation d'un thrombus jouent un rôle central dans la physiopathologie du SCA. Si l'aspirine a longtemps constitué le traitement préventif des accidents ischémiques, une double anti-agrégation a progressivement fait sa place comme traitement prophylactique des récurrences des accidents thromboemboliques [Anderson *et al.*, 2007]. En effet, l'association entre aspirine et un inhibiteur des récepteurs P_2Y_{12} (ticagrelor ou clopidogrel) a montré sa supériorité dans la prise en charge des SCA, comparé à l'aspirine seule avec une réduction de 20 % de la mortalité cardiovasculaire, des infarctus du myocarde et des AVC, au prix d'une augmentation acceptable du risque hémorragique (3,6 vs 2,7 %) [Yusuf *et al.*, 2001]. Le Clopidogrel et le Prasugrel sont des thiényopyridines qui inhibent sélectivement et de façon irréversible l'activation plaquettaire induite par l'ADP (Figure 25), engendrant des effets antithrombotiques pour toute la durée de vie des plaquettes [Savi *et al.*, 2000]. Récemment a été mis sur le marché un nouvel antiagrégant plaquettaire, le ticagrelor, le chef de file d'une nouvelle famille d'AAP, celle des cyclopentyltriazolo-pyrimidine. C'est un analogue nucléosidique (Figure 25), le premier inhibiteur réversible et à action directe sur les récepteurs P_2Y_{12} et non compétitive de l'ADP (Figure 26) [Husted *et al.*, 2009 ; van Giezen, 2008]. Le ticagrelor n'a pas besoin d'être métabolisé pour être actif et contrairement au clopidogrel, son action cesse une fois qu'il est éliminé par l'organisme [Husted *et al.*, 2009]. Dans l'étude PLATO, le ticagrelor comparé au clopidogrel dans le SCA a montré une diminution significative de la mortalité cardiovasculaire, des infarctus et des accidents vasculaires cérébraux sans augmentation des hémorragies majeures toutes causes confondues [Wallentin *et al.*, 2009 ; Husted *et al.*, 2012].

3. Objectif de l'étude du ticagrelor en post-AMM

Comme précédemment illustré (Figure 3), les données recueillies durant les phases de développement du médicament constituent l'espace de connaissance du médicament dans lequel émerge l'espace de conception, qui lui-même permet de définir un espace de contrôle.

Même correctement conçus, les médicaments commercialisés (Post-AMM) subissent des contraintes environnementales (humidité relative, lumière naturelle, température, présence d'eau dans la formulation et / ou variation de pH, etc.) lors de leur transport, leur stockage ou leur utilisation avec d'autres médicaments ou dispositifs

médicaux, ce qui peut impacter l'efficacité (perte d'activité) et la sécurité du médicament en raison de l'apparition de produits de dégradation.

Etendre le niveau de connaissance du médicament dans son nouvel environnement constitue la meilleure façon d'appréhender le phénomène et d'anticiper les risques. Pour cette fin, l'accès aux voies de dégradation afin de déterminer la stabilité intrinsèque des médicaments constitue l'approche d'étude telle que recommandée par les lignes directrices de la Conférence Internationale pour l'Harmonisation (ICH Q1A(R2)) [ICH, 2003].

Une revue approfondie de la littérature montre qu'aucune étude n'a jusqu'à présent été réalisée pour évaluer le domaine de stabilité et les voies de dégradation du ticagrelor. L'importance sur le plan pharmaceutique du ticagrelor dans la prise en charge du SCA nous a conduit à mettre en place l'étude de caractérisation structurale de ses produits de dégradation, générés dans des conditions de stress telles que définies par les lignes directrices ICH.

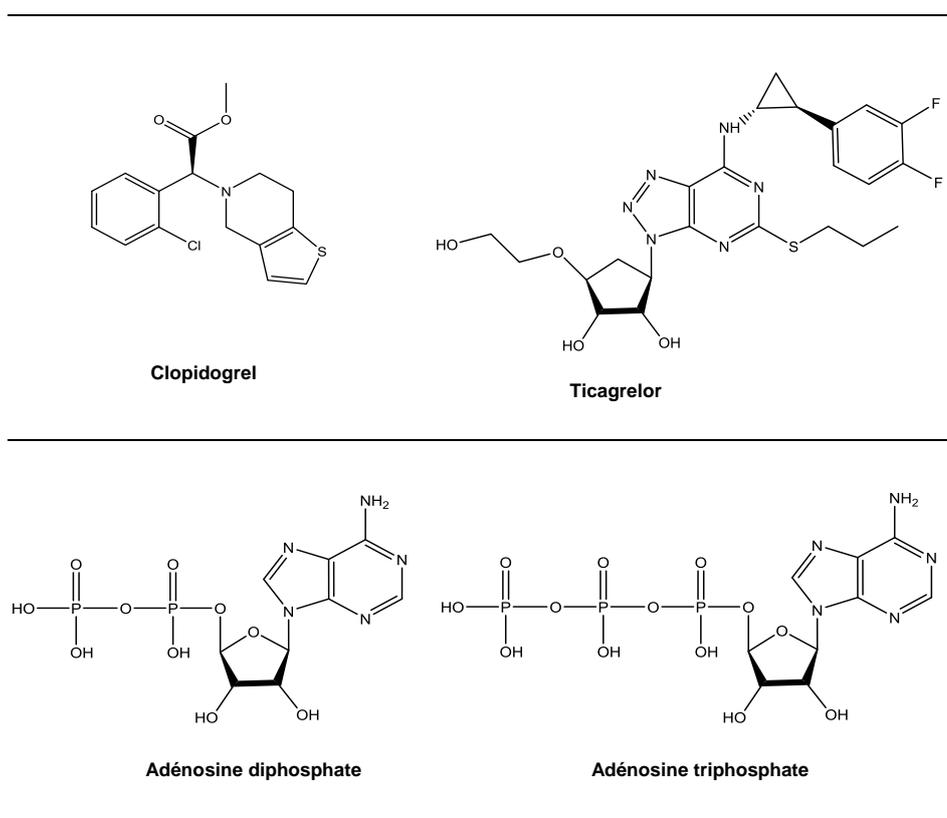


Figure 25 : Structure de l'ADP, l'ATP et des inhibiteurs des récepteurs P2Y12 (Clopidogrel et Ticagrelor)

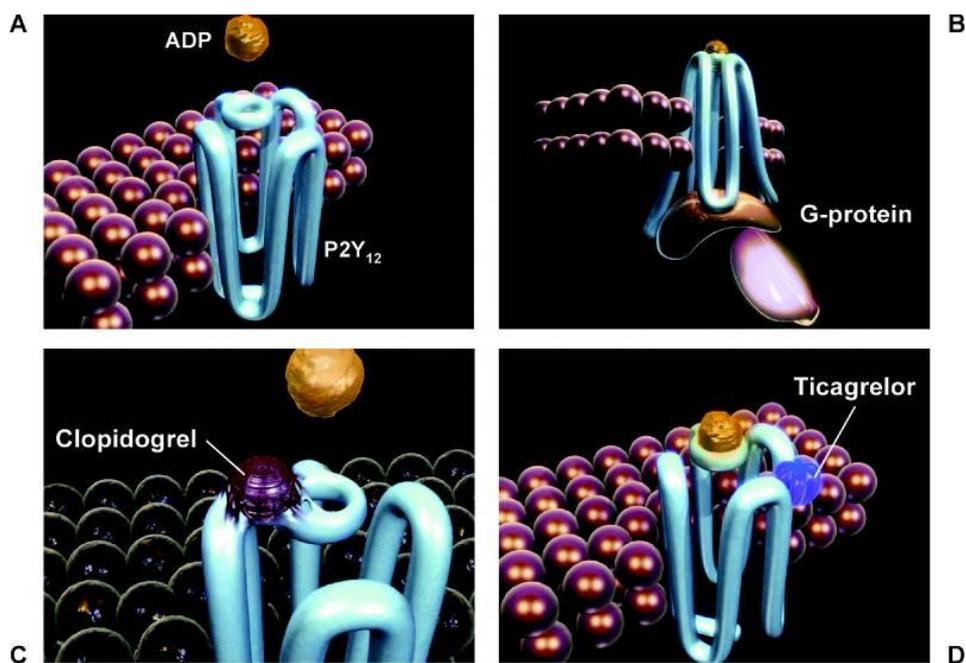


Figure 26 : Le récepteur P2Y₁₂ et ses ligands : A et B) : liaison à l'ADP et changement conformationnel ; C) Inhibition compétitive par le Clopidogrel ; D) Inhibition non compétitive par le ticagrelor.

(D'après Husted *et al.*, 2009)

4. Etude de la stabilité intrinsèque du ticagrelor

La compréhension de la stabilité intrinsèque d'une substance active seule ou dans le produit fini requiert : a) une description des conditions appliquées pour induire sa dégradation, b) une description de la cinétique de dégradation correspondant à chacune de ces conditions de stress, c) une élucidation structurale de tous les produits de dégradation mis en évidence et d) une proposition du schéma de dégradation représentant les différentes voies de dégradation.

4.1. Généralités

4.1.1. Synthèse chimique du ticagrelor

Le ticagrelor, de nom chimique « (1S,2S)-3-[7-[[[(1R,2S)-2-(3,4-difluorophényl)cyclopropyl]amino] - 5-propylsulfanyl]triazolo [4,5-d] pyrimidin-3-yl] - 5-(2-hydroxyéthoxy)cyclopentane - 1,2 - diol », est obtenu entièrement par synthèse chimique dont le procédé est décrit dans plusieurs brevets [Aufdenblatten *et al.*, 2010 ; Quittmann *et al.*, 2007 ; Dejonghe *et al.*, 2008].

Cette synthèse passe par trois intermédiaires de synthèse (un dérivé dichloro-pyrimidine (1), un amino-alcool (2) et un dérivé cyclopropylamine (3)) obtenus respectivement par une succession de réactions à partir de l'acide 2-thiobarbiturique, du D-ribose et d'une réaction entre un chlorure d'acyle et un difluorobenzène (Annexe 1) [Zhang *et al.*, 2012]. La synthèse du ticagrelor se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord le dérivé dichloro-pyrimidine (1) interagit avec l' amino-alcool (2) générant une amino-pyrimidine (4). Cette dernière est convertie en triazolopyrimidine (5) après diazotation. La réaction de ce dernier avec l'amine primaire du cyclopropylamine (3) suivie de la levée de la protection des alcools du cyclopentane conduit au ticagrelor (7) (Figure 27).

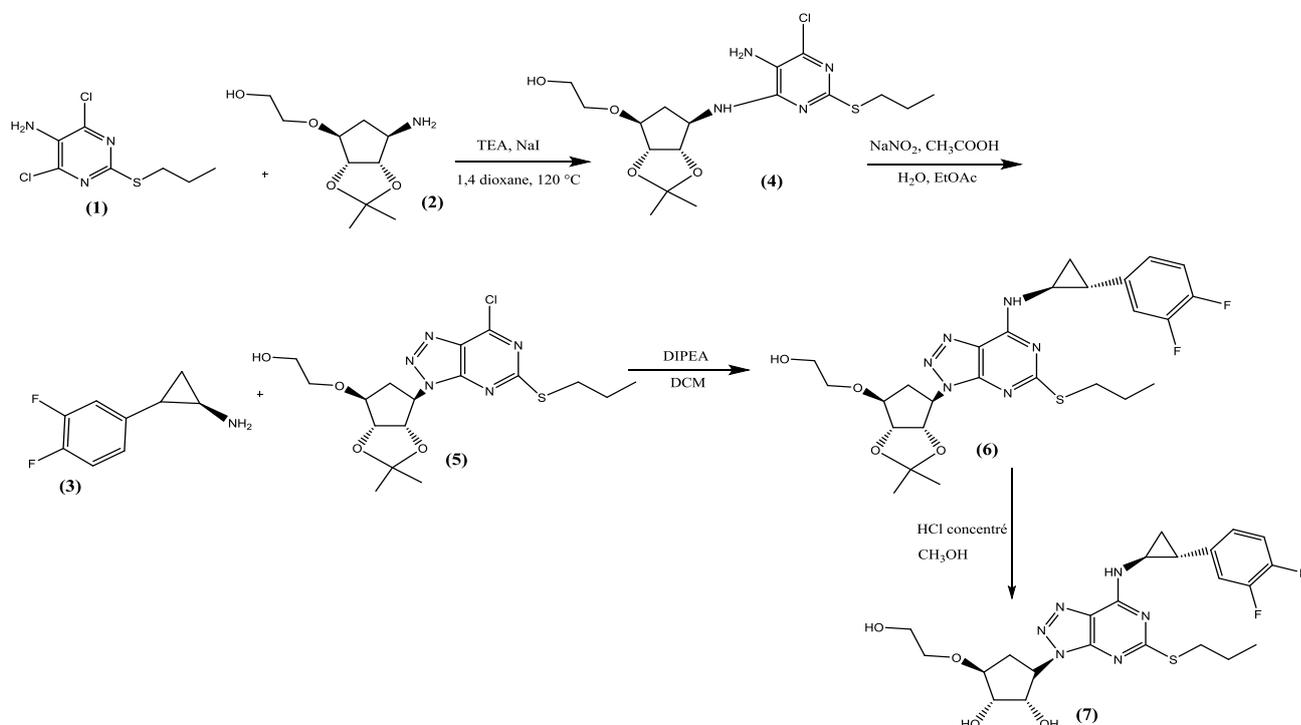


Figure 27 : Schéma de synthèse du ticagrelor.

(Modifié d'après Zhang *et al.*, 2012)

4.1.2. Réglementation des études de stabilités

Les médicaments, selon leur origine peuvent présenter des groupements fonctionnels caractéristiques, parfois complexes, leur conférant des propriétés physico-chimiques inhérentes. Cette singularité structurale rend chaque molécule unique et susceptible d'instabilité à travers diverses voies de dégradation lorsqu'elle est soumise à différents changements et au stress environnemental lors des

différentes étapes du processus de fabrication, du stockage ou encore pendant l'utilisation chez le patient. La dégradation du médicament peut se traduire par un manque d'activité et donc d'efficacité, mais aussi générer des produits de dégradation avec un risque de toxicité potentielle pour le patient. Cette instabilité peut être physique et/ou chimique.

Des recommandations ont d'abord été développées par l'EMA, la FDA, l'OMS [WHO, 2009] ou encore dans le cadre d'une harmonisation tripartite des recommandations (ICH : FDA, EMA et health Canada) pour évaluer la qualité des médicaments en se basant essentiellement sur la stabilité des principes actifs à travers divers tests et des conditions de mise en œuvre (ICH Q1A) [ICH, 2003]. Par la suite, la question de la présence des impuretés (organiques, inorganiques et solvants résiduels) et de leur spécification a été traitée avec l'ICH Q3A [ICH, 2006]. Les essais sont réalisés dans diverses conditions afin d'élucider les voies d'apparition des produits de dégradation. Si la réglementation se base sur les études en temps réel pour définir les péremptions et les conditions de conservation et d'utilisation des nouveaux principes actifs et des médicaments associés, les études en conditions de stress sont tout aussi d'une extrême importance (Figure 28). Comme spécifié par le guide ICH Q1A R2, afin de comprendre les phénomènes qui régissent la stabilité des principes actifs et des médicaments, ils sont soumis à des conditions de stress comme la température, l'oxydation, l'hydrolyse acide-base, la photolyse. L'exposition à ces conditions de stress a pour objectif d'englober les principales voies de dégradation des médicaments qui comportent : l'hydrolyse en présence d'humidité, l'oxydation en présence d'agents oxydants spécifiques (oxygène, peroxyde d'hydrogène ou d'initiateurs radicalaires comme le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) ou le 4,4'-azobis-4-cyanovaleric acid (ACVA)), les réactions d'isomérisation, d'hydratation, de polymérisation, de décarboxylation, de conversion polymorphique, etc.

Les résultats de ces études peuvent être utilisés pour déterminer la stabilité intrinsèque des substances actives (Q1A R2). La compréhension des principales voies de dégradation est utile pour mettre en place des mesures pharmaceutiques appropriées pour assurer la stabilité du médicament. De même, ces produits de dégradation sont utiles pour le développement de stratégies analytiques pour le contrôle qualité et les études de stabilité formelles. En outre, la détermination de l'identité de ces potentiels produits de dégradation peut aider dans l'évaluation de

l'impact de la dégradation du médicament sur la sécurité des patients telle que spécifiée par le référentiel ICH Q3B [ICH, 2006].

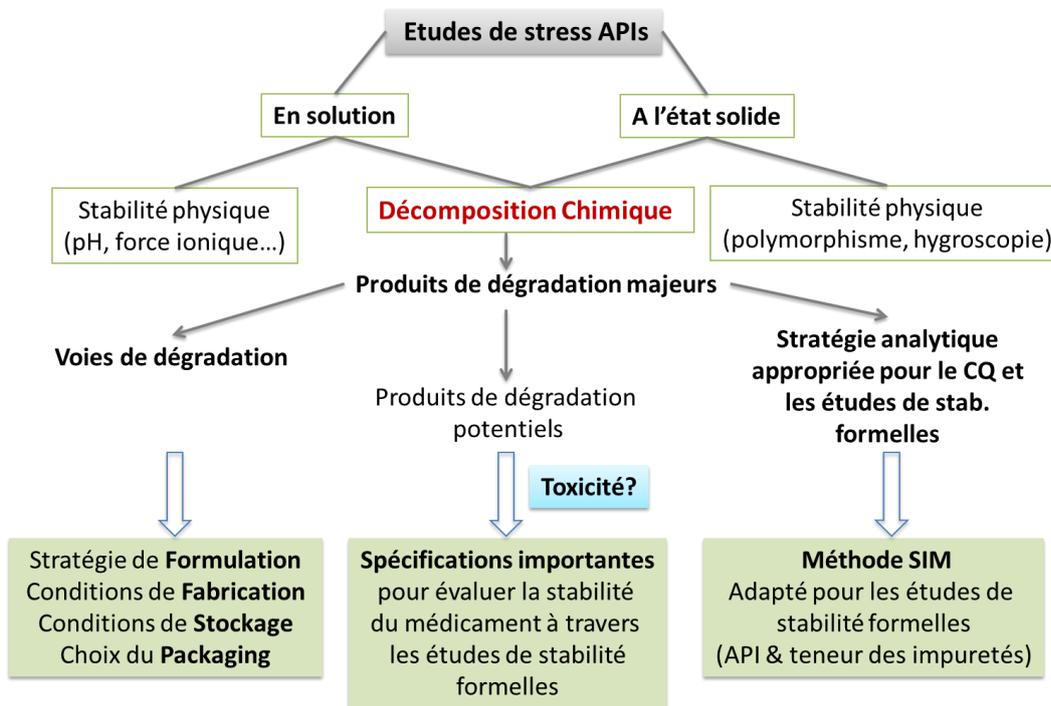


Figure 28 : Place des études de stress dans le cycle de vie du médicament

Si ce dernier fixe les spécifications pour toute impureté en fonction de la dose journalière administrée du médicament, de sa voie d'administration et du seuil admissible (Tableau 7), l'EMA va plus loin en introduisant en plus l'évaluation de la génotoxicité des impuretés [ICH, 2003 ; EMA, 2006 ; Jamrógiewicz, 2016].

La dernière guideline de l'EMA prévoit l'utilisation de 2 modèles de prédiction *in silico*, avec un renforcement des exigences pour les impuretés du principe actif prédites comme étant génotoxiques [Dow *et al.*, 2013 ; ICH M7, 2014]. La conséquence de cette nouvelle réglementation place les études de stabilité et les études en condition de stress au centre d'un nouvel axe de recherche basé sur l'analyse de risque tant pour les nouveaux médicaments que pour les anciens.

Tableau 7 : Seuils pour produits de dégradation dans les nouveaux médicaments.

Type of threshold	Maximum daily dose	Threshold
Reporting	≤ 1 g	0.1% TDI
	> 1 g	0.05% TDI
Identification	< 1 mg	1.0% TDI or 5 µg (lower of two)
	1 mg – 10 mg	0.5% TDI or 20 µg (lower of two)
	> 10 mg – 2 g	0.2% TDI or 2 mg (lower of two)
	> 2 g	0.1%
Quantification	< 10 mg	1.0% TDI or 50 µg (lower of two)
	10 mg – 100 mg	0.5% TDI or 200 µg (lower of two)
	100 mg – 2 g	0.2% TDI or 3 mg (lower of two)
	> 2 g	0.15% TDI

(TDI = total daily intake)

4.2. Mise en place pratique du stress testing du ticagrelor

La mise en place pratique d'une étude en condition de stress sur un nouveau médicament constitue un challenge. En plus de disposer des éléments analytiques de mise en œuvre, cette étude requiert pour chaque condition de stress un choix minutieux et des réajustements sur la base des tendances observées de dégradation du principe actif. Cela explique pourquoi le référentiel ICH Q1A (R2) ne donne que quelques recommandations générales sur les études en conditions de stress, même si on retrouve quelques instructions sur les conditions d'exposition à la lumière dans l'ICH Q1B [ICH, 1996].

4.2.1. Limite de dégradation

Le stress testing ayant certes pour objectif de générer rapidement la dégradation du principe actif, le rationnel de cette approche voudrait que le taux de dégradation soit maîtrisé de manière à éviter de générer des produits de dégradation secondaires voire tertiaires, qui ne se formeront jamais dans les conditions réelles de conservation du produit. Des niveaux de dégradation des principes actifs compris entre 5 à 20% semblent être admis [Carr *et al.*, 1990], même si d'autres scientifiques

évoquent un seuil optimal à 10%, correspondant aux niveaux de dégradation réglementaires des médicaments.

Pour le ticagrelor, une dégradation de 10% du principe actif et du médicament est fixée dans les différentes conditions de stress.

4.2.2. Stratégies pour la sélection des conditions de stress

Le choix des conditions de stress doit englober les différentes conditions dans lesquelles le médicament ou sa substance active pourraient être amenés à se dégrader s'ils sont accidentellement mal conservés (Figure 29). Le plan d'expérience doit comporter au minimum des conditions de stress d'hydrolyse acide / base, de thermolyse, de photolyse et d'oxydation. La définition des spécifications des conditions de stress (valeurs de pH, de température, de concentration d'agent oxydant) fait partie intégrante de la recherche qui nécessite des étapes essentielles d'optimisation. La qualité des échantillons stressés est étroitement liée à la mise au point d'une méthode d'analyse optimale. Pour une reproductibilité de l'expérience, chaque condition est réalisée en triplicata. La durée d'exposition des échantillons est réévaluée et varie en fonction de la sensibilité du médicament dans chacune des conditions. Un traitement préanalytique est prévu pour chaque condition de stress afin de maintenir l'intégrité des analytes et éviter d'éventuelles interférences analytiques.

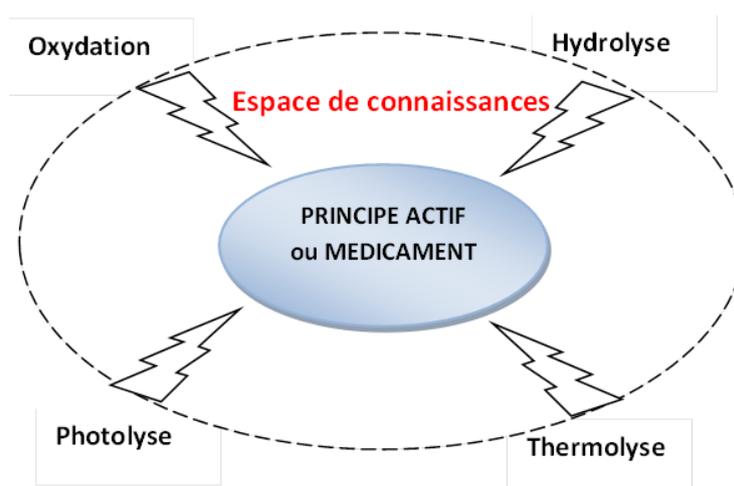


Figure 29 : Conditions de stress appliquées pour étendre l'espace de connaissances du médicament et des APIs

4.2.3. Conditions de stress appliquées à l'étude de la stabilité intrinsèque du ticagrelor

4.2.3.1. Matériels

Le ticagrelor substance chimique de référence (SCR) (PM: 522.568 g.mol⁻¹) est issu d'Intrechim[®] (France). Les comprimés de ticagrelor (Brilique[®]) sont approvisionnés par Astra Zeneca (France) et stockés à température ambiante. L'acétonitrile et l'acétate d'ammonium de pureté analytical proviennent de Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). L'eau ultrapure est produite le système Q-Pod Milli-Q (Millipore, Molsheim, France) et utilisée pour la dissolution ou comme composant de la phase mobile. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 30 % provient de Carlo Erba SDS (Val de Reuil, France). Le 2,2'-Azobis(isobutyronitrile) (AIBN) est acheté auprès de Fluka[®], l'acide acétique et l'ammoniac sont issus de VWR[®]. Une étuve qualifiée a été utilisée pour la conservation des solutions de travail (SCR et spécialité) pour les réactions d'hydrolyse (40 °C) et de thermolyse (60 °C, puis 80 °C). La photodégradation est réalisée en soumettant les échantillons dans une enceinte à arc à xenon Q-SUN Xe-1 (Q-Lab Westlake, USA) délivrant une intensité fournie de 1,50 W/m² et fonctionnant dans l'intervalle 300 – 800 nm.

4.2.3.2. Méthodes

a) Préparation de la solution d'étude et conditionnement

La solution mère de ticagrelor est obtenue en écrasant 2 comprimés dosés à 90 mg chacun dans 500 mL d'un mélange eau ultra pure / acétonitrile 50/50 (v/v). La solution de travail de concentration 180 µg mL⁻¹ est obtenue par une dilution au demi de la solution mère avec le même solvant de dilution. Cette concentration a été définie en se basant à la fois sur les propriétés spectrales d'absorption du ticagrelor et sur les résultats de l'optimisation de la méthode chromatographique. La solution de référence de ticagrelor est obtenue en pesant 180 mg de ticagrelor SCR, puis traitée dans les mêmes conditions que la spécialité. Pour chaque condition de stress correspondant à une durée d'exposition donnée, un volume de 3 mL de la solution de travail de ticagrelor est reparti en triplicate dans des vials borosilicatés de type I scellés, puis protégés de la lumière par un papier aluminium.

b) Hydrolyse acide/base :

L'hydrolyse est le plus fréquent des mécanismes de dégradation des médicaments, notamment les composés comportant des groupements lactones, esters, amides ou lactames [Waterman *et al.*, 2002a]. L'hydrolyse est réalisée sur une large gamme de pH acido – basique permettant d'englober les réactions issues de l'ionisation des groupements présents au sein de la molécule. Des acides forts (acide chlorhydrique et acide sulfurique) et base forte (NaOH) sont généralement utilisés pour les réactions d'hydrolyse à des concentrations comprises entre 0,1 et 1 M et adaptées en fonction de la sensibilité des produits étudiés [Mehta *et al.*, 2010 ; Dendeni *et al.*, 2012 ; Gana *et al.*, 2014].

Le ticagrelor a été étudié aux pH 4,0 (acide), 7,0 (neutre) et 9,0 (basique) (tableau 8) à 40 °C en utilisant un tampon acétate d'ammonium ajusté par du HCl ou du NaOH. L'hydrolyse est arrêtée sur les échantillons protégés de la lumière au bout de H0, H3, H8, H24, H48, H72 et H168 (H = heure) en congelant rapidement les échantillons à – 80 °C, jusqu'à leur analyse soit au total 126 vials correspondant à la spécialité et au ticagrelor SCR (Tableau 8).

c) Température :

La température, en accélérant la vitesse de dégradation des substances actives est largement utilisée comme agent de stress. Il est donc possible d'estimer la constante de réaction et de déterminer les relations entre un produit donné et la cinétique d'apparition ou de disparition des produits de dégradation à travers l'équation d'Arrhenius :

$$k = Ae^{-Ea/RT}$$

où k est la constante de la réaction, A est le facteur de dépendance, Ea l'énergie d'activation, R la constante des gaz parfaits ($R = 8,3144621 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), et T la température en degrés Kelvin [Alsante *et al.*, 2003]. Ce qui permet d'établir l'ordre de la réaction et par extrapolation de définir sa péremption à une température donnée. La température est impliquée dans différents mécanismes de dégradation des médicaments comme l'hydrolyse / déshydratation [Rotival *et al.*, 2014 ; Miller *et al.*, 2003], l'isomérisation/épimérisation [Hoitink *et al.*, 1998 ; Gieger *et al.*, 1986], la

decarboxylation, les réarrangements [Narayanam *et al.*, 2012], ou encore certaines réactions de polymérisation [Bundgaard *et al.*, 1976].

Les échantillons scellés de la solution de ticagrelor, protégés de la lumière sont soumis à une chaleur sèche. La réaction de thermolyse est arrêtée en sortant les échantillons de l'étuve au bout de J0, J4, J7, J10, J14 et J21 (J = jour) (Tableau 8), soit au total 72 vials correspondant aux 2 températures étudiées (60 et 80 °C) pour la spécialité et la SCR. Ces échantillons sont conservés à – 80 °C, jusqu'à leur analyse.

d) Oxydation douce et forte :

Contrairement à l'hydrolyse, les mécanismes d'oxydation sont complexes et s'opèrent soit par abstraction d'un atome électropositif, suivie d'une cascade de réactions radicalaires, soit par l'addition d'un groupement électronégatif. Les réactions d'oxydation peuvent être catalysées par l'oxygène, des métaux lourds et la lumière générant la formation de radicaux libres qui en interagissant avec l'oxygène moléculaire ou certains composés de l'environnement permettent la prolongation du processus [Waterman *et al.*, 2002b ; Ćizmić *et al.*, 2017]. Les composés comportant des fonctions aldéhydes, alcools, phénols, alcaloïdes, des acides gras insaturés et des huiles sont sensibles à l'oxydation.

Les échantillons scellés du ticagrelor sont protégés de la lumière et soumis à l'oxydation radicalaire et à différentes conditions d'oxydation forte forte à l'H₂O₂ (Tableau 8). Les échantillons sont analysés extemporanément.

e) Lumière :

La lumière peut engendrer la dégradation de certaines molécules présentant des groupements sensibles à ses effets directs ou indirects. Ces réactions concernent essentiellement les molécules présentant des groupements chromophores absorbant la lumière dans la zone allant du proche ultraviolet (UVA) au visible (groupements carbonyles, alcènes, nitro aromatique, sulfides, polyènes, hydroxydes, etc.). Cette dégradation peut également être médiée indirectement par d'autres constituants du milieu comme des excipients ou des impuretés diverses telles que des ions métalliques. Deux grands groupes de réactions photochimiques peuvent se

distinguer : a) les réactions dépendantes d'O₂ qui sont des réactions de photo-oxydations et b) celles indépendantes de l'oxygène comme les réactions de déshydrogénation, de réarrangements ou de polymérisation. L'ICH Q1B recommande d'exposer les médicaments à l'état solide ou en solution à une intensité minimale de 1,2 million lxh et 200 W.h.m⁻² [ICH, 1996]. Il est d'usage de soumettre les médicaments au stress de la lumière dans la zone allant de 300 à 800 nm.

Le ticagrelor a été soumis au stress photolytique dans l'enceinte à arc à xénon délivrant une intensité de 1,5 W/m² dans l'intervalle 300 – 800 nm. Pour éviter les variabilités liées à la source et à l'emplacement des échantillons dans l'enceinte, les échantillons sont conditionnés en verre borosilicaté de type I, permettant la transmission de la lumière avec des temps d'exposition espacés de 30 minutes de 0 à 4 heures (Tableau 8). Pour chaque temps les échantillons sont maintenus et fixés à 3 emplacements équidistants dans l'enceinte d'exposition. Pour étudier la photo-oxydation médiée par l'oxygène moléculaire, deux conditions ont été étudiées : d'une part une série d'échantillons repartis en présence d'O₂ et de l'autre une série préparée en anaérobiose par barbotage d'azote pendant 30 minutes.

4.3. Développement et optimisation des méthodes

Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

4.3.1. Instrumentation

Le système de CLHP est une Dionex[®] (Les Ulis, France) composée d'une pompe quaternaire, munie d'un dégazeur, d'un détecteur UV-visible à barrettes de diodes, d'un compartiment colonne thermostaté et d'un passeur automatique d'échantillons, le tout piloté par le logiciel Chromeleon[®] version 6.80 SR11 (Dionex[®], Les Ulis, France).

Tableau 8 : Plan d'expérience de l'étude du ticagrelor spécialité ou SCR dans les différentes conditions de stress

Conditions de Stress	Solvant de dilution	Température (°C)	Durée d'exposition (H, J)	Nombre d'échantillons
Hydrolyse	Tampon acétate d'ammonium			
Acide	pH 4	40	H0;H3;H8;H24;H48;H72;H168	21
Neutre	pH 7	40	H0;H3;H8;H24;H48;H72;H168	21
Base	pH 9	40	H0;H3;H8;H24;H48;H72;H168	21
Oxydation	0,03% H ₂ O ₂	20	H0;H0,5;H1;H1,5;H2, H2,5;H3; H4	24
Oxydation	0,3% H ₂ O ₂	20	H0; H1; H2; H3; H4	15
Oxydation	3% H ₂ O ₂	20	H0; H1; H2; H3; H4	15
Radicalaire	0,2 mol/L AIBN	20	H0;H3;H8;H24;H48;H72;H168	21
Photolyse en présence d'O₂	H ₂ O	20	H0;H0,5;H1;H1,5;H2;H2,5;H3;H4	24
Photolyse en présence de N₂	H ₂ O	20	H0;H0,5;H1;H1,5;H2;H2,5;H3;H4	24
Thermolyse	H ₂ O	60	J0;J4;J7;J10;J14;J21	18
Thermolyse	H ₂ O	80	J0;J4;J7;J10;J14;J21	18

H : heure ; J : jour.

4.3.2. Développement et optimisation d'une méthode d'analyse CLHP dite indicatrice de stabilité (SIM)

La méthode d'analyse indicatrice de stabilité (SIM) joue un rôle central dans le contrôle qualité des médicaments, dans les étapes de préformulation et les études formelles de stabilité. A travers la détection voire la quantification des produits de dégradation dans diverses conditions de stress (température, photolyse, oxydation et hydrolyse), ces méthodes (SIM) permettent d'objectiver l'apparition de ces produits dans les conditions réelles de conservation ou d'utilisation et d'anticiper leur impact sur le médicament en terme d'efficacité et de sécurité.

Le développement et l'optimisation d'une SIM obéissent à une démarche logique qui prend en compte les propriétés physico-chimiques de la molécule étudiée à laquelle

se greffent les différents éléments analytiques (pré-analytiques et paramètres instrumentaux).

Des conditions chromatographiques initiales (choix de colonne, de phase mobile, système de détection, température, débit, etc.) doivent être déterminées dans le but de permettre une séparation grossière du pic principal de ses impuretés. Une optimisation systématique de l'ensemble des paramètres aboutit à la méthode SIM. Cette optimisation peut s'obtenir :

- soit par la méthode traditionnelle qui consiste à ajuster une variable à la fois et d'évaluer son impact sur la séparation des pics. Cette méthode présente l'inconvénient d'être moins flexible vis-à-vis des exigences réglementaires et de négliger l'apport de certains paramètres
- soit à travers la chimiométrie qui se base sur des méthodes statistiques et graphiques permettant d'optimiser plusieurs paramètres simultanément. Cette stratégie par la conception des expériences (DOE) présente l'avantage d'être ingénieuse, d'une rapidité de mise en œuvre, permettant une meilleure compréhension des variables analytiques critiques et une flexibilité des analyses dans diverses matrices ainsi qu'une plus grande robustesse [Suresh Kumar *et al.*, 2012 ; Singh *et al.*, 2013 ; Murthy *et al.*, 2013 ; Sahu *et al.*, 2017]. Les opérations de qualification, de contrôle et de transfert des méthodes se font continuellement tout au long de leurs cycles de vie. DOE est en concordance avec le paradigme de la qualité par la conception (QbD) traité dans l'ICH Q8 [ICH, 2009].

L'approche de la « qualité par la conception » est une des approches par laquelle passe un développement et une optimisation efficace d'une SIM [Orlandini *et al.*, 2013 ; Kalariya *et al.*, 2015 ; Vogt *et al.*, 2011]. Elle aide à mieux comprendre les variables de la méthode, à définir des paramètres robustes et les limites de résolution des séparations applicables tout au long du cycle de vie du médicament. Cette approche comporte un certain nombre d'éléments-clés interconnectés (Figure 31), qui commence par la définition du profil analytique cible ou ATP (Analytical Target Profile). Dans le cadre du ticagrelor, l'ATP se résume à la mise au point d'une SIM permettant de séparer et de quantifier le ticagrelor de ses produits de dégradation sans aucune interférence.

Puis est déterminé le profil qualité cible de la méthode ou QTMP (quality target Method profil) qui intègre toutes les informations spécifiques relatives à la méthode comme les propriétés physico-chimiques des composés à analyser (logP, pKa, solubilité, etc.), l'utilisation de la phase mobile en modes isocratique ou gradient, la préparation des échantillons, le protocole des études de stress, les spectres UV, etc. (Figure 30). L'optimisation du QTMP peut faire appel à une analyse de risques qui peut se mettre en œuvre par des outils comme le diagramme d'Ishikawa (Figure 31) [Jason, 2014 ; Boussès *et al.*, 2015 ; Parr *et al.*, 2017]. La conception et la mise en place expérimentale proprement dite de la méthode donneront accès aux paramètres critiques de la méthode ou CPMs (comme le débit, la température ou le pH de la phase mobile) et à ses attributs critiques matières ou CMAs (Résolution et élargissement des pics, les facteurs de capacité, etc.) [García-Alvarez-Coque *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2014]. Ces éléments permettent la validation de la méthode et la définition des paramètres stratégiques de contrôle (Exemple : pH \pm 2, longueur d'onde de quantification \pm 0,5 nm, etc.). L'analyse régulière de ces éléments de sortie permet leur suivi et répond à l'exigence d'amélioration continue tout le long du cycle de vie du médicament.

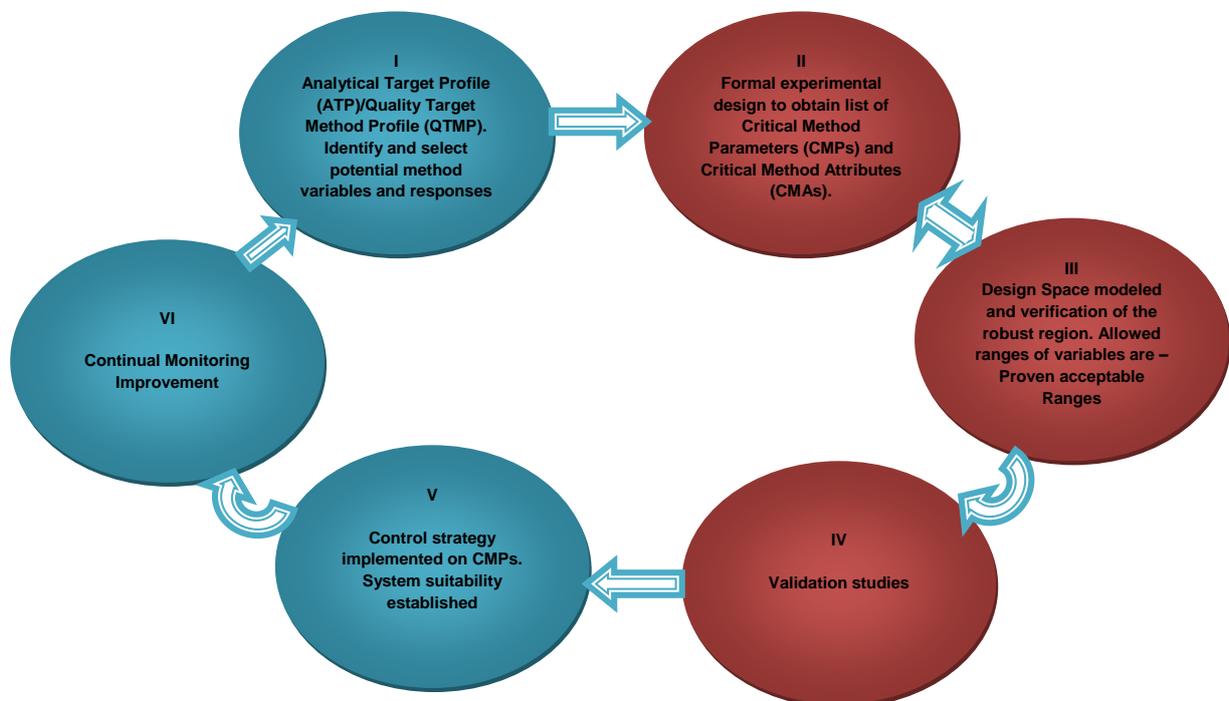


Figure 30 : Développement de méthode analytique par l'approche QbD.

(Modifié d'après Jason, 2014).

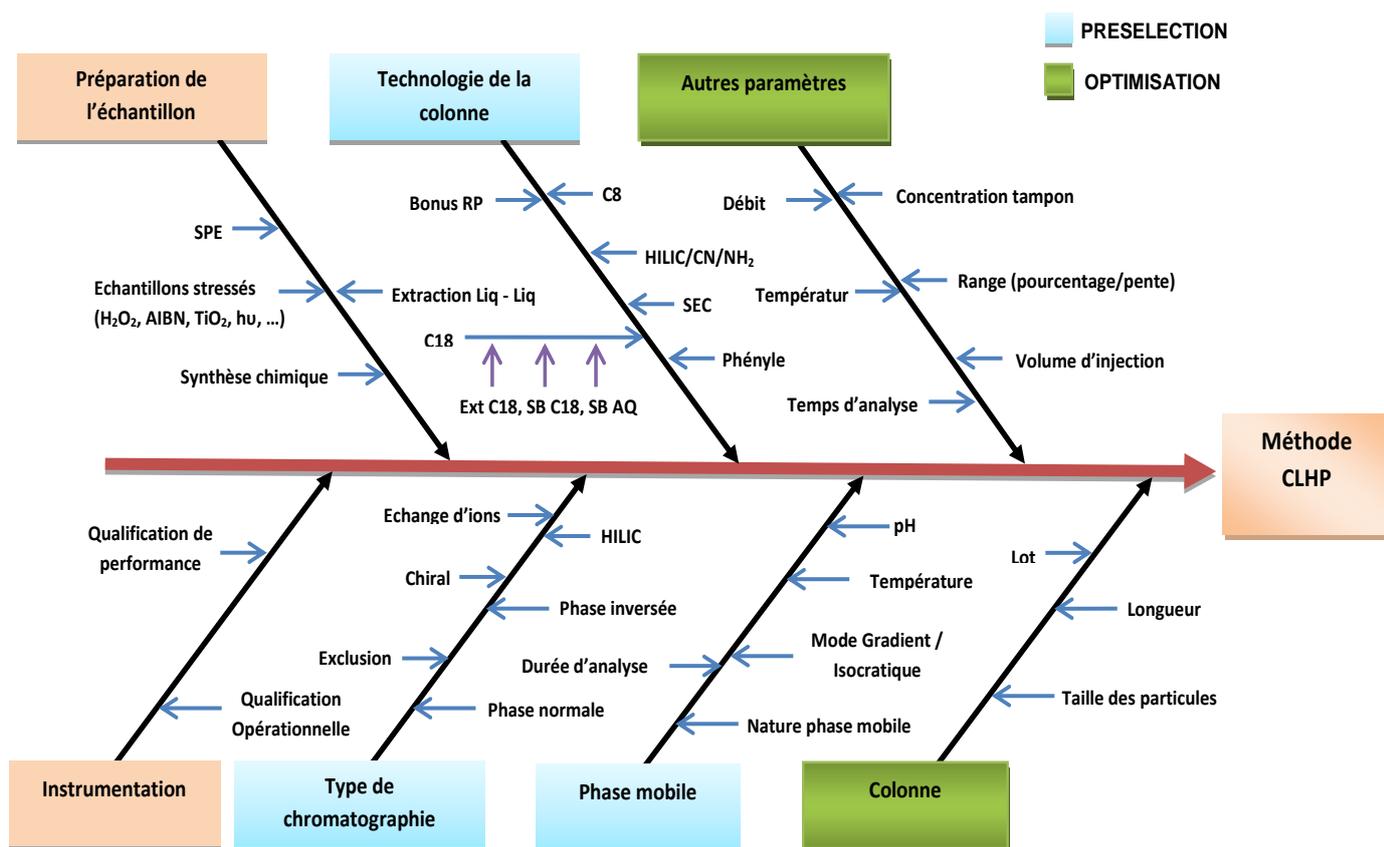


Figure 31 : Diagramme d'Ishikawa montrant les phases de développement d'une méthode analytique avec les variables d'entrée

(Modifié d'après Jason, 2014).

4.3.2.1. Détermination des propriétés physico-chimiques du ticagrelor

La connaissance des propriétés physico-chimiques du ticagrelor comme le logP/logD, le pKa et la solubilité est nécessaire pour les étapes préanalytiques et au choix et à la composition de la phase mobile. Des logiciels gratuits ou payants permettent d'accéder aux propriétés de la molécule soit en éditant la molécule soit en important un fichier de la molécule sous divers formats : SMILES, SMARTS, MDL molefiles, RGfiles, cdx, cdxml, Gaussian Input/Output, le nom (CAS #, ascii, etc.), etc. (Tableau 9).

Le ticagrelor est pratiquement insoluble dans l'eau, mais soluble dans l'éthanol, le diméthylformamide (DMF) et le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques du ticagrelor

Experimental Properties	Value	Source
Water solubility	10 µg/mL	FDA label
Predicted Properties		
Water solubility	0.063 mg/mL	ALOGPS
logP	2.31	ALOGPS
logP	2.28	ChemAxon
logS	-3.9	ALOGPS
pKa (Strongest Acidic)	12.94	ChemAxon
pKa (Strongest Basic)	2.93	ChemAxon
Physiological Charge	0	ChemAxon
Hydrogen Acceptor Count	9	ChemAxon
Hydrogen Donor Count	4	ChemAxon
Polar Surface Area	138.44 Å ²	ChemAxon
Rotatable Bond Count	10	ChemAxon
Reactivity	142.13 m ³ .mol ⁻¹	ChemAxon
Polarizability	51.27 Å ³	ChemAxon
Number of Rings	5	ChemAxon
Bioavailability	1	ChemAxon

4.3.2.2. Choix de la colonne et des conditions d'utilisation

Comme exposé dans le chapitre 2, l'architecture de colonne (pureté de la silice, endcapping, longueur, etc.), constitue un élément essentiel pour le développement d'une SIM. Des modèles tels que SSC (system selectivity cube) ou HSM (hydrophobic subtraction model) ont été développés et aident à la comparabilité et au choix des colonnes en fonction de leurs similarités chimiques [Marchand *et al.*, 2005 ; Johnson *et al.*, 2010 ; Andrew *et al.*, 2012 ; Borges, 2014]. La colonne analytique choisie compte tenu du logP du ticagralor est une Xterra MS C18 (Waters, Ireland) de 50 mm longueur ; 4,6 mm de diamètre interne et 2,5 µm de taille des particules. Ces dernières sont synthétisées en utilisant un mélange de deux organosilanes organique (méthyltriéthoxysilane) et inorganique (méthylsiloxane). Au sein de cette

phase stationnaire hybride, les silanols libres sont très réduits grâce à leur substitution par des groupements méthyles ($Si - CH_3$) [Cheng *et al.*, 2000 ; Borges *et al.*, 2013], ce qui leur confère une très grande résistance chimique et mécanique y compris à des valeurs de pH très élevées [Claessens *et al.*, 2004]. Cette colonne présente une faible hydrophobicité permettant de moins retenir les composés, une polarité modérée décrite pour fournir des pics symétriques. En outre, la très faible activité des silanols et des métaux leur confère une grande efficacité et réduit l'élargissement des pics [MAC-MOD Analytica, 4th Ed 2008].

4.3.2.3. Température, facteur d'optimisation

La température est un paramètre qui permet d'améliorer la séparation des pics chromatographiques. L'influence de la température sur la sélectivité peut être exprimée par l'équation de Van't Hoff :

$$\log k_{\phi,T} = \frac{\Delta S}{2,3R} - \frac{\Delta H}{2,3RT} + \log \phi,$$

où ΔS et ΔH représentent les variations d'entropie et d'enthalpie du système, T température absolue, R la constante universelle des gaz parfaits, et ϕ le ratio de la phase organique dans la phase mobile. Cette équation permet de choisir les paramètres appropriés permettant d'obtenir les constantes souhaitées [Chester *et al.*, 2003].

Pour le ticagrelor, les essais ont été réalisés à 20 °C et à 25 °C sans différence notable sur la sélectivité. La température de la colonne est finalement maintenue à 25 °C.

4.3.2.4. Choix de la phase organique et du pH de la phase mobile

a) Phase organique et programme CL

L'acétonitrile et le méthanol étant les solvants les plus utilisés en CL, la solubilité du ticagrelor a été également déterminée dans ces solvants, et est parue meilleure dans l'acétonitrile.

L'étape d'optimisation a fait appel à diverses phases mobiles comme du méthanol, de l'acétonitrile, des tampons phosphate et ammonium dans des proportions variées et à des valeurs de pH variées. La seule règle était de faire varier un paramètre à la

fois. L'optimisation a été faite sur des solutions stressées et la solution de référence de ticagrelor.

La séparation des pics avec une bonne résolution est obtenue avec une phase mobile composée d'un solvant A (Acétonitrile) et d'un solvant B (tampon acétate d'ammonium 10 mM) selon le mode gradient décrit dans le [tableau 10](#). Les phases mobiles sont dégazées aux ultrasons pour éviter la formation de bulles dans le système et prévenir les effets délétères de certains gaz comme l'O₂ et le N₂ pouvant modifier de compressibilité engendrée par ces gaz et réduire la durée de vie des colonnes.

Tableau 10 : Programme pour la chromatographie liquide

Temps (min)	Solvant A : Acétonitrile (% v/v)	Solvant B : Tampon acétate d'ammonium (% v/v)
0 → 2	10 → 15	90 → 85
2 → 8	15 → 70	85 → 30
8 → 10	15 → 70	85 → 30
10	15	85
20	10	90

b) Choix du pH de la phase mobile

Comme illustrée par la [figure 32](#), dans la zone de pH comprise entre 1 et 14, le ticagrelor présente plusieurs formes ioniques, avec des zones de prédominances variables. Ces formes ioniques constituent autant d'interactions possibles et différentes avec la phase stationnaire, avec des modifications potentielles des paramètres de sélectivité. Avec un tel comportement acido-basique, le choix du pH est primordial pour atteindre des niveaux de résolution escomptés.

Le pH de la phase mobile a été choisi entre 4 et 6 de sorte à avoir une seule forme ionique du ticagrelor [[Ruiz-Angel et al., 2004](#)].

4.3.2.5. Autres paramètres : Débit et volume d'injection et détection

Le débit et le volume d'injection ont été définis de sorte à avoir un temps d'analyse acceptable et éviter toute saturation du système. Ces paramètres ont été réglés à 1,2 mL min⁻¹ et 20 µL respectivement.

L'optimisation de la méthode est vérifiée à travers la séparation du ticagrelor et de ses produits de dégradation avec une résolution (R_S) acceptable pour un temps d'analyse raisonnable. Les chromatogrammes ont été enregistrés entre 190 et 400 nm et la pureté des pics vérifiée grâce au DBD, s'assurant qu'aucune co-élution se traduisant par une superposition de pics n'est observée durant l'analyse. La longueur d'onde de quantification est réglée à 222 nm au regard du spectre d'absorption (Figure 33) et le temps d'analyse pour chaque injection fixé à 20 minutes.

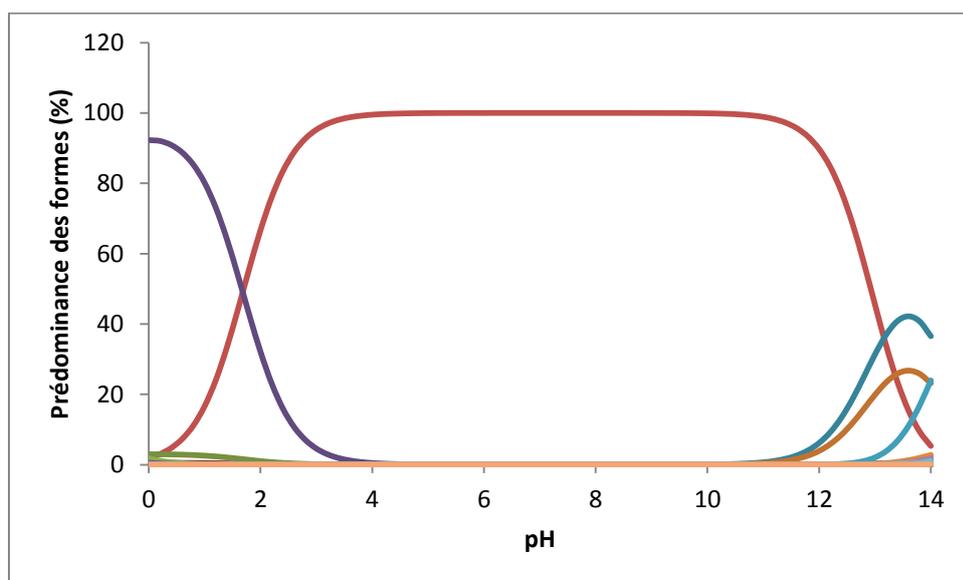


Figure 32 : Représentation des formes ioniques du ticagrelor pour le choix du pH de la phase mobile en fonction des valeurs du pKa (Données ChemAxon).

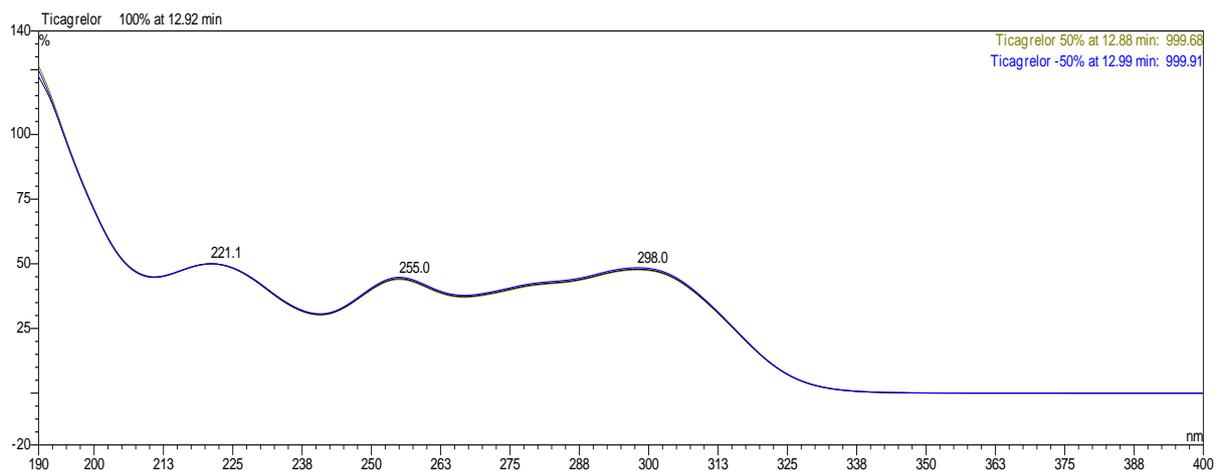


Figure 33 : Spectre UV du ticagrelor

4.4. Résultats du développement et de l'optimisation de la méthode LC

Dans l'ensemble, les produits de dégradation sont essentiellement élués avant le ticagrelor et peuvent être considérés comme étant plus hydrophiles que le ticagrelor. La méthode LC combinée à l'extraction d'ion par la SM a révélé la présence de 9 produits de dégradation (DPs) nommés DP1 à DP9 en fonction de leur ordre d'éluion (Figure 34). L'étude de la pureté des pics par le DBD et par la suite l'enregistrement des spectres SM en mode full scan a montré l'absence de toute co-élution.

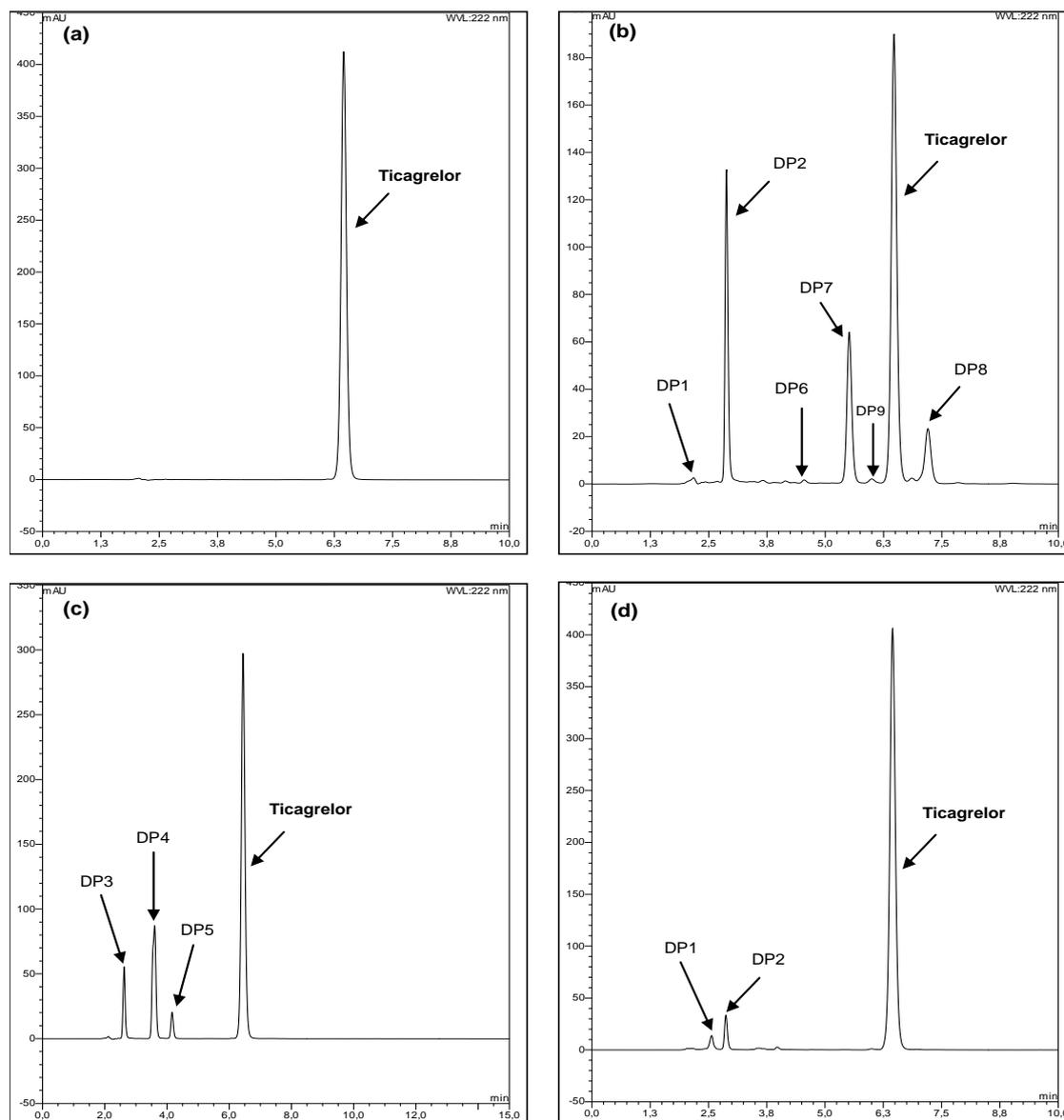


Figure 34 : Chromatogrammes résultant de l'exposition du ticagrelor aux conditions de stress testées : (a) Solution standard de ticagrelor; (b) Photolyse; (c) Oxydation; (d) Thermolyse

4.5. Validation de la méthode pour le ticagrelor et ses produits de dégradation

La méthode SIM développée et optimisée a été validée conformément aux recommandations de la ligne directrice ICH Q2 (R1) [ICH, 2005] et SFSTP [Hubert *et al.*, 2006]. La spécificité a été établie sur la base des séparations

chromatographiques et la pureté des pics. La linéarité et l'exactitude ont été étudiés dans l'intervalle de concentration de 60 - 140 % autour de la concentration cible fixée à $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ sur trois jours consécutifs. La précision intermédiaire et la répétabilité ont été testées par injection de six solutions individuelles de ticagrelor à $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ sur trois jours consécutifs. Les limites de quantification (LOQ) et de détection (LOD) ont été définies graphiquement en considérant les rapports signal sur bruit de 10:1 et 3:1, respectivement.

En outre, une méthode a également été validée pour les impuretés. Du fait que les DP's ne soient pas disponibles dans le commerce, le ticagrelor a été utilisé à cette fin dans la marge de concentrations de 0,06 – 0,10 % ($0,108 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $0,18 \mu\text{g mL}^{-1}$). La linéarité et l'exactitude ont été évaluées.

Comme illustrée avec les chromatogrammes de la [figure 34](#), une bonne résolution est obtenue entre le ticagrelor et ses DP's obtenus dans les différentes conditions de stress, et aucune co-élution n'a été mise en évidence. Les paramètres de validation de la méthode ([Tableau 11](#)) montrent une réponse de signal du ticagrelor linéaire dans la gamme de concentrations de $108 - 252 \mu\text{g mL}^{-1}$, avec un coefficient de corrélation linéaire R de 0,995. Les LOD et LOQ, basées sur la mesure du rapport signal sur bruit de fond ont été obtenues à 0,03 et $0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivement. La méthode est précise avec un RSD < 2,1 (n=18) pour la précision intermédiaire, exacte avec d'excellents recouvrements et de faibles erreurs relatives ([Figure 35a](#)) et également robuste avec une variation de 1,4 % de la solution analytique conservée à température ambiante pendant 12h ([Tableau 11](#)). Concernant la capacité de la méthode à la détermination des impuretés dans la gamme de concentrations de $0,108 \mu\text{g mL}^{-1} - 0,180 \mu\text{g mL}^{-1}$, les résultats sont dans l'ensemble satisfaisants, malgré le faible écart du profil d'exactitude par rapport aux limites d'acceptation de $\pm 2\%$ dû aux faibles niveaux de concentrations utilisés ([Tableau 11](#), [Fig. 35b](#)).

Tableau 11 : Paramètres de validation de la méthode de quantification du ticagrelor et de détermination de ses impuretés

Paramètres	Résultats
<i>Linéarité</i>	
PA : Gamme concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[108;252]
Pente	0.4819
ET de la pente	0.0068
Ordonnée à l'origine	-14.47
ET Ordonnée à l'origine	1.26
Coefficient de Corrélation (r)	0.9975
Impuretés : Gamme concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[0.108;0.180]
Pente	0.1581
Ecart-type de la pente	0.0129
Ordonnée à l'origine	-0.0031
Ecart-type Ordonnée à l'origine	0.0019
Corrélation coefficient (r)	0.9593
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.03
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.09
<i>Précision (RSD%, n=6)</i>	
Inter-jours	2.04
Intra-jour	0.018
<i>Exactitude</i>	
PA: % Recouvrement	99.88
SD	1.91
Impuretés : % Recouvrement	100.04
Ecart-type	5.43
<i>Stabilité de la solution (12h) (n=6)</i>	-1.4%

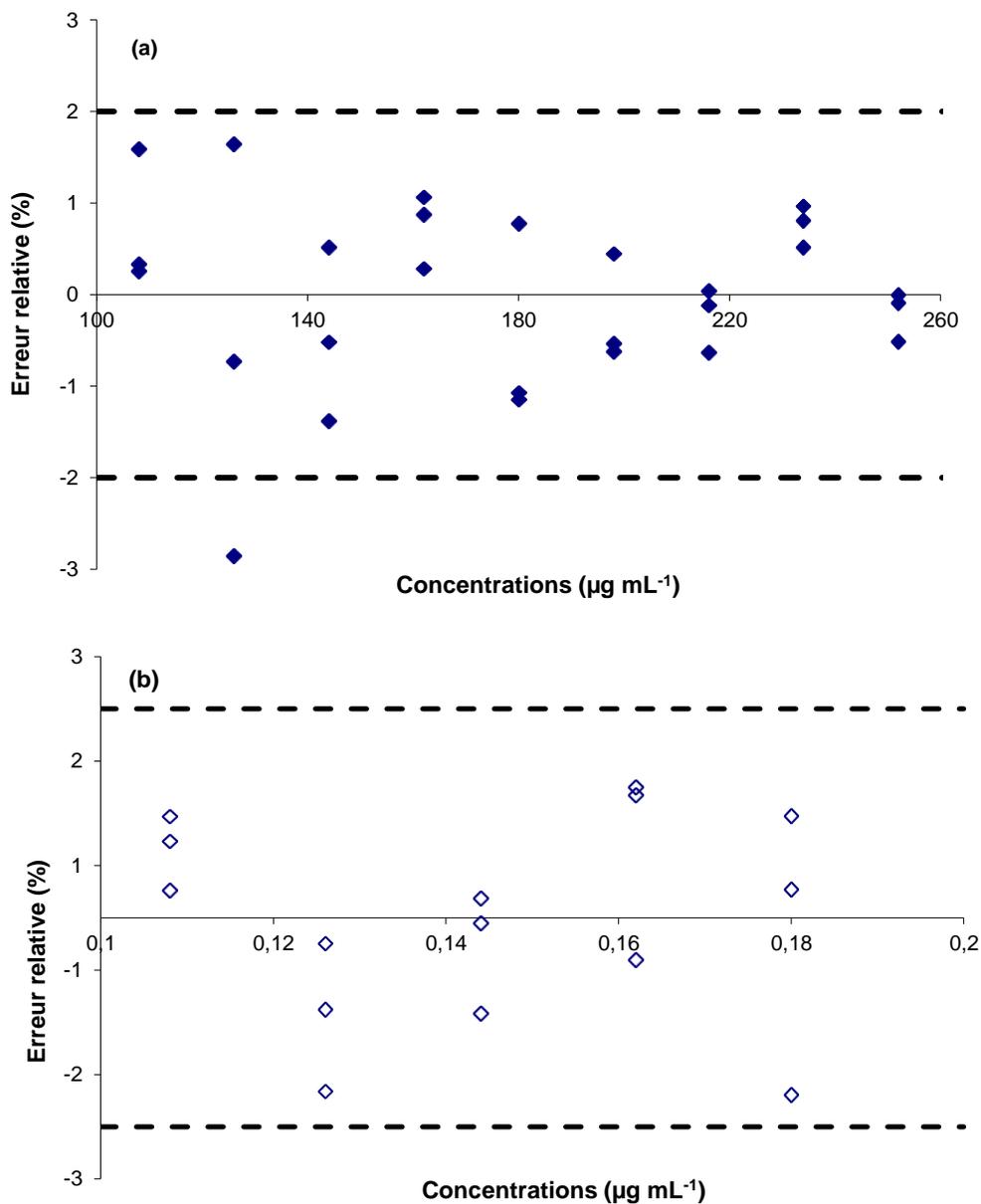


Figure 35 : Profil d'exactitude pour la validation du ticagrelor (n=9) (a) et des impuretés (n=5) (b); utilisant le modèle de régression linéaire (Limites d'acceptabilité à $\pm 2\%$).

4.6. Etude de la stabilité intrinsèque du ticagrelor

4.6.1. Dégradation du ticagrelor

La sensibilité du ticagrelor aux conditions de stress varie en fonction du type de milieu.

4.6.1.1. Thermolyse

Soumis aux conditions de thermolyse à 80 °C, le ticagrelor se dégrade lentement et environ 45 % de la teneur initiale reste encore en solution après 21 jours d'exposition. Mais, indépendamment du taux de dégradation, DP3 a été rapidement formé. Le coefficient de corrélation R de Pearson de - 0,998 (DP3) confirme que la diminution du ticagrelor est corrélée avec la formation de ce produit de dégradation.

4.6.1.2. Photolyse

Sous l'influence de la lumière, aucune différence n'a été observée entre les échantillons en présence d'oxygène ou d'azote. Le comportement du ticagrelor est très différent de la thermolyse, avec une chute de teneur d'environ 77% en seulement 4h d'exposition, contrebalancée par l'apparition des produits de dégradation DP1, DP3, DP6, DP7 et DP9 (Coefficients corrélation de Pearson R= - 0,874, R= -0,980, R= -0,9931, R= -0,8006 and R= -0,9559, respectivement).

4.6.1.3. Oxydation forte à l'H₂O₂

Le ticagrelor se révèle être extrêmement fragile aux conditions oxydatives fortes au peroxyde d'hydrogène. Aux concentrations usuelles utilisées dans les conditions de stress à de 1 à 3% d'H₂O₂, le ticagrelor est entièrement dégradé au bout de 30 minutes. La concentration à 0,3% H₂O₂ donne des résultats similaires. Le ticagrelor a finalement été traité en présence de 0,03% (v/v) (soit une concentration finale d'H₂O₂ à 0,015%) qui le convertit rapidement en DP2, DP4 et DP5.

4.6.1.4. Autres conditions de stress

Contrairement aux conditions de thermolyse, d'oxydation à l'H₂O₂ et photolyse, le ticagrelor s'est révélé stable dans les conditions d'hydrolyse testées et à l'oxydation douce à l'AIBN.

4.6.2. Cinétique de dégradation du ticagrelor

La stabilité intrinsèque du ticagrelor a été évaluée grâce à la méthode LC-UV validée qui permet de suivre la variation de teneur du ticagrelor en fonction du temps. L'ordre de la cinétique de dégradation, la constante de réaction ainsi que la demi-vie de réaction correspondant à chacune des conditions de stress auxquelles est soumis le ticagrelor (oxydation, thermolyse, photolyse et hydrolyse) ont été déterminés.

La dégradation du ticagrelor en fonction du temps à température ambiante suit un processus linéaire, démontrant que le processus correspond à une cinétique d'ordre zéro (Figure 36). Par conséquent, la constante de vitesse (k) et la demi-vie ($t_{1/2}$) peuvent être calculées comme suit [Patrick *et al.*, 2011] :

$$k = (A_0 - A_t)/t \text{ et } t_{1/2} = (A_0 - A_t)/2k$$

où A_0 est la concentration initiale de ticagrelor et A_t la concentration en fonction du temps, t est le temps.

Comme le montre le tableau 12, les valeurs de demi-vie ($t_{1/2}$) trouvées dans les conditions photolytiques et oxydantes étaient de 1,92 et 7,45 h, respectivement, ce qui confirme la sensibilité élevée du ticagrelor à ces facteurs. L'impact de la catalyse thermique s'est révélée plus douce sur la stabilité du ticagrelor ($t_{1/2} = 1125$ h).

Tableau 12 : Résumé des constantes de vitesse de réaction d'ordre zéro du ticagrelor dans les conditions de stress étudiées

Conditions de stress	k ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	$t_{1/2}$ (h)	Equation de régression linéaire
Hydrolyse	-	-	-
Radical (AIBN)	-	-	-
Oxydation H_2O_2 0,03%	0,019	7,45	$y = -0,0143x + 0,2816$ $R^2=0,9964$
Photolyse	0,065	1,92	$y = -0,0405x + 0,25$ $R^2=0,9375$
Température (80 °C)	0,00013	1125	$y = -0,0003x + 0,2848$ $R^2=0,9861$

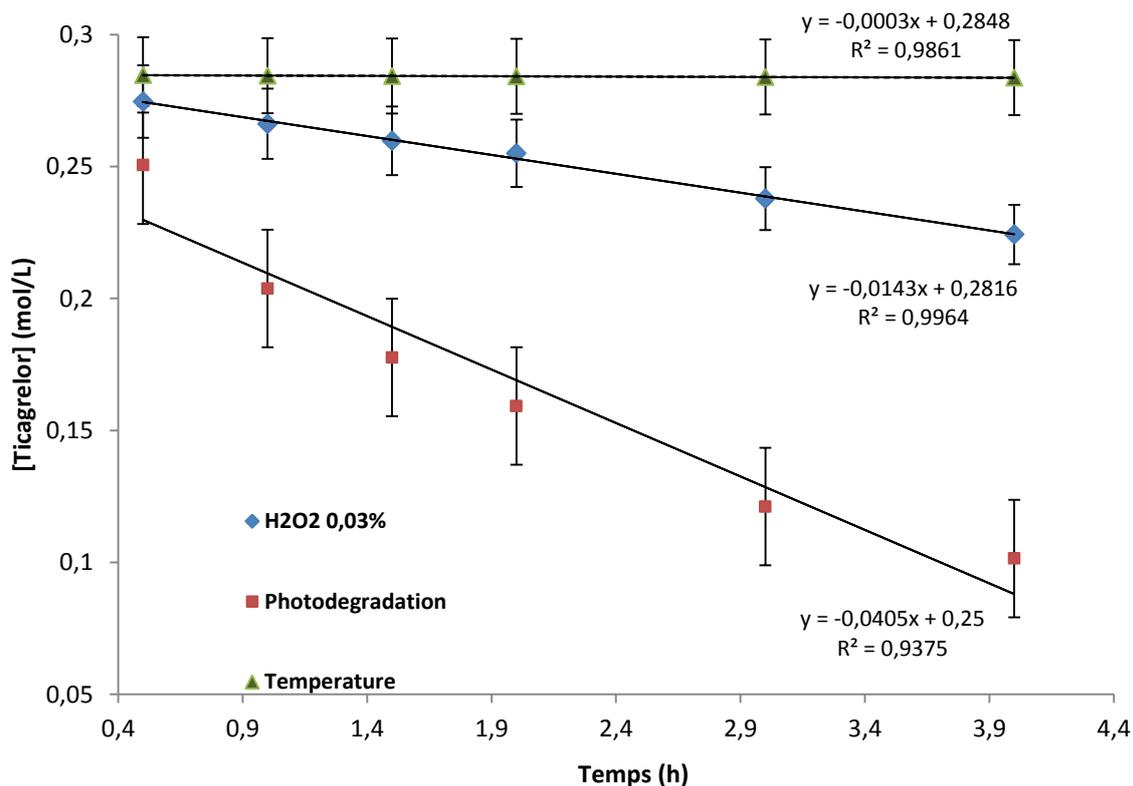


Figure 36 : Evolution de la concentration de ticagrelor en fonction du temps pour ces différentes conditions de stress

4.7. Caractérisation des produits de dégradation du ticagrelor

L'élucidation structurale des produits de dégradation est un processus fastidieux faisant appel à un ensemble de techniques analytiques complémentaires, souvent couplées. Dans cette démarche les méthodes séparatives (développement d'une SIM) sont utilisées en première intention, complétées par les autres techniques comme la LC-MS, LC-HR-MSⁿ ou la LC-RMN 1D et 2D [Narayanam *et al.*, 2013 ; Rotival *et al.*, 2014]. La stratégie de caractérisation des produits de dégradation (Figure 37) du ticagrelor comporte des étapes logiques qui commencent par une optimisation des paramètres SM, la détermination du mode d'ionisation (positive ou négative) et l'infusion directe du ticagrelor pour une connaissance exhaustive de son profil de fragmentation. Parallèlement et de façon similaire, la SM est optimisée couplée avec la SIM LC développée pour l'étude des DPs. Par la suite, les masses exactes sont déterminées pour les ions moléculaires du principe actif et de ses DPs, ainsi que leurs ions fils grâce à la haute résolution Orbitrap[®]. De ces données se déduisent leurs compositions élémentaires en se servant de l'erreur avec la composition élémentaire exacte théorique (en ppm). Des analyses supplémentaires

sont réalisées (MS^n pour l'API et LC- MS^n pour les DP) pour établir les relations entre les ions parents et leurs ions fils. D'autres données comme la règle de l'azote, la détermination du nombre d'hydrogènes labiles par échange hydrogène / deutérium, les pertes de neutres ou encore le RDB ou IHD (Indice de déficit en hydrogène) peuvent aider à établir les connectivités entre les fragments et permettre d'établir le schéma de fragmentation de l'API, puis par approche déductive logique, les schémas de fragmentation de ses DP. Enfin, le schéma de dégradation de l'API est proposé dans les différentes conditions de stress.

4.8. Optimisation des paramètres SM et couplage LC-MS

4.8.1. Instrumentation

Le système de spectrométrie de masse haute résolution est muni d'une source Electrospray (ESI) – LTQ-Orbitrap Velos Pro system, composée d'une double trappe linéaire et une trappe Orbitale (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Les données MS ont été traitées en utilisant un logiciel Xcalibur® (version 2.2 SP 1,3'). Le couplage LC-HR- MS^n a été effectué en utilisant la même chaîne Dionex UltiMate 3000 HPLC avec le système electrospray-LTQ-Orbitrap Velos Pro.

4.8.2. Optimisation LC-MS

Le développement de la méthode LC a été fait en prenant en compte le couplage avec LC-MS, d'où l'utilisation d'éluants compatibles avec le spectromètre de masse. Le mélange eau-acétonitrile est relativement volatile, propriété recherchée en SM. Cela a justifié la raison pour laquelle les tampons phosphates et les phases mobiles riches en électrolytes ont été évités à cause des risques importants d'encrassement du système et de suppression de signal des solutés à leur profit (sélectivité d'ionisation). Le tampon acétate d'ammonium 10 mM est utilisé pour favoriser la formation d'adduits $[M + NH_4]^+$. Les phases A et B sont acidifiées par 0,2% d'acide acétique dans l'optique de favoriser davantage l'ionisation des solutés. La concentration d'étude est de $180 \mu\text{g mL}^{-1}$, le volume injecté de 20 μL , dont le 1/3 parvient au détecteur du SM et les 2/3 sont dirigés vers le détecteur Corona® CAD™ (Charged Aerosol Detection).

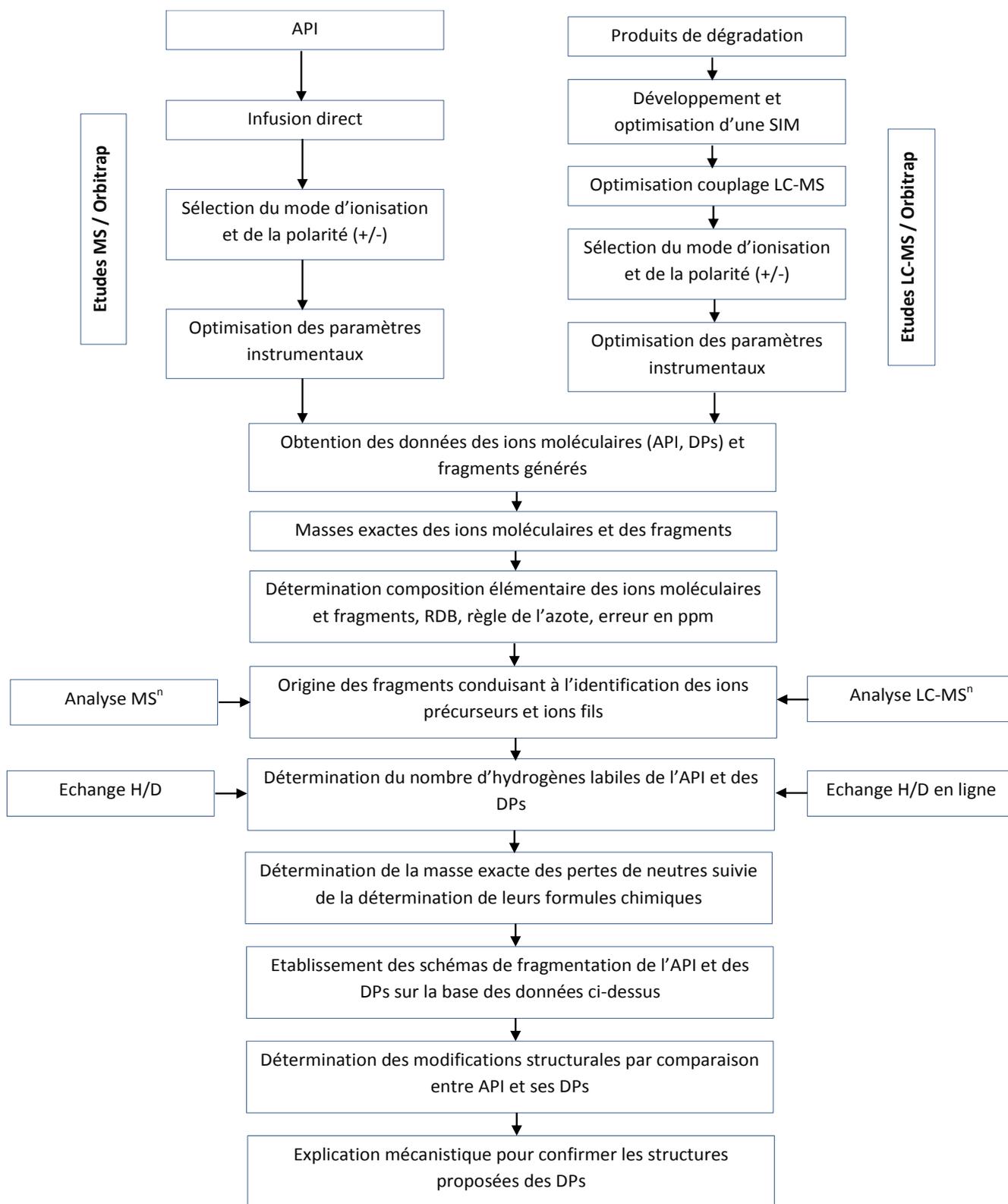


Figure 37 : Stratégie générale de conduite des études d'élucidation structurale et de proposition des principales voies de dégradation des substances actives pharmaceutiques

(Modifiée d'après Narayanam *et al.*, 2013).

Les paramètres instrumentaux ont été optimisés selon leur importance [Narayanam *et al.*, 2014] (Tableau 13) afin d'avoir une intensité du signal de l'ion moléculaire du ticagrelor stable et reproductible, suivi de sa fragmentation. La tension de source a été fixée à 3,4 kV, les températures de la source et du capillaire ont été fixées à 500 °C et 600 °C, respectivement en tenant compte du recul sur l'analyse des composés organiques au sein de notre laboratoire. Le paramètre S-Lens est réglé à 60%. L'azote est employé comme gaz de nébulisation et gaz auxiliaire à des débits fixés à 35 et 15 unités arbitraires, respectivement. L'acquisition des spectres MS complets (mode full scan) et des spectres MSⁿ des ions sélectionnés (acquisition automatique grâce au LTQ) est réalisée dans la gamme de masse de 50 à 800 Da pour la détection des solutés et leurs produits de dégradation. L'option « exclusion dynamique » permet de mettre en évidence des ions de faibles intensités et régler les problèmes de co-élution évoqués avec la CLHP seule et la détection 3D du détecteur à barrettes de diodes.

L'énergie de collision pour les modes infusion et couplage a été fixée entre 30 et 40%, valeurs optimales permettant d'avoir des fragmentations appropriées de l'ion moléculaire ainsi que des ions fils en MSⁿ, tout en évitant des fragmentations intra-source. En plus de la calibration interne, une solution de standardisation est quotidiennement utilisée pour la calibration externe des masses. La température du local de l'Orbitrap est maintenue constante.

Tableau 13 : Principaux paramètres et leurs rôles dans l'optimisation de la SM.

Parameters	Importance
Sheath gas/nebulizing gas	A gas that is added into the source, which helps in the formation and desolvation of the sprayed droplets. It is introduced co-axially to the electrospray needle or desolvation unit. Nitrogen is commonly utilized for this purpose.
Auxiliary gas	Outer co-axial flowing gas, which assists sheath gas in desolvation and nebulization.
Dry gas/drying gas/desolvation gas	Dry gas is a heated nitrogen gas that is used for evaporating the solvent before they enter into the capillary. Generally used in spray based ionization sources.
Dry temperature/Capillary temperature	In order to bring desolvation, source is heated upto a well defined temperature.
Curtain gas	A curtain gas is a pure inert gas (nitrogen) that flows in a small volume chamber between curtain plates and orifice plates. It provides a region for ion declustering. Also, it separates the sample ions from the solvent, buffer molecules and prevents entry of air into source.
Collision gas	An inert gas is introduced in to collision cell at high pressure to achieve fragmentation of an ion.
Buffer gas	Inert gas added into ion trap to decrease kinetic energy of ions and to prevent spatial dispersion of ions.
Capillary voltage/spray voltage	An electrical potential or voltage applied between the capillary entrance and sprayer needle to bring electrospray ionization.
Vaporizer temperature	High temperature of the APCI probe helps to vaporize the solvent and the analyte.
Corona discharge needle voltage	Corona discharge needle is placed near the vaporizer in APCI source and its potential produces corona discharge ion current to create reagent gas ions.
Accelerating voltage	Voltage applied to direct ions from the source into the analyzer.
Nozzle skimmer voltage/needle voltage/cone voltage/fragmentor voltage/declustering potential	It is the potential applied between nozzle and skimmer.
Tube lens voltage	Tube lens voltage is applied to focus ions towards the opening of skimmer.
Skimmer voltage	It assists in passing the ions, through the small hole inside the skimmer.
Ion funnel	A focusing device containing a series of ring electrodes where a combination of RF and DC voltages is applied. It improves ion transmission efficiency.
ISCID	Collision-induced dissociation within the source is termed as in-source Collision collision-induced dissociation (ISCID). It is influenced by various source parameters such as fragmentor voltage, ISCID energy, skimmer voltage, nozzle voltage, capillary voltage, orifice voltage, etc.
Collision energy	Kinetic energy applied between the ion and collision gas to bring fragmentation, is expressed in eV.

(D'après Narayanam *et al.*, 2014)

4.8.3. Choix du mode d'ionisation

L'ionisation dépend des paramètres physico-chimiques tels que le pK_a , le pH , la nature du solvant, le nombre de sites protonables et leur accessibilité, de même que de la différence d'affinité protonique entre le soluté et la phase éluante. Le ticagrelor comporte potentiellement 9 sites accepteurs d'hydrogène (Tableau 9), particulièrement les groupements fonctionnels amines basiques, susceptibles de s'ioniser en mode d'ionisation positive. Le mode d'ionisation négative a également été testé, mais ne donne pas de réponse suffisante, comparé au mode positif. Le mode d'ionisation positive est ainsi retenu pour l'étude du ticagrelor et de ses produits de dégradation.

4.8.4. Acquisition et analyse des datas

Comme illustré avec la figure 38, l'optimisation de la SM permet une bonne reconnaissance de l'ion moléculaire du ticagrelor ($[M+H]^+ = 523,1903$) avec une très bonne intensité de signal. Son adduit sodium est également visible à m/z 545,1711. Cela permet également de conforter le mode d'ionisation choisi (mode positive).

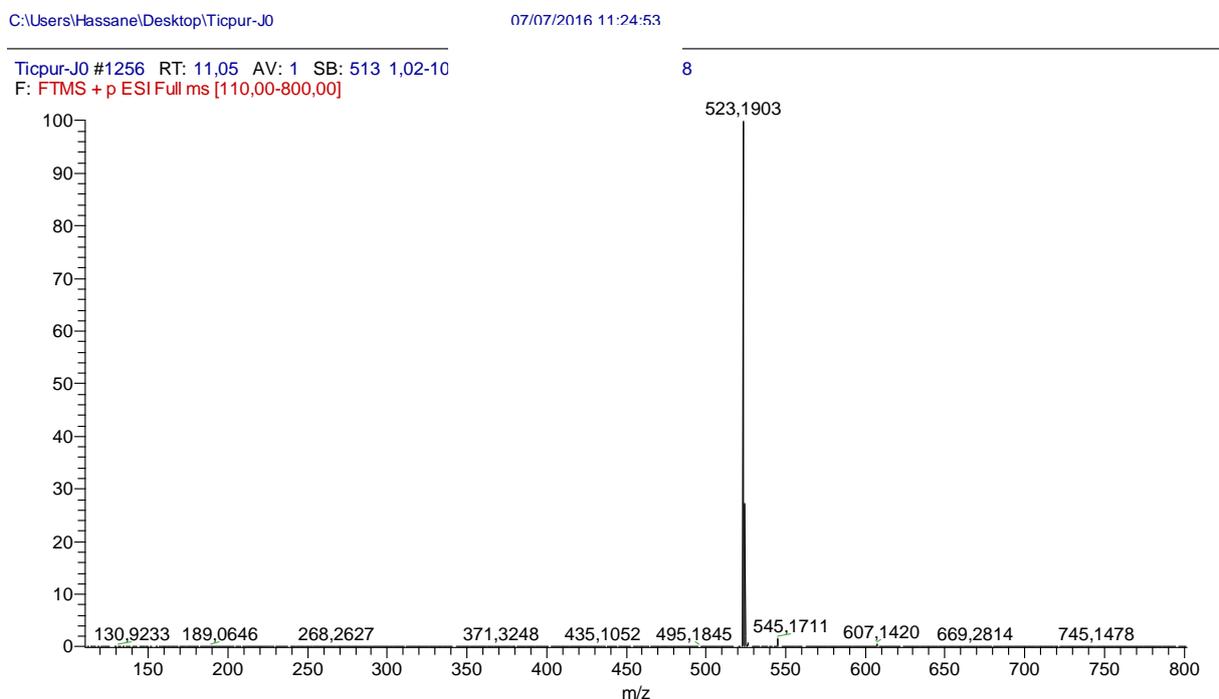


Figure 38 : Spectre Full MS du ticagrelor après l'optimisation de la méthode SM

4.9. Schéma de fragmentation du ticagrelor

Comprendre les principales voies de fragmentation du ticagrelor est identifié comme la meilleure façon d'aider à l'élucidation structurale de ses produits de dégradation.

4.9.1. Approche *in silico*, théorie des orbitales moléculaires

Les orbitales frontières HOMO (*highest occupied molecular orbital*) et LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) sont des orbitales moléculaires qui jouent un rôle important dans les mécanismes réactionnels. Les orbitales HOMO représentent la capacité de donner un électron et le LUMO, la capacité d'un accepteur à obtenir un électron.

La géométrie du ticagrelor a été optimisée de manière à réduire l'énergie et d'obtenir la forme la plus stable, puis les énergies des orbitales HOMO et LUMO ont été calculées par la méthode B3LYP/6-31G(d,p) en utilisant le logiciel Gaussian[®]. Comme le montre la [figure 39](#), les orbitales moléculaires les plus hautes en énergie occupées par des électrons π (HOMO-2 135, HOMO-1 136 et HOMO-0 137) montre une densité électronique autour des noyaux triazolopyrimidine et difluorophényl. Le noyau triazolopyrimidine concentre également l'intégralité de la densité des électrons π^* pour les deux premiers niveaux d'énergie LUMO (LUMO+0 138 et LUMO+1 139) [Zhong H *et al.*, 2017].

Il est prédictible que de nombreux mécanismes réactionnels puissent s'initier au niveau cette partie de la molécule d'excitation facile.

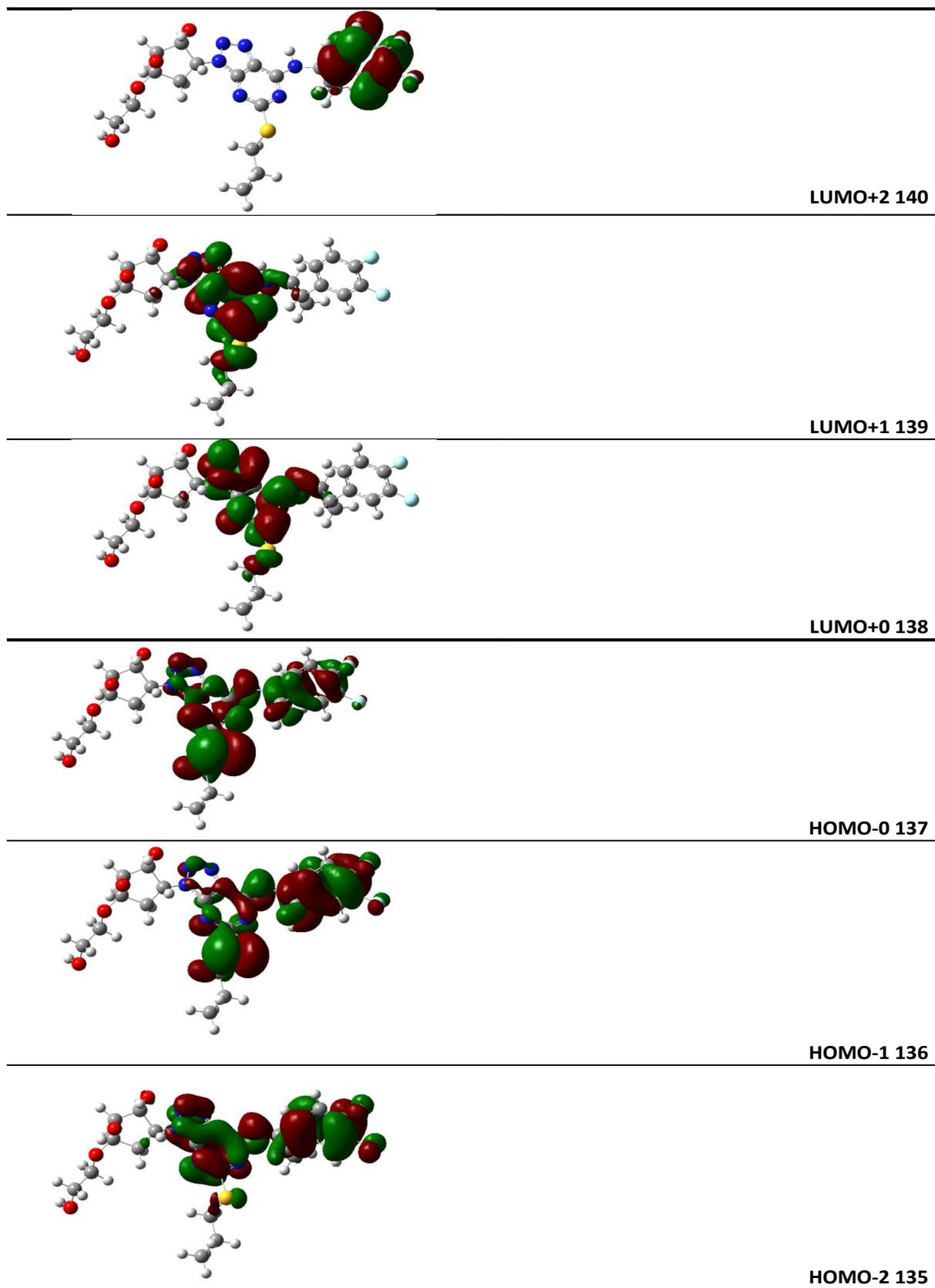


Figure 39 : Densité électronique des orbitales frontières HOMO et LUMO du ticagrelor (Données Gaussian®).

4.9.2. Infusion directe et analyse des données

Le ticagrelor est analysé par infusion directe en ionisation positive, générant l'ion moléculaire protoné, ainsi que de nombreux fragments se caractérisant par leurs masses exactes. Une analyse par spectrométrie de masse à plusieurs dimensions ou MSⁿ est effectuée sur chaque fragment. Ces données expérimentales servent aux calculs pour la détermination de la composition élémentaire (erreur en ppm) permettant d'obtenir la formule chimique la plus probable de chaque fragment. D'autres paramètres comme la règle de l'azote ou la détermination du RDB de chaque fragment aident dans cette analyse (Tableau 14).

Malgré la présence de plusieurs atomes d'azote dans la structure du ticagrelor, ses fragments montrent de valeurs de masse impaires. Cela implique, au regard de la règle de l'azote, soit des départs de groupements sans azote, soit un départ d'un nombre paire d'atomes d'azote (Tableau 14). Du fait de la présence de fonctions polarisables, la fragmentation implique des mécanismes de N-déalkylation, S-déalkylation tout comme de O-déalkylation. La N-déalkylation est très prononcée avec un clivage N – C direct de sorte que le carbocation difluorophenylcyclopropyl de m/z 153,0509 (C₉H₇F₂⁺) est détecté. Un mécanisme de réarrangement avec des pertes de neutres est également mis en évidence se traduisant par la transition 523,1976 (C₂₃H₂₉F₂N₆O₄S⁺) → 363,1195 (C₁₆H₁₇F₂N₆S⁺), 495,1867 (C₂₃H₂₉F₂N₄O₄S⁺) → 335,1134 (C₁₆H₁₇F₂N₄S⁺) et 453,1397 (C₂₀H₂₃F₂N₄O₄S⁺) → 293,0665 (C₁₃H₁₁F₂N₄S⁺). Il en résulte le départ de 3-hydroxyethoxy,2-hydroxycyclopentanone. De nombreux fragments peuvent s'expliquer par la perte de propylène par S-déalkylation. En plus de la perte de molécules d'eau due à la présence de fonctions alcools et la perte de glycérol par un mécanisme de O-déalkylation, le départ de N₂ du cycle 1H,2,3-triazolopyrimidine est également mis en évidence. Ils sont ainsi caractérisés par les transitions 523,1976 (C₂₃H₂₉F₂N₆O₄S⁺) → 495,1867 (C₂₃H₂₉F₂N₄O₄S⁺) et 481,1459 (C₂₀H₂₃F₂N₆O₄S⁺) → 453,1867 (C₂₀H₂₃F₂N₄O₄S⁺) (Figure 40).

4.10. Elucidation structurale des produits de dégradation

Grâce au couplage LC-HR-MSⁿ, les données des ions moléculaires puis de leurs fragments sont obtenues conformément à la stratégie de caractérisation définie plus haut (Tableau 15 ; Figure 37).

Tableau 15 : Temps de rétention, structures et données HR-MS des produits de dégradation et de leurs principaux ions fragments.

Produits de dégradation	Temps de Retention (min)	Structures proposées	ions Moléculaires m/z (amu)	Fragments ioniques m/z (amu)	Masses théoriques m/z (amu)	Erreur (ppm)
DP1	2,5	C ₁₄ H ₂₅ N ₄ O ₄ S ⁺	345,1591	345,1583	345,1596	-3,7
				303,1114	303,1121	-2,3
				285,1010	285,1016	-2,1
				267,0903	267,0910	-2,6
				205,0538	205,0542	-2,0
DP2	2,8	C ₂₀ H ₂₃ F ₂ N ₆ O ₅ ⁺	465,1698	465,1674	465,1698	-5,2
				437,1620	437,1637	-3,9
				419,1518	419,1531	-3,1
				357,1152	357,1163	-3,1
				305,0952	305,0962	-3,3
				277,0890	277,0901	-4,0
				234,0833	234,0837	-1,7
DP3	2,9	C ₁₄ H ₂₃ N ₆ O ₄ S ⁺	371,1502	371,1492	371,1502	-2,7
				343,1428	343,1400	-3,5
				301,0959	301,0971	-4,0
				283,0855	283,0865	-3,5
				263,0955	263,0967	-4,6
				183,0695	183,0704	-4,9
DP4	3,5	C ₂₃ H ₂₉ F ₂ N ₆ O ₅ S ⁺	539,1888	539,1873	539,1888	-2,9
				521,1767	521,1783	-3,1
				497,1407	497,1419	-2,4
				479,1302	479,1313	-2,3
				469,1345	469,1357	-2,6
				451,1241	451,1252	-2,4
				389,0876	389,0884	-2,1
				309,0613	309,0622	-2,9
DP5	4,2	C ₂₃ H ₂₉ F ₂ N ₆ O ₆ S ⁺	555,1837	555,1819	555,1837	-3,2
				537,1716	537,1732	-3,0
				527,1759	527,1776	-3,2
				511,1562	511,1575	-2,5
				509,1657	509,1670	-2,6
				493,1457	493,1470	-2,6
				475,1351	475,1364	-2,7
				447,1290	447,1302	-2,7
				421,1676	421,1687	-2,6
				395,1091	395,1102	-2,8
				367,1031	367,1040	-2,5
				261,0942	261,0952	-3,8
DP6	4,6	C ₂₃ H ₂₇ F ₂ N ₆ O ₅ S ⁺	537,1732	537,1716	537,1732	-3,0
				509,1652	509,1670	-3,5
				491,1548	491,1565	-3,5
				429,1182	429,1197	-3,5
				371,1490	371,1502	-3,2
				349,0924	349,0935	-3,2
				167,0299	167,0308	-5,4
DP7-DP8-DP9	5,6-6,1-7,4	C ₂₃ H ₂₉ F ₂ N ₆ O ₄ S ⁺	523,1939	523,1923	523,1939	-3,1
				371,1488	371,1502	-3,8

4.10.1. Caractérisation des photo-produits

L'exposition à la lumière du ticagrelor génère les 2/3 des produits de dégradation mis en évidence : DP1, DP3, DP6, DP7, DP8 et DP9 (Tableau 15).

- ✓ **DP1** de masse ionique m/z 345,1583, c'est le produit de dégradation le plus hydrophile du ticagrelor également obtenu en condition de thermolyse. Sa masse exacte est concordante avec la formule élémentaire $C_{14}H_{25}N_4O_4S^+$ (RDB = 4,5) qui reflète les pertes de 2 atomes d'azote et du groupement difluorophenylcyclopropyl comparé au ticagrelor. La MS^n de DP1 confirme que c'est un dérivé diaminopyridine (Figure 41).

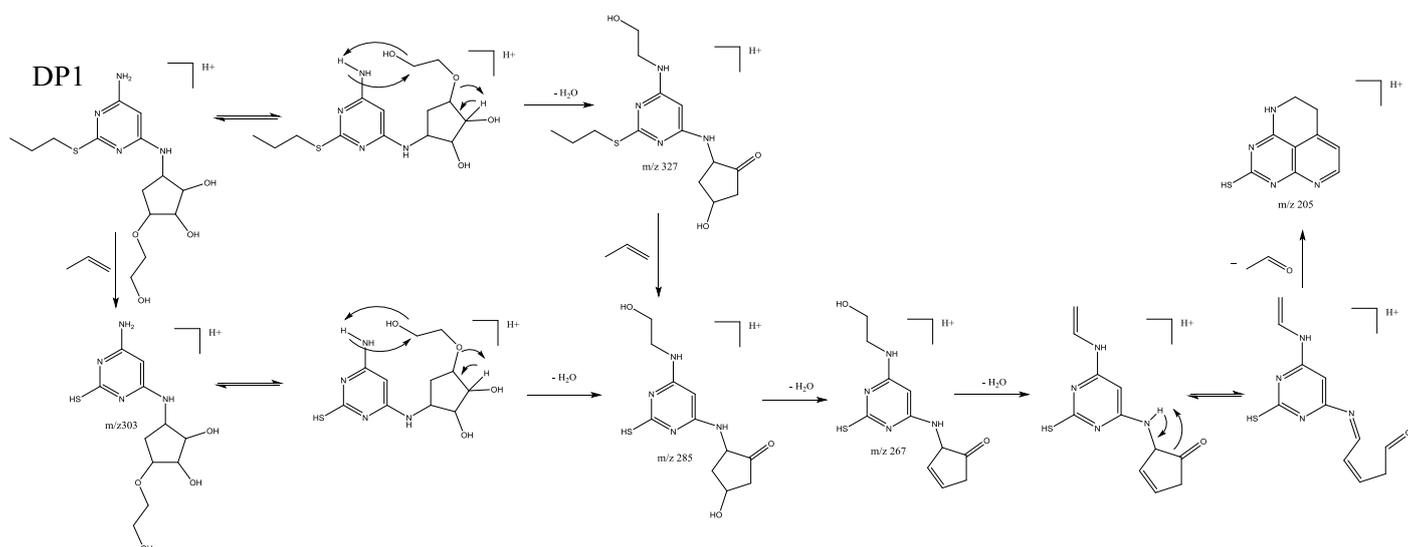


Figure 41 : Schéma de fragmentation ESI-MSⁿ proposé pour DP1

- ✓ **DP3** se forme facilement en présence de lumière et sous l'effet de la température. La masse exacte de l'ion protoné donne une valeur de m/z 371,1492, qui peut bien correspondre à la formule élémentaire $C_{14}H_{23}N_6O_4S^+$ (RDB = 6,5). Contrairement au ticagrelor, le carbocation 3,4-difluorophenylcyclopropyl (m/z 153) habituellement présent, est absent du spectre de masse de DP3, ce qui corrobore sa formule ionique.

DP6, DP7, DP8 et DP9 : ces produits de dégradation comportent tous dans leur profil de fragmentation la masse exacte correspondant à la composition élémentaire de DP3.

- ✓ **DP6** est fragmenté en DP3 par perte de $C_9H_4F_2O$ à travers la transition 537,1715 → 371,1490. Le clivage direct de la liaison N – C générant le carbocation 3,4-difluorophenylcyclopropanone (m/z 167,0308), qui dans ce cas est mis en évidence au lieu de son ion cyclopropyl (m/z 153), ce qui confirme le changement intervenu sur cette partie conduisant à la formation de DP6 et permet de localiser la fonction oxo (Figure 42, Tableau 15).

- ✓ **DP7**, **DP8** et **DP9** répondent à des valeurs de masses exactes mesurées (523,1923 à 523,1919) identiques à celle du ticagrelor. Par contre, la transition 523 → 371 observée pour DP7, DP8 et DP9 est absente pour le ticagrelor. Ainsi, l'hypothèse d'une recombinaison due aux conditions de stress est avancée, impliquant le déplacement du groupement difluorophenylcyclopropyl et sa liaison à un autre hétéroatome, formant un groupement plus polaire que la liaison N – C. Il est plausible de considérer la formation de fonctions étheroxyde à partir des fonctions hydroxyles de la molécule. Le camouflage d'une de ces fonctions polaires peut conduire à la formation d'un composé moins polaire que le ticagrelor, comme c'était le cas pour DP9 (Figure 42, Tableau 15).

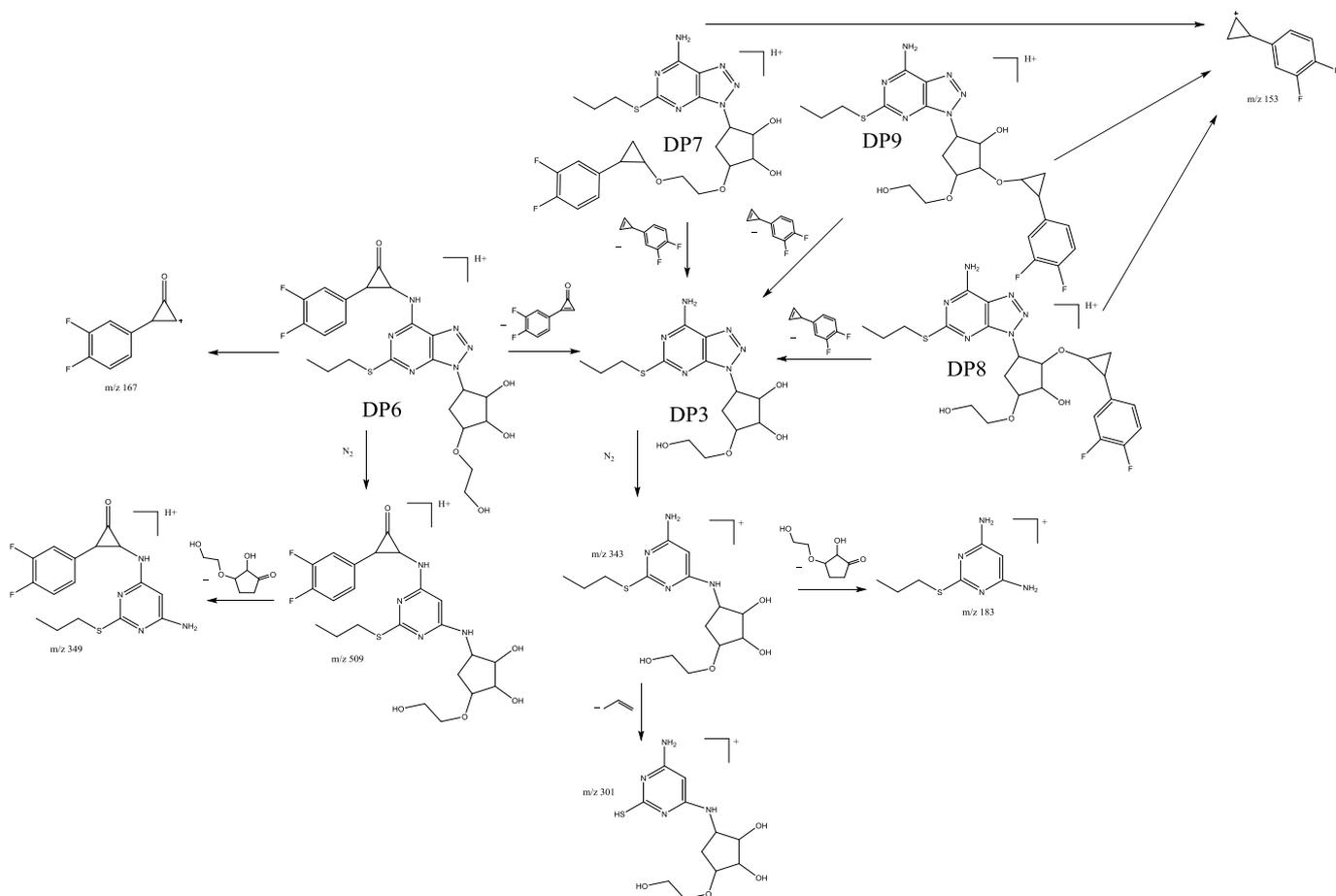


Figure 42 : Proposition du schéma de fragmentation ESI-MSⁿ pour les ions protonés des produits de dégradation DP3, DP6, DP7, DP8 et DP9.

4.10.2. Produits d'oxydation à l'H₂O₂

L'exposition au peroxyde d'hydrogène génère DP2, DP4 et DP5 (Tableau 15).

- ✓ **DP2** est l'un des produits de dégradation du ticagrelor les plus hydrophiles de par son court temps de rétention de 2,8 minutes. L'ion issu de sa protonation se caractérise par une masse exacte de 465,1698 Da, en concordance avec la formule chimique C₂₀H₂₃F₂N₆O₅⁺ (RDB = 11,5). Au lieu d'avoir une transition correspondant à une perte neutre de propylène par S-déalkylation, une perte de 43 Da correspondant à la transition 277,0890 → 234,0833, due au départ d'un groupement CHNO est mis en évidence, indiquant que DP2 est un dérivé oxo-triazolopyrimidine (Figure 43).

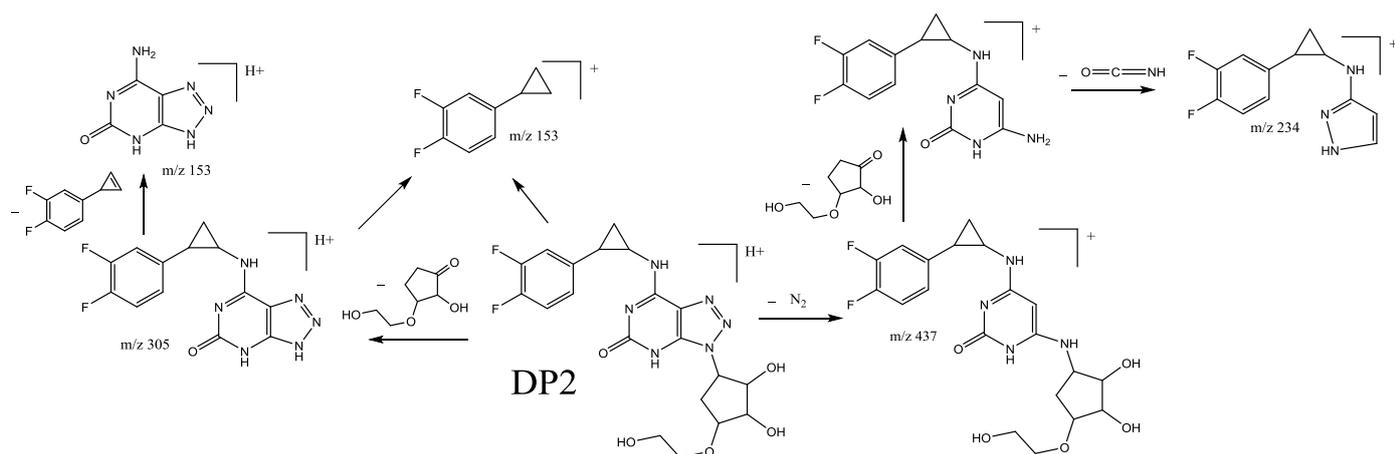


Figure 43 : Proposition du schéma de fragmentation ESI-MSⁿ pour DP2.

- ✓ **DP4** exhibe une masse exacte de 14 Da supérieure à celle du ticagrelor (539,1872 versus 523,1926). Comparée au ticagrelor, la formule élémentaire de DP4 comporte un oxygène supplémentaire qui pourrait correspondre à un dérivé hydroxylé formé en présence d'H₂O₂ (C₂₃H₂₉F₂N₆O₅⁺) (RDB = 11,5). L'étude de son profil de fragmentation montre que l'hydroxylation s'opère sur l'amine secondaire aromatique, conduisant à la formation d'un dérivé hydroxylamine, précédemment décrit dans la littérature comme étant un métabolite du ticagrelor (Fig. 44) [Sillen *et al.*, 2011].

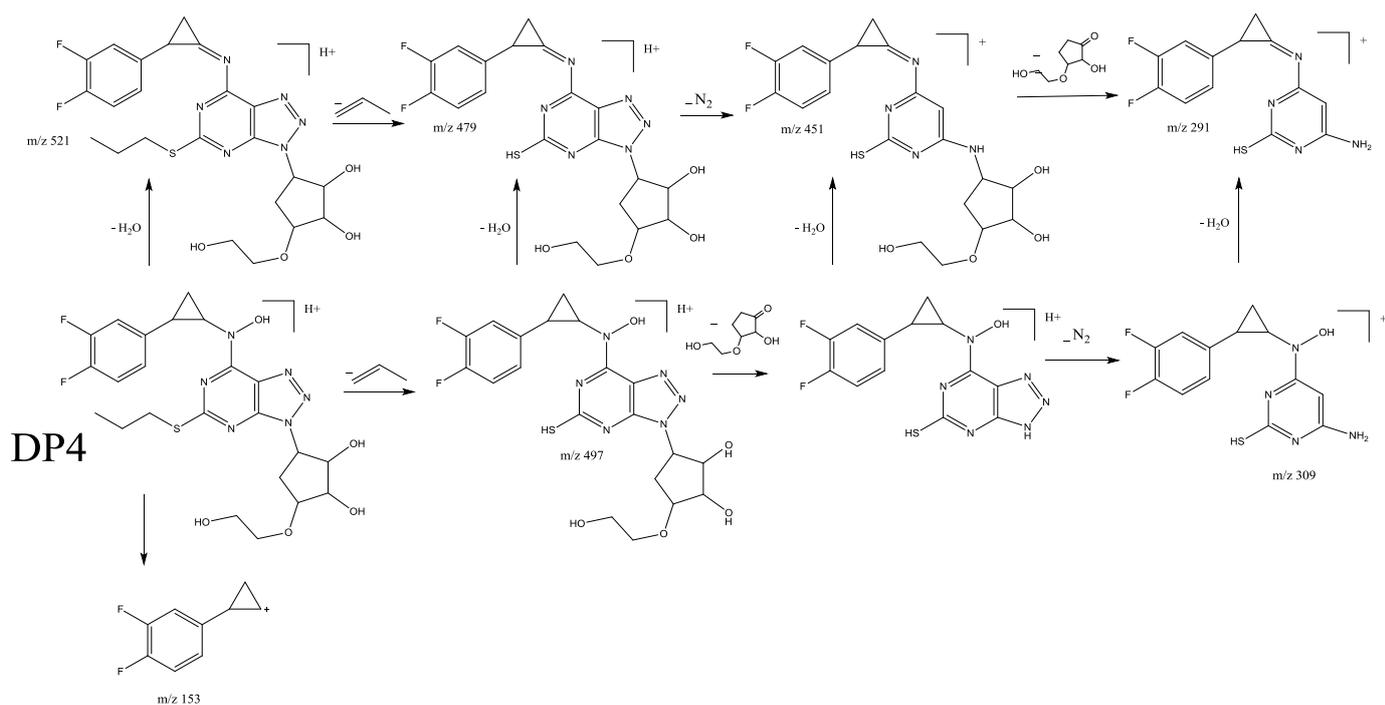


Figure 44 : Proposition du schéma de fragmentation ESI-MSⁿ pour DP4.

- ✓ **DP5**, de masse exacte m/z 555,1819 est concordant avec l'ajout de 2 atomes d'oxygène sur le ticagrelor. Son schéma de fragmentation est très similaire à celui du ticagrelor, hormis la présence d'une nouvelle transition jusqu'à présent non détectée. En effet la MS³ confirme la perte du fragment C₃H₆O₂S (transitions 527,1759 \rightarrow 421,1687 et 367,1037 \rightarrow 261,0420), laissant penser que DP5 est un dérivé phényl sulfone (Figure 45).

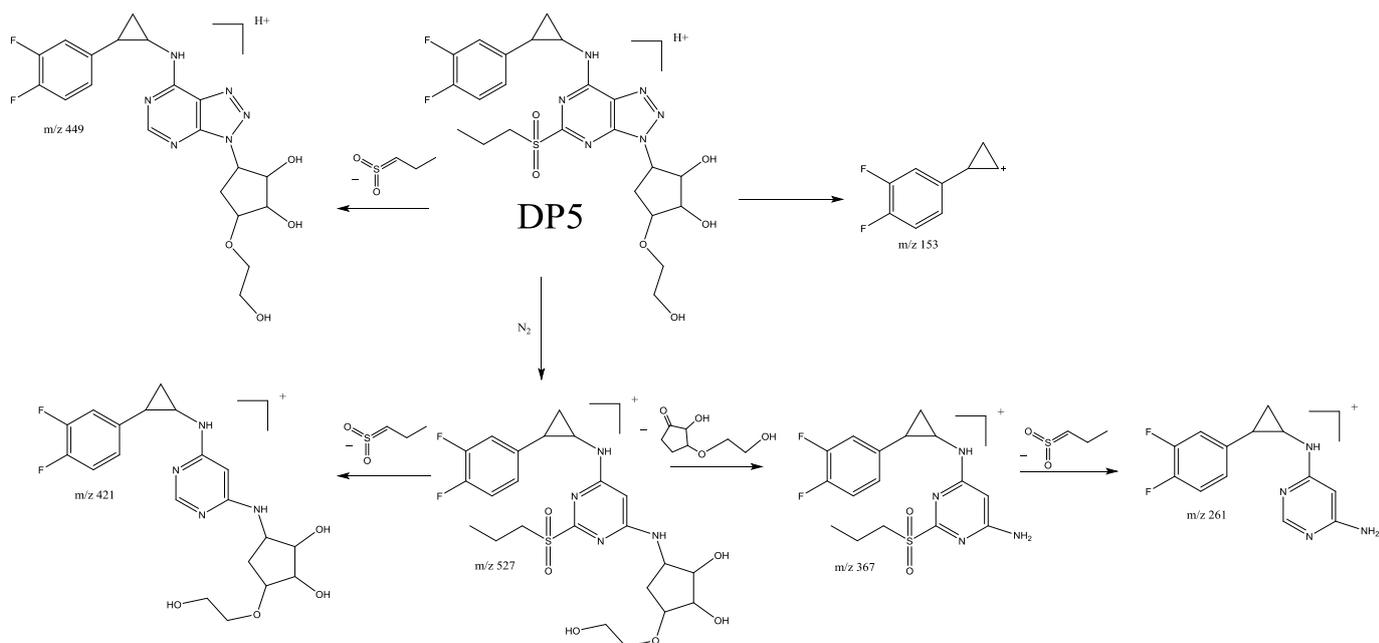


Figure 45 : Proposition du schéma de fragmentation ESI-MSⁿ pour DP5.

4.11. Proposition de schéma de dégradation du Ticagrelor

Soumis à diverses conditions de stress, le ticagrelor se dégrade selon diverses voies de dégradation engendrant 9 produits de dégradation (Tableau 15) caractérisés tous grâce à la LC – HR – MSⁿ. Dans l'ensemble, le ticagrelor est sensible aux conditions oxydatives fortes et à l'exposition aux photons. La dégradation par thermolyse reste marginale comparée aux deux conditions précédentes.

4.11.1. Voies de dégradation en conditions photo-catalytiques

Les réactions photo-catalytiques font appel à un certain nombre de réactions qui s'opèrent par initiation radicalaire mais aussi de nature moléculaire qui peuvent se traduire par des réactions nucléophiles.

En effet, au niveau moléculaire, le ticagrelor peut à un certain niveau d'excitation se dégrader par N-déalkylation générant DP3.

Le ticagrelor peut également subir une auto-oxydation par initiation radicalaire qui se traduit par l'abstraction de proton du carbone α lié à l'azote du phénylamine. La réaction avec l'O₂ prolonge la réaction radicalaire pour générer un radical peroxyde, puis un peroxyde par abstraction d'un proton du solvant (H₂O). A partir de là, DP3 se

forme par des mécanismes de recombinaison en présence d'H₂O, libérant d'autres composés comme l'illustre la figure 46 [Russel, 1957 ; Minisci *et al.*, 1998]. Ces derniers peuvent en retour interagir avec DP3 par attaque nucléophile, engendrant les produits de dégradation DP6, DP7, DP8 et DP9 après condensation. La structure très rigide du cycle triazolo pourrait expliquer la fragilité du ticagrelor en présence de lumière, conduisant à la formation de DP1 par départ de N₂. Cette réaction peut également s'expliquer par initiation radicalaire.

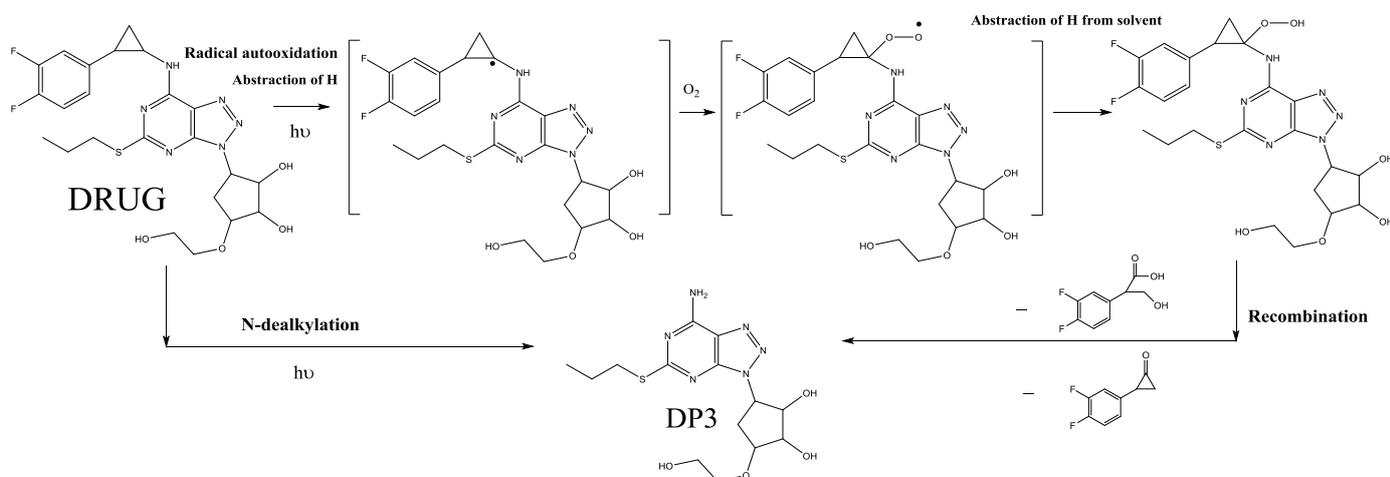


Figure 46 : Mécanismes conduisant à la formation de DP3 par auto-oxydation et N-déalkylation en présence de lumière

4.11.2. Voies de dégradation en conditions oxydatives

La dégradation du ticagrelor en présence d'H₂O₂ est due aux attaques sur l'amine et le sulfide engendrant une dérivée hydroxylamine (DP4) et un dérivé sulfone (DP5). Une attaque sur le carbone en position α du sulfide conduit à la formation d'un dérivé peroxyde, qui, par la suite après recombinaison en présence d'eau donne lieu à un intermédiaire 2-thiopyrimidine, puis à une oxo-pyrimidine (DP2) (Figure 47).

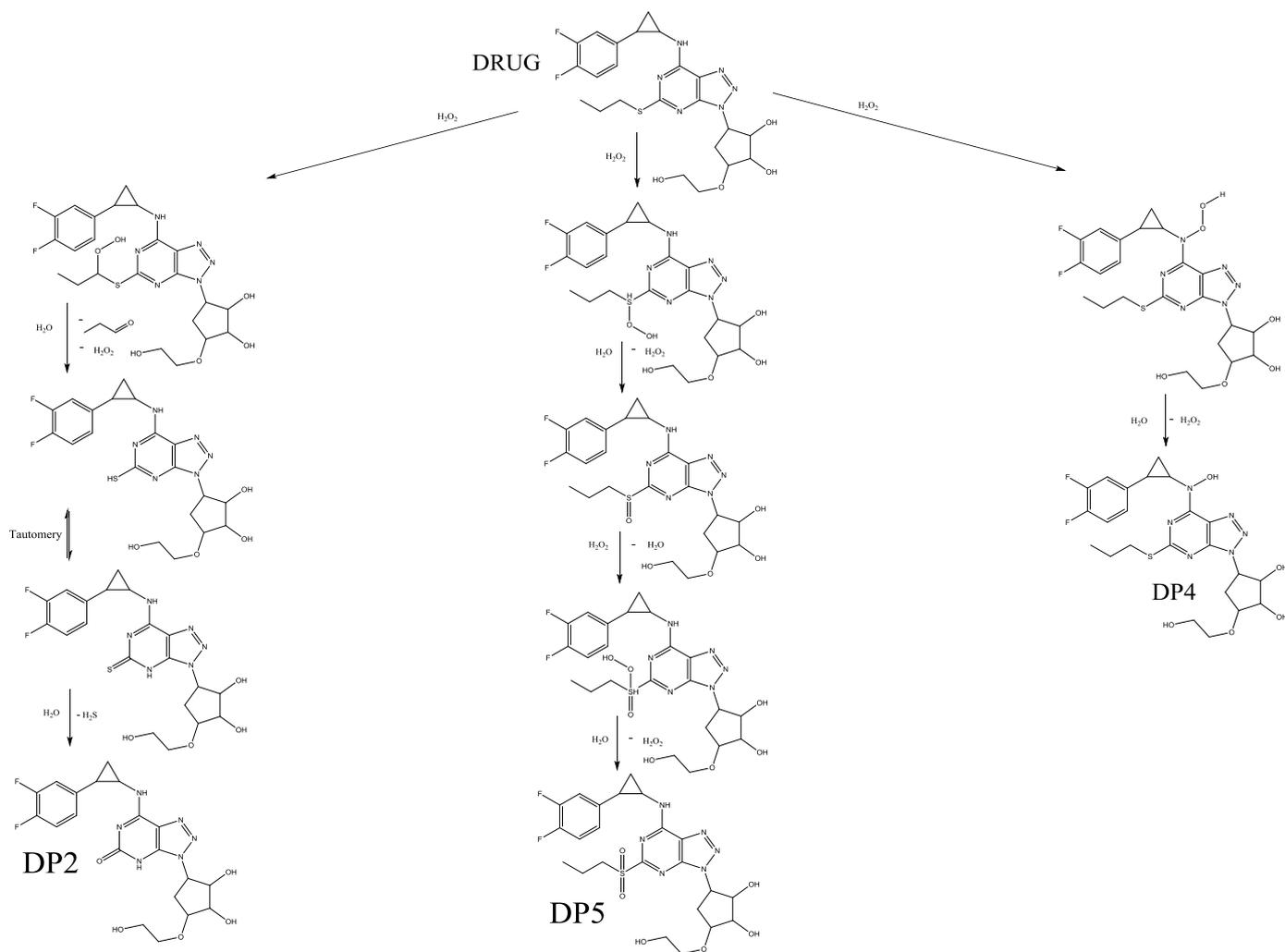


Figure 47 : Mécanismes conduisant à la formation de DP2, DP4 et DP5 en présence de peroxyde d'hydrogène.

II. Evaluation de la sécurité des produits néoformés

1. Contexte

Les effets indésirables médicamenteux constituent la principale cause des échecs de mise sur le marché des médicaments pendant les phases cliniques ou en post-AMM [Kola *et al.*, 2004]. Compte tenu des implications financières colossales que cela pourrait générer, une anticipation des caractéristiques du médicament se révèle stratégique pour l'industrie pharmaceutique. L'absence chez l'homme d'études de carcinogénicité, l'impact des effets de carcinogénicité sur le développement des médicaments en phases I et II et les pressions sur l'utilisation des animaux imposent d'avoir des méthodes alternatives [Bercu *et al.*, 2010]. Comme développées dans le

chapitre 1, II.1, les méthodes *in silico* ont été utilisées depuis des décennies à la recherche de nouveaux médicaments et pour prédire leur sécurité d'utilisation. L'application de ces méthodes pour prédire les paramètres pharmacocinétiques (ADME) et toxicologiques des médicaments a suscité un grand intérêt pour les autorités réglementaires, la communauté scientifique et les associations des consommateurs. Les méthodes *in silico* présentent les avantages de fournir un résultat de modélisation précoce sur la sécurité du médicament en se basant seulement sur la structure virtuelle de la molécule. De même, elles sont très accessibles et permettent d'évaluer un grand nombre de molécules, comparées aux méthodes classiques d'études chez les animaux ou *in vitro* qui nécessitent obligatoirement une synthèse des principes actifs et demandent beaucoup de temps et de moyens. En Europe, l'ambitieuse législation REACH (Registration, Evaluation, Authorization, and restriction of Chemicals) pour la régulation des mises sur le marché des produits chimiques (pesticides, colorants, médicaments, conservateurs et des vernis) voit le jour en 2006 et impose aux industriels de fournir non seulement l'usage auquel est destiné le produit chimique, mais aussi des données sur le risque intrinsèque de la substance, ses données physico-chimiques, des informations sur son devenir dans l'environnement, sa toxicité environnementale et des informations toxicologiques sur l'innocuité pour l'homme (Annexe 3) [EU, 2006 ; Penman *et al.*, 2015]. REACH encourage l'utilisation de méthodes alternatives d'évaluation de la toxicité comme les méthodes *in silico* [EU, 2006]. L'EMA introduit en 2013 l'évaluation de la génotoxicité des impuretés dans les spécialités pharmaceutiques et préconise l'emploi des 2 logiciels *in silico* d'études. En 2014, dans le cadre de l'harmonisation internationale (ICH M7), l'évaluation de la toxicité, notamment les notions de mutagénicité, de carcinogénicité des produits a été traitée, avec une place centrale pour l'approche *in silico* [ICH M7, 2014]. Pour les études de génotoxicité, l'ICH M7 préconise l'utilisation de deux logiciels *in silico* complémentaires dont un basé sur les systèmes experts et l'autre sur les statistiques.

Pour les produits de dégradation, il est intéressant de les évaluer, surtout pour les médicaments utilisés au long court comme le ticagrelor.

2. Méthodes *in silico* d'évaluation de la toxicité

2.1. Définition

Les méthodes de prédiction *in silico* sont des logiciels scientifiques qui font appel aux méthodes modernes de calculs informatiques améliorant la connaissance sur la toxicité du médicament et de ses impuretés. Ces méthodes ont pour fondement des bases de données toxicologiques issues de l'expérimentation et utilisent des algorithmes pour relier les données mathématiques, chimiques et biologiques. De puissants ordinateurs servent de relai aux informations issues de divers modèles, de bases de données ou de simulations.

Extrapoler le niveau des connaissances expérimentales toxicologiques aux nouveaux composés à partir des logiciels (APIs ou impuretés diverses) pose le problème de fiabilité des bases de données.

2.2. Bases de données et logiciels QSAR

Les bases de données constituent une structuration des informations toxicologiques, avec un accès électronique. De nombreuses bases de données sont ouvertes au public [Valerio, 2008 ; Toropov *et al.*, 2014], beaucoup d'autres relèvent du privé. Pour la fiabilité d'utilisation des données, une standardisation entre la réglementation, l'académique et l'industrie pharmaceutique s'avère nécessaire. Le [tableau 16](#) illustre les règles basiques de classification des substances chimiques dans les bases de données [Dobo *et al.*, 2012]. Ces bases doivent être actualisées au regard des connaissances scientifiques, surtout pour les nouveaux médicaments.

Une compréhension de l'espace de connaissances des structures chimiques (nombre d'accepteurs et donneurs d'hydrogènes, nombre d'halogènes, le nombre de cycles, les structures dans l'espace, etc.) [Hong *et al.*, 2008] est primordiale pour la construction de modèles informatiques reliant la structure à l'activité. La figure 48 illustre les relations entre les bases de données et les programmes informatiques QSAR dans la conception des modèles. De nombreux logiciels sont actuellement disponibles (privé et public) utilisant de nombreux critères d'évaluation (mutagénicité, cardiotoxicité, carcinogénicité, toxicité aigüe, etc.). Une évaluation de performance de ces logiciels surtout avec des validations externes (composés non utilisés pour le modèle) est nécessaire.

Tableau 16 : Classification des impuretés des médicaments

Classe 1	Connue pour être à la fois mutagène et cancérigène
Classe 2	Connue pour être mutagène, mais de cancérogénicité potentielle inconnue
Classe 3	Composé avec une alerte structurale, sans rapport avec l'API et avec une mutagénicité potentielle inconnue
Classe 4	Composé avec une alerte structurale liée à l'API
Classe 5	Absence d'alerte structurale ou données suffisantes sur l'absence de mutagénicité

(Modifié d'après Dobo *et al.*, 2012).

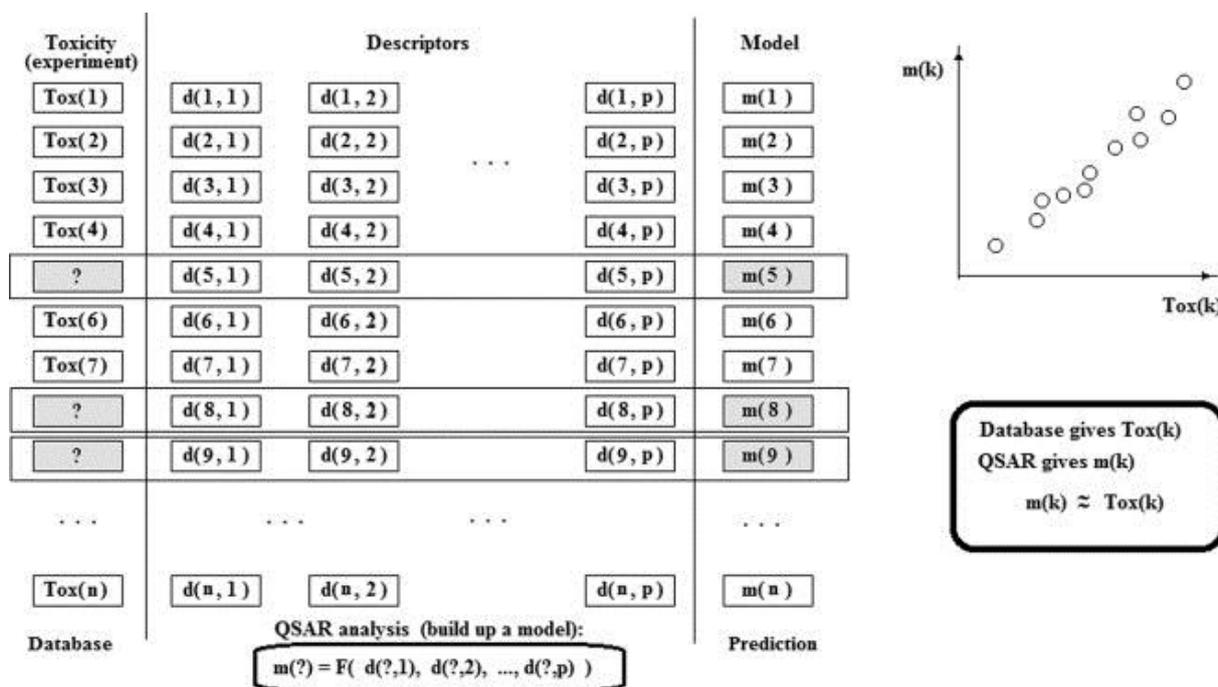


Figure 48 : Représentation graphique des informations issues a) des bases de données et b) des analyses QSAR

(D'après Toropov *et al.*, 2014).

3. Profils toxicologiques des produits de dégradation du ticagrelor

Afin d'augmenter la sensibilité des résultats, une combinaison de plusieurs modèles est réalisée, comme l'a préconisé l'EMA pour les études de génotoxicité des

impuretés des médicaments [EMA, 2004]. Après l'élucidation structurale et l'évaluation de la stabilité intrinsèque, la toxicité des produits de dégradation a été évaluée par une approche *in silico*. Deux logiciels d'études de la toxicité assistées par ordinateur QSAR ont été utilisés. Il s'agit de deux programmes (expert systems) qui codifient une série de règles identifiées par des experts dans leurs champs d'intérêts comme par exemple des modélisations à partir de fragments de toxicités connues (alertes structurales) [Roncaglioni *et al.*, 2013]. La première est QSAR Toolbox® version 4.1 [OECD QSAR Toolbox, 2017], dans le but de prédire la carcinogénicité et la mutagenicité *in vitro* et *in vivo* [Mortelmans *et al.*, 2000 ; Kirsh-Volders *et al.*, 1997 ; Aptula *et al.*, 2006 ; Benigni *et al.*, 2011]. En outre, les seuils de toxicité des produits de dégradation basés sur la classification de Cramer [Kroes *et al.*, 2004] et la réactivité électrophile avec l'ADN et les protéines ont également été évalués. Le second logiciel TEST® (Toxicity Estimation Software Tool, version 4.2) est utilisé pour l'évaluation des toxicités potentielles sur le développement et les propriétés de mutagénicité via le test d'Ames [Sushko *et al.*, 2010 ; U.S. EPA, 2016].

La toxicité potentielle des DPs identifiés est évaluée et comparée à celle du ticagrelor grâce aux outils de modélisation basés sur les relations quantitatives structure-activités (QSAR). Comme décrit avec le [tableau 17](#), le système n'a identifié aucun risque de toxicité de type mutagenicité, carcinogénicité ou de développement pour le ticagrelor et pour DP4 au regard des bases de données utilisées par ces logiciels. Cependant DP1, DP7 et DP8-9 peuvent potentiellement avoir des propriétés de mutagenicité et de carcinogénicité selon QSAR Toolbox. Ces produits issus des processus de N-dealkylation peuvent être sujets à des réactions impliquant l'amine primaire. En effet, les amines aromatiques hétérocycliques sont connues pour jouer un rôle dans le processus d'activation métabolique par le biais du Cytochrome P450, générant des métabolites mutagènes et carcinogènes [Turesky *et al.*, 1998 ; Benigni *et al.*, 2000 ; Gerald *et al.*, 2004 ; Nauwelaers *et al.*, 2011].

TEST a associé des risques de toxicité de développement à DP2 et à DP4. Depuis l'affaire de la thalidomide, les effets liés au développement sont la priorité des industriels. La tératogénicité est liée au passage des produits à travers la barrière placentaire. Les données de modélisation de la barrière placentaire restent encore insuffisantes et doivent être prises en compte dans cette prédiction [DeSesso, 2017]. DP2 et DP4 étant des produits d'oxydation du ticagrelor, la directive ICH M7 [ICH

M7, 2014] ne prévoit que des études des produits issus des conditions de conservation à long terme, des études de stabilité en accéléré et de photolyse. Compte tenu des résultats des prédictions de DP2 et DP4, les informations de sécurité sur les produits générés en conditions de stress doivent être également connues et s'inscrire dans une démarche de gestion des risques.

Sur la base des règles de Cramer [Cramer *et al.*, 1978], QSAR Toolbox considère le ticagrelor et ses produits de dégradation comme appartenant potentiellement à la classe III, qui peut englober à la fois des produits connus ou peu sûrs.

L'utilisation de deux logiciels *in silico* complémentaires tel que recommandée par l'ICH M7 augmente la sensibilité des prédictions au détriment de la spécificité. Cela ne doit pas constituer un frein à la mise sur le marché de nouveaux médicaments innovants [Wichard, 2016]. Les résultats des logiciels doivent être confortés par des avis d'experts surtout en cas de contradiction entre logiciels [Barber *et al.*, 2015]. Une connaissance des principes de fonctionnement des logiciels peut donner accès à des arbres de décision qui facilitent les résultats des prédictions (Annexe 4) [Wichard, 2016].

4. Limites des études *in silico* et perspectives

La toxicité des médicaments est complexe, implique souvent de nombreux mécanismes tels que les variabilités interindividuelles, les paramètres pharmacocinétiques (fonction rénale, hépatique, etc.), l'âge, le sexe, la dose et la durée du traitement, etc., ce qui rend difficile l'extrapolation immédiate entre les données chez l'homme et la simulation *in silico*. L'accessibilité aux données constitue le principal frein aux méthodes de prédiction *in silico*. Les bases de données utilisées pour les modèles *in silico* sont infimes comparées aux bibliothèques de développement des médicaments de l'industrie pharmaceutique. D'où la nécessité d'un partenariat de partage d'informations entre l'industrie pharmaceutique, la recherche académique et la réglementation. De même, une standardisation du vocabulaire notamment des critères d'évaluation doit s'inscrire dans les voies d'amélioration de cette approche [Hardy *et al.*, 2012].

Tableau 17 : Evaluation toxicologique *in silico* du ticagrelor et de ses produits de dégradation

Denomination (m/z)	Threshold of Toxicological Concern	QSAR Toolbox dataset outcome				TEST dataset outcome	
		Carcinogenicity/Mutagenicity	DNA Binding	Protein Binding	Ames mutagenicity	Developmental Toxicity	Ames Mutagenicity
Ticagrelor (523)	High (Class III)	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative	Negative
DP1	High (Class III)	Positive	Negative	Negative	Positive	Negative	Positive
DP2	High (Class III)	Negative	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
DP3	High (Class III)	Positive	Positive	Negative	Positive	Negative	Negative
DP4	High (Class III)	Negative	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative
DP5	High (Class III)	Negative	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive
DP6	High (Class III)	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
DP7	High (Class III)	Positive	Negative	Negative	Positive	Negative	Positive
DP8-9	High (Class III)	Positive	Negative	Negative	Positive	Negative	Positive

III. Elucidation structurale : Outil qualité de prédiction de contrefaçon des médicaments

La connaissance de la structure des produits de dégradation du ticagrelor alimente l'espace de connaissances du produit et pourra être utilisée pour améliorer l'efficacité et la sécurité d'emploi du médicament. Cet espace peut être utilisé comme outil de prédiction des défauts qualité notamment les contrefaçons.

Dans ce cadre, il est connu que les produits chimiques utilisés sont généralement issus du marché légal, à cela s'ajoutent le coût et la difficulté de contrôle des fournisseurs des matières premières pharmaceutiques et surtout les difficultés de détection des contrefaçons compte tenu des moyens techniques sophistiqués que cela requiert.

L'étude du ticagrelor, du développement d'une SIM à la description de ses voies de dégradation peut être utilisée comme modèle de prédiction des malfaçons. Comme illustré avec la [figure 27](#), le ticagrelor est obtenu par synthèse chimique totale qui requiert une protection des fonctions alcools ([Annexe 2](#)). Un non-respect des paramètres de procédés critiques (CPPs) lors de cette synthèse pourra impacter les attributs matières (CMAs) et se traduire par des défauts qualité, transposables également aux situations de contrefaçon.

Un défaut de protection de ces fonctions, peut conduire aux produits de dégradation DP7, 8 et 9 qui malgré qu'ils aient la même masse molaire que le ticagrelor, s'en distinguent par des propriétés physico-chimiques différentes (Tableau 18) qui impactent les propriétés pharmacocinétiques (LogP, PSA, etc.) se caractérisant par une réduction de la stabilité métabolique. De même, les propriétés pharmacodynamiques se trouvent également modifiées. La N-déalkylation entraîne une réduction d'un facteur 10 de l'affinité ligand – récepteur et d'une perte d'activité d'inhibition plaquettaire, notamment avec le DP8 et le DP9 [Springthorpe *et al.*, 2007].

Tableau 18 : Propriétés physico-chimiques du ticagrelor et de ses isomères (DP7, DP8 et DP9) (Source ChemAxon).

	MM	PSA (Å ²)	LogP	LogD pH 1,5 - 5	LogD pH 7,4 - 9	HLB	Polarizability	Hd	Ha	Ht
Ticagrelor	523	138,44	1,85	1,44 – 1,85	1,85	7,58	49,54	4	9	13
DP7	523	141,43	2,07	1,52 – 2,07	2,07	7,43	49,61	3	9	12
DP8	523	141,43	2,07	1,52 – 2,07	2,07	7,41	49,61	3	9	12
DP9	523	141,43	2,07	1,52 – 2,07	2,07	7,41	49,61	3	9	12

Hd : Sites donneurs d'hydrogène ; Ha : Sites accepteurs d'hydrogène ; Ht : Sites totaux d'hydrogène ;
PSA : Polar surface area

IV. Conclusion – Discussions

L'étude de la stabilité intrinsèque du ticagrelor fournit de solides informations qui alimenteront l'espace de connaissances du médicament. La stratégie d'élucidation structurale des produits de dégradation répond à une démarche scientifique qui comporte plusieurs étapes interdépendantes. Le développement et l'optimisation d'une méthode LC indicatrice de stabilité ont permis d'analyser et d'identifier le ticagrelor et ses produits de dégradation générés dans les différentes conditions de stress sans aucune interférence. Dans cet exercice, l'approche QbD telle que préconisé par l'ICH Q8 aide à mieux comprendre les variables de la méthode, et à

définir des paramètres robustes permettant d'accéder à de bonnes résolutions des séparations.

Le ticagrelor est très sensible aux conditions d'oxydation et de photolyse, engendrant la totalité des produits de dégradation observés. Le couplage LC-HR-MSⁿ a permis la caractérisation structurale de 9 produits de dégradation et par conséquent de proposer un schéma de dégradation au regard des conditions de stress étudiées. Cette étude est à la lumière des récentes recommandations de l'OMS qui préconise l'élargissement du domaine de connaissances avec des données scientifiques établies, permettant de supporter l'identification des produits de dégradation des médicaments et de décrire leurs voies de dégradation [WHO, 2009]. Les directives européennes de l'EMA vont encore plus loin en préconisant l'évaluation de la toxicité potentielle des produits néoformés. Le ticagrelor, du fait de la N-déalkylation, génère des amines aromatiques dont l'évaluation toxicologique *in silico* prédit des risques potentiels pour l'homme. La connaissance de ces voies de dégradation permet de mettre en place des mesures appropriées pour la santé en anticipant la dégradation du médicament. De même, les connaissances structurales des produits de dégradation et des voies de dégradation peuvent être utilisées à très grande échelle comme outil d'anticipation et d'analyse de risque dans la lutte contre la contrefaçon des médicaments, comme démontré avec les produits de dégradation (DP7, DP8 et DP9), isomères du ticagrelor.

Article 2 : Identification of the major degradation pathways of ticagrelor

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Volume 105, 25 February 2015, Pages 74-83

Hassane Sadou Yayé, Philippe Henri Secrétan, Théo Henriet, Mélisande Bernard, Fatma Amrani, Wiem Akrouf, Patrick Tilleul, Najet Yagoubi, Bernard Do.



Identification of the major degradation pathways of ticagrelor



Hassane Sadou Yaye^{a,b,*}, Philippe-Henri Secrétan^{a,1}, Théo Henriet^a,
Mélisande Bernard^{a,c}, Fatma Amrani^c, Wiem Akrouf^c, Patrick Tilleul^b,
Najet Yagoubi^a, Bernard Do^{a,c}

^a Université Paris Sud, UFR de Pharmacie, UA 401 « Matériaux et Santé », 5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

^b Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Pharmacie 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

^c Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Agence Générale des Equipements et Produits de Santé, Département de Contrôle Qualité et Développement Analytique, 7 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2014

Received in revised form

24 November 2014

Accepted 26 November 2014

Available online 4 December 2014

Keywords:

Ticagrelor

LC stability-indicating assay method

Degradation kinetic

Electrospray orbitrap mass spectrometry

Degradation pathways

ABSTRACT

Ticagrelor is a direct-acting and reversible P2Y₁₂-adenosine diphosphate (ADP) receptor blocker used as antiplatelet drug. Forced degradation under various stress conditions was carried out. The degradation products have been detected and identified by high-pressure liquid chromatography multistage mass spectrometry (LC-MSⁿ) along with high-resolution mass spectrometry. C₁₈ XTerra MS column combined with a linear gradient mobile phase composed of a mixture of 10 mM acetate ammonium/acetonitrile was shown suitable for drug and impurity determinations and validated as a stability indicating method. Structural elucidation of the degradation products relied on MSⁿ studies and accurate mass measurements giving access to elemental compositions. Up to nine degradation products resulting from oxidation/auto-oxidation, S-dealkylation and N-dealkylation have been identified, covering a range of possible degradation pathways for derivatives with such functional groups. Kinetics was also studied in order to assess the molecule's shelf-life and to identify the most important degradation factors.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ticagrelor, (1S,2S)-3-[7-[[[(1R,2S)-2-(3,4-difluorophényl)cyclopropyl]amino]-5-propylsulfanyl]triazolo[4,5-d]pyrimidin-3-yl]-5-(2-hydroxyéthoxy)cyclopentane-1,2-diol is a new antiplatelet agent, the first reversible P2Y₁₂-adenosine diphosphate (ADP) receptor blocker indicated in the treatment of acute coronary syndromes (ACS) [1,2]. Until recently, clopidogrel was the key P2Y₁₂ antagonist advocated, but recent large-scale randomized trials have demonstrated net clinical benefit of the new antiplatelet agents (ticagrelor and prasugrel) with respect to clopidogrel [2,3]. Therefore, the European guidelines recommend ticagrelor and prasugrel as first-line treatment in patients presenting with non-ST segment

elevation ACS and ST-segment elevation ACS [4,5]. Ticagrelor provides fast, great and more consistent ADP-receptor inhibition.

Even properly designed, marketed drugs undergo environmental stresses, which may result in a loss of activity and cause adverse effects owing to the advent of degradation products. One of the best ways to apprehend the phenomenon and to anticipate risks is to get access to degradation pathways in order to determine intrinsic stability of drugs, according to ICH recommendations [6]. LC-MSⁿ in conjunction with accurate mass measurements has been increasingly used for structural characterization of degradation products [7]. The literature shows scant information on stability and degradation behaviour of ticagrelor. Its metabolites have been described in plasma using hyphenated LC-MS [8,9]. An LC stability indicating method was developed to determine ticagrelor in presence of its degradation products, but structural elucidation was not described [10].

The pharmaceutical importance of ticagrelor as an antiplatelet drug has prompted us to carry out a characterization study of its degradation products generated under harsh conditions, by using LC-MSⁿ along with high-resolution MS. A stability indicating method intended to drug quantification and impurity determination was also developed and validated. Kinetics was

* Corresponding author at: Université Paris Sud, UFR de Pharmacie, 5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France. Tel.: +33 622206246; fax: +33 142178261.

E-mail addresses: hassane.sadou-yaye@psl.aphp.fr, syhassane@yahoo.fr (H. Sadou Yaye).

¹ Both authors contributed equally to this study and are therefore considered as first authors.

Communication Orale : Determination of Ticagrelor chemical stability and characterization of its degradants

5th International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems,
March 16-18, 2015 Crowne Plaza, Dubai, UAE

Hassane Sadou Yayé et al., 2015.



Hassane Sadou Yaye et al., Pharm Anal Acta 2015, 6:1
<http://dx.doi.org/10.4172/2153-2435.S1.024>

5th International Conference and Exhibition on

Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems

March 16-18, 2015 Crowne Plaza, Dubai, UAE

Determination of Ticagrelor chemical stability and characterization of its degradants

Hassane Sadou Yaye, Philippe-Henri Secretan, Theo Henriet, Melisande Bernard, Fatma, Amrani, Wiem Akrouf, Patrick Tilleul, Nojjet Yagoubi and Bernard D University Paris Sud, France

Ticagrelor is a direct-acting and reversible P2Y₁₂-adenosine diphosphate (ADP) receptor blocker used as antiplatelet drug. The drug was subjected to force degradation studies under several stress media. The degradation products generated have been detected and identified by high-pressure liquid chromatography multistage mass spectrometry (LC-MSⁿ) along with high-resolution mass spectrometry. C18 XTerra MS column combined with a linear gradient mobile phase composed of a mixture of 10 mM acetate ammonium/ acetonitrile was shown suitable for drug and impurity determinations and validated as a stability indicating method. Structural elucidation of the degradation products relied on MSⁿ studies and accurate mass measurements giving access to elemental compositions. Up to nine degradation products resulting from oxidation/ autooxidation, S-dealkylation and N-dealkylation have been identified, covering a range of possible degradation pathways for derivatives with such functional groups. Kinetics was also studied in order to assess the molecule's shelf-life and to identify the most important degradation factors. Eventually, an *in silico* toxicological study was undertaken starting from the structure of the degradation products in order to know any potential risk resulting from drug degradation.

Biography

Hassane Sadou Yaye completed his Pharma D and, he is head of the laboratory of quality control of pharmaceuticals in the department of Pharmacy (Pitié-Salpêtrière hospital - Paris); and PhD student (University Paris Sud). His research focuses on APIs intrinsic stability studies which include the structure elucidation and the main routes of their degradation.

hassane.sadou-yaye@psl.aphp.fr

Chapitre 4 : Espace de connaissance (Knowledge Space) : Source d'opportunités – Etudes de pré-formulation Ticagrelor – Aspirine à l'état solide

"L'imagination est plus importante que la connaissance. La connaissance est limitée. L'imagination encercle le monde" Albert Einstein

Chapitre 4 : Espace de connaissance (Knowledge Space) : Source d'opportunités – Etudes de pré-formulation Ticagrelor – Aspirine à l'état solide

I. Introduction – contexte de l'étude

Le syndrome coronarien aigu (SCA) constitue une des maladies cardiovasculaires pouvant mettre en péril la vie. Une double anti-agrégation plaquettaire, composée d'aspirine et d'un antagoniste des récepteurs P₂Y₁₂ comme le ticagrelor, constitue le traitement de référence. L'objectif des stratégies pharmaceutiques innovantes est de développer des thérapies facilitant l'accès aux médicaments, réduisant les effets secondaires ou améliorant l'adhésion des patients aux traitements. La non-observance aux traitements a des causes multiples comme la chronicité des pathologies, la complexité des traitements (polymédication, nombre de prises journalières, la durée (maladies chroniques), le coût, la tolérance), etc. Pour augmenter les chances de succès thérapeutique, il convient d'agir entre autres sur le traitement en le simplifiant par le recours à des posologies d'administration simples à suivre pour le patient à travers des molécules à longue durée d'action ou à des formes retard, autorisant une seule prise par jour, ou encore à des combinaisons fixes, limitant le nombre de préparations pharmaceutiques quotidiennes [Scheen *et al.*, 2010]. Dans le cadre du traitement du syndrome coronarien aigu, la faisabilité d'une étude de préformulation pour une combinaison fixe de ticagrelor et d'aspirine a été entreprise. Le problème de stabilité est l'un des principaux attributs qualités critiques des médicaments dont dépendent les conditions de fabrication du produit.

Ainsi, la combinaison des principes actifs introduit le problème des interactions possibles entre eux. Cela peut avoir une influence sur leur biodisponibilité, rendre la formulation inactive, voire toxique. Les problèmes des interactions médicamenteuses ont été largement décrits dans la littérature [Almond *et al.*, 1974 ; Buckley *et al.*, 1993 ; Tischinger-Wagner *et al.*, 1987 ; Horiuchi *et al.*, 1997 ; Rajewski *et al.*, 1997].

Les instabilités chimiques dues aux interactions peuvent se traduire par des phénomènes d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse [Almond *et al.*, 1974 ;

Tischinger-Wagner *et al.*, 1987], ou de formation d'une liaison covalente [Horiuchi *et al.*, 1997].

L'incompatibilité physique peut inclure une modification des solubilités individuelles ou la formation d'un eutectique, qui modifiera la formulation et précipiter la dégradation du médicament [Buckley *et al.*, 1993 ; Rajewski *et al.*, 1997]. L'exemple du polymorphisme du ritonavir est un cas édifiant de l'importance de la maîtrise en amont des propriétés physiques des principes actifs. La découverte tardive après commercialisation d'une forme II du ritonavir, plus stable et peu soluble que la forme I, avec une faible biodisponibilité a entraîné le retrait temporaire du marché du ritonavir [Morissette *et al.*, 2003]. Par la suite, il a été découvert que même de traces de la forme II peut catalyser la conversion de la forme I en forme II [Bauer *et al.*, 2001].

Il est donc essentiel que les APIs soient préalablement étudiées en association. La compréhension du comportement physico-chimique des mélanges d'APIs est importante car elle permet de comprendre dans un second temps les mécanismes qui les gouvernent dans le produit médicamenteux final. Le résultat peut ensuite être utilisé dans la stratégie de préformulation (espace de connaissance) pour stabiliser le médicament.

Compte tenu des résultats de la stabilité intrinsèque du ticagrelor [Sadou Yayé *et al.*, 2015] et des propriétés physico-chimiques des composés purs, des mélanges de ticagrelor et d'aspirine ont été étudiés à l'état solide grâce à l'utilisation de méthodes analytiques couplées et / ou complémentaires comme à de la calorimétrie à balayage différentiel (DSC) et de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HR-MSⁿ), l'infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), l'analyse thermogravimétrique (TGA) ou la diffraction des rayons X (XRD).

II. Matériels et méthodes

1. Matières premières et réactifs

Le ticagrelor (TIC) d'une pureté supérieure à 98% a été obtenu auprès d'Interchim® (Montluçon, France). L'acide acétylsalicylique (ASA) (pureté : 99,5%) a été acheté auprès de Cooper (Melun, France). L'acétonitrile de qualité analytique a été fourni

par Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). L'eau ultrapure du système Q-Pod Milli-Q (Millipore, Molsheim, France) a été utilisée pour la dissolution, la dilution et comme composant de la phase mobile.

2. Protocole d'étude de stress du mélange TIC-ASA à l'état solide

Les substances chimiques de TIC et d'ASA ont été séchées à 80 °C dans un four pendant 24 heures, puis mélangées (rapport molaire 1:1) par broyage délicat à l'aide d'un mortier et d'un pilon pendant 5 minutes. 50 mg des deux APIs et de leurs mélanges ont été préparés en triplicate, puis placés dans un four calibré à 80 °C et à 100 °C et enlevés après 1 jour et 3 jours d'exposition.

Parallèlement, des études cinétiques ont été réalisées. Des échantillons d'environ 10 mg de mélanges TIC-ASA ont été préparés en triplicate et placés dans des fours à 25, 40, 60, 70, 80 et 90 °C (± 1 °C). Les échantillons ont été enlevés à 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28 jours et analysés par CLHP. Parallèlement, des échantillons contrôles de mélange TIC, ASA et TIC-ASA stockés à 25 °C pendant un an ont été testés pour l'évaluation des produits de dégradation.

3. Instrumentation

Aucune technique ne suffit à elle seule pour mener une étude d'interaction / compatibilité entre 2 principes actifs pharmaceutiques, mais requiert au contraire une batterie de tests complémentaires, souvent en couplage non seulement pour la caractérisation des propriétés physico-chimiques des APIs à l'état solide (RX, ATG, DSC, IR, etc.) mais aussi pour les études des associations d'APIs (RX, ATG, DSC, IR, LC-MS, etc.).

3.1. Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X est utilisée pour l'analyse de poudres en réflexion. L'instrument muni d'une optique Debye-Scherrer a été utilisée avec un diffractomètre sur poudre INEL équipé d'un détecteur sensible à la position cylindrique (CPS120) contenant 4096 canaux ($0,029^\circ$ 2θ angulaire) et un rayonnement monochromatique

Cu K α 1 ($\lambda = 1,54061 \text{ \AA}$). La poudre obtenue par broyage et tamisage, est introduite dans un capillaire transparent aux rayons X (tube de Lindemann) de 0,5 mm de diamètre, tournant perpendiculairement au faisceau des rayons X lors des expériences afin d'améliorer la moyenne sur les orientations des cristallites.

3.2. LC-HR-MSⁿ

Une méthode CLHP a été développée et optimisée pour analyser les APIs de TIC et d'ASA, leurs produits de dégradation / interaction des échantillons stressés, ainsi que les échantillons récupérés des creusets de DSC. Un système Dionex Ultimate 3000 LC (DIONEX, Les Ulis, France) a été utilisé et consistait en une pompe quaternaire, un dégazeur, un échantillonneur automatique thermostatique avec une seringue d'injection de 200 μ L et un compartiment à colonne thermostatée. Une colonne C18 (Phenomenex[®]) (150 mm x 4,6 mm, 4 μ m) réglée à 25 °C a été utilisée. Les paramètres LC optimisés comprennent une phase mobile de composition : acétonitrile (phase A) et eau (phase B), réglée en mode gradient (A 20% v/v de 0 à 5 min; A 20% à 60% v/v de 5 à 7 min; A 60 \rightarrow 80% v/v de 15 à 17 min; A 80 \rightarrow 20% v/v de 17 à 20 min et A 20% v/v jusqu'à 25 min). Le débit a été réglé à 1 mL min⁻¹.

Le couplage LC-MS est utilisé pour l'élucidation structurale des produits de dégradation formés au décours des analyses DSC et du stress thermique. Ce couplage a fait appel au système LC Dionex[®] avec le système electrospray (ESI)-LTQ-Orbitrap Velos Pro. Les analyses ont été effectuées en ionisation positive et négative respectivement pour TIC et ASA. La tension de source a été fixée à 3,4 kV, les températures de la source et du capillaire ont été fixées à 53 °C et 300 °C, respectivement en tenant compte du recul sur l'analyse des composés organiques au sein de notre laboratoire. Le paramètre S-Lens est réglé à 60%. L'azote est employé comme gaz de nébulisation et gaz auxiliaire à des débits fixés à 35 et 15 unités arbitraires, respectivement. Des valeurs de CEL de 30-40% ont été définies pour des études de fragmentation à haute résolution. L'acquisition des spectres MS complets (mode full scan) et des spectres MSⁿ des ions sélectionnés (acquisition automatique grâce au LTQ) est réalisée dans la gamme de masse de 50 à 1000 Da pour la détection des solutés et de leurs produits de dégradation.

3.3. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les expériences DSC ont été réalisées à l'aide d'un calorimètre à flux thermique Q1000 (TA Instruments, USA). Il a été étalonné avant utilisation avec des standards d'indium de haute pureté ($T_{\text{fus}} = 156,60 \text{ }^{\circ}\text{C}$) et d'étain ($T_{\text{fus}} = 231,91 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Des échantillons d'APIs, mais aussi de leurs mélanges env. 1,5 - 4 mg sont scellés dans de creusets en aluminium, puis analysés à une vitesse de 10 K min^{-1} , de 30 à $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$, dans une atmosphère inerte d'azote avec un débit de purge de $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Pour comprendre les phénomènes physico-chimiques autour de la fusion du mélange des 2 APIs, des cycles de chauffage – refroidissement du mélange des 2 APIs (1:1 de fraction molaire) ont été réalisés. Les creusets ont été récupérés, ouverts, dissouts dans 1 ml d'acétonitrile, puis passés aux ultrasons pendant 10 min et analysés par LC-HR-MSⁿ.

3.4. Analyse thermogravimétrique

Les mesures thermogravimétriques ont été réalisées utilisant l'appareillage TA instruments Q500 thermogravimetric analyzer (TGA) équipé d'une thermobalance de précision ($0,1 \text{ } \mu\text{g}$). Les échantillons pesés (3-8 mg) sont chauffés entre $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ to $600 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Les essais de chauffage ont été effectués sous atmosphère inerte d'azote à trois vitesses de chauffage : 5, 10 et 20 K min^{-1} .

3.5. Mesures infrarouges à transformée de Fourier (FTIR)

Le FTIR a été utilisé pour évaluer les modifications de l'environnement moléculaire des APIs induites dans le mélange physique (0,30 fraction molaire TIC). Les expériences ont été effectuées sur un système Perkin-Elmer Spectrum BX FT-IR basé sur des accessoires d'échantillonnage de réflexion diffuse avec le logiciel FT-IR Spectrum v2.00. Les spectres des APIs, leurs mélanges et les échantillons stressés correspondants ont été enregistrés à température ambiante dans la gamme de longueurs d'ondes comprise entre 400 et 4000 cm^{-1} en utilisant des pastilles KBr.

III. Caractérisation des propriétés physiques des principes actifs

1. Polymorphisme des substances actives pharmaceutiques

Les APIs peuvent exister à l'état solide sous différentes formes cristallines ou polymorphes (selon les 7 systèmes cristallins). L'incorporation de molécules de solvant ou d'eau au sein de la structure cristalline engendre des polymorphes qualifiés respectivement de solvates et d'hydrates (pseudopolymorphes) [ICH, 1999 ; Bernstein, 2002 ; Brittain, 2009]. En absence d'ordre dans les matériaux, ils sont qualifiés d'amorphes. Ces dernières, de par les valeurs élevées de leur d'énergie libre, sont parfois recherchées en formulation pharmaceutique pour leur grande solubilité, mais avec un risque d'instabilité plus grand, comparés aux formes cristallines de la même substance active. Le phénomène de polymorphisme est très répandu dans le monde pharmaceutique. Environ 70% des substances actives sont concernées [Bond *et al.*, 2007], ce qui impose aux industriels pharmaceutiques de connaître les variations polymorphiques en relation avec leurs principes actifs et d'en évaluer les impacts sur l'efficacité et la sécurité du médicament. Des différences de formes peuvent se traduire par des différences de propriétés physico-chimiques comme la solubilité, les domaines de stabilité, la biodisponibilité, la réactivité chimique, le taux de dissolution, la compressibilité, le point de fusion, la densité, la résistance au stress etc. [Bernstein, 2002].

La diffraction des rayons X (XRD) constitue une méthode de choix pour la caractérisation structurale des formes cristallines des APIs. Elle est basée sur la mesure de la diffraction des rayons X au travers du réseau cristallin et obéit à la loi de Bragg [Dong *et al.*, 2011 ; Wilkins, 2013] :

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda$$

où hkl sont les indices de Miller utilisés pour identifier les différents plans cristallographiques, d_{hkl} représente la distance entre des plans cristallographiques dans une famille hkl , θ est le demi-angle de déviation entre le faisceau incident et la direction du détecteur, n est un nombre entier et λ la longueur d'onde du rayon incident.

Cette loi est utilisée pour déterminer les caractéristiques du réseau cristallin (type, paramètres) ainsi que les paramètres de maille par dilatation thermique.

Dans le cadre de l'étude de l'association ticagrelor – aspirine, l'étude des polymorphes est limitée seulement aux APIs purs. Par conséquent, les mécanismes d'interaction qui seront mis en évidence prennent en compte les propriétés physico-chimiques de ces APIs comme rappelé ci-dessus.

2. Ticagrelor

Le ticagrelor est un principe actif sujet aux phénomènes de polymorphisme. Dans le seul brevet qui existe, quatre polymorphes nommés I, II, III et IV avec respectivement des températures de fusion à 128, 135, 139 et 150 °C ont été mis en évidence [Bohlin *et al.*, 2003]. Ces polymorphes se caractérisent également par leurs profils de diffraction des rayons X différents.

2.1. Caractérisation du polymorphe étudié du ticagrelor

L'échantillon de ticagrelor Interchim[®] de nature polymorphique inconnue est analysé par DSC. 1,5 à 4 mg d'échantillon est pesé et transféré dans de creusets en aluminium, puis analysé à une vitesse est de 10 K min⁻¹, de 30 à 160 °C, dans une atmosphère d'azote inerte. Les paramètres de fusion : température de fusion (T_{onset}) = 136,2 ± 1,9 °C et enthalpie de fusion (ΔH_{fus}) = 81 ± 5 J g⁻¹ (Figure 49), montrent que l'échantillon de ticagrelor Interchim pourrait être le polymorphe II, mais requiert une analyse confirmatoire par la diffraction aux rayons X.

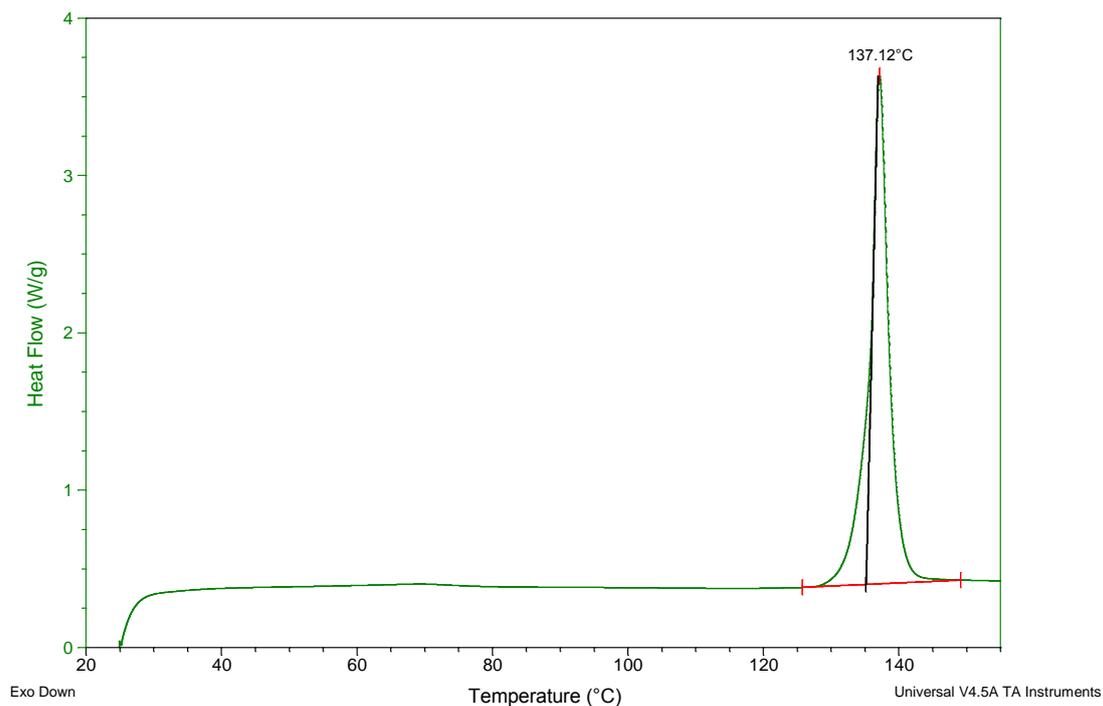


Figure 49 : Thermogramme de l'échantillon de ticagrelor.

2.2. Détermination de la forme cristalline du ticagrelor

Le diffractogramme de l'échantillon Interchim[®] (Figure 50) confirme la présence de la forme polymorphique II [Bohlin *et al.*, 2003].

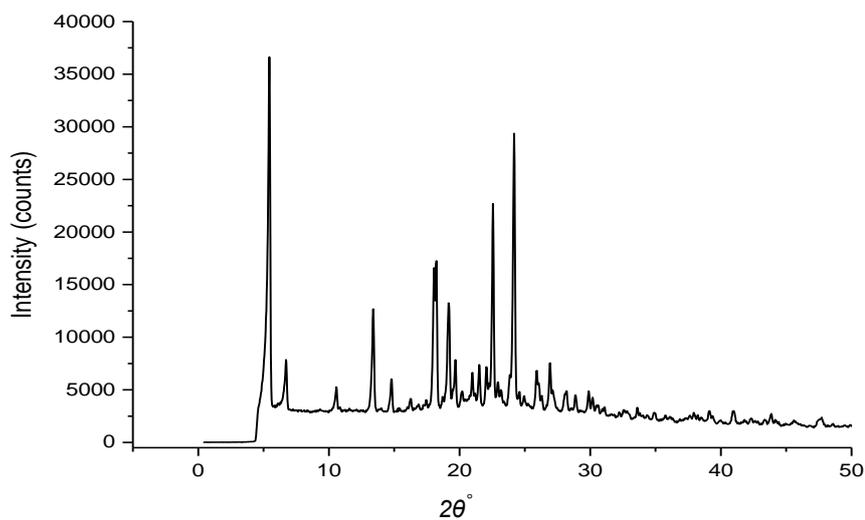


Figure 50 : Profil de diffraction aux rayons X de la polymorphe II de ticagrelor.

L'appareil RX étant muni d'un dispositif de régulation de température, les paramètres de maille du ticagrelor ont été étudiés par thermodilatométrie. Comme illustré sur la [figure 51](#) (a à g) les paramètres de longueur de maille a et c augmentent de façon plus ou moins linéaire entre 100 et 408,5 K. Quant à la longueur b, il s'étend de 17,370 à 17,436 Å entre 100 – 325 K, avant de retrouver une dimension proche de la valeur initiale de 17,389 Å à 408,5 K. Pour les paramètres d'angles c'est les angles α et β qui diminuent progressivement avec l'augmentation de la température avec des valeurs entre $109,770^\circ \rightarrow 109,506^\circ$ et entre $77,006^\circ \rightarrow 76,1483^\circ$ respectivement. Par contre l'angle γ subit une augmentation linéaire à mesure que la température augmente, les valeurs des angles passant de $95,045^\circ$ à $95,873^\circ$ entre 100 et 408,5 K. Par conséquent, le volume de maille augmente également dans la zone de température évaluée passant de 1238,507 à 1307,096 Å³.

La caractérisation de la structure cristalline à partir des paramètres de longueurs (a, b et c) et d'angles (α , β et γ) de la maille élémentaire de l'échantillon Interchim[®] montrent que les valeurs obtenues sont en faveur d'un réseau cristallin triclinique [[Waseda et al., 2011](#)].

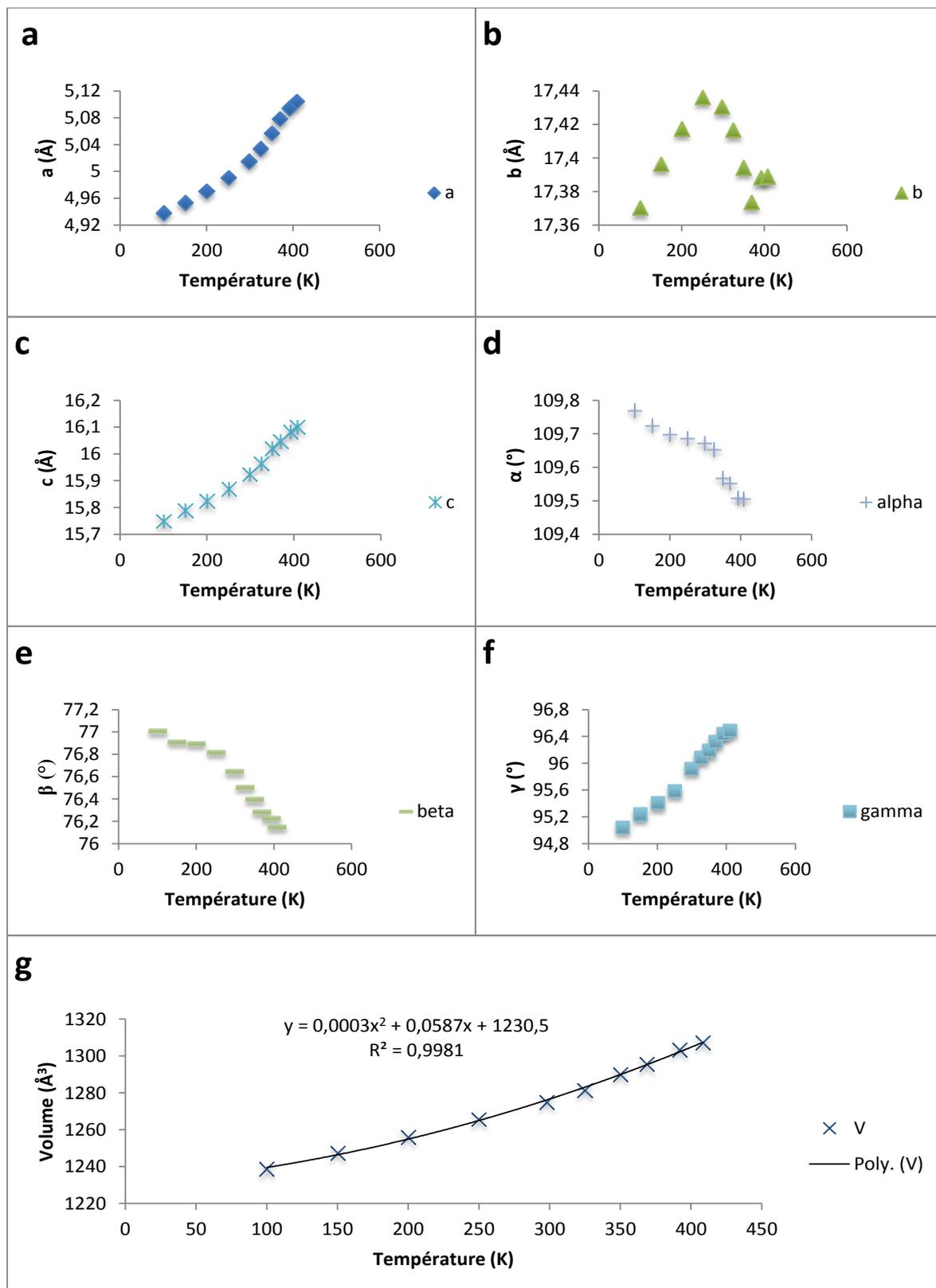


Figure 51 : Paramètres de maille de l'échantillon de ticagrelor Interchim[®] en fonction de la température. a, b et c : Paramètres de longueurs (a,b,c) ; e, f et g : paramètres d'angles (α, β et γ) et de volume (V).

3. Aspirine : Caractérisation de la forme polymorphique de l'échantillon Cooper®

L'échantillon d'aspirine Cooper® est analysé par DSC dans les mêmes conditions que le ticagrelor. L'aspirine conduit à une température de fusion (T_{onset}) et une enthalpie de fusion (ΔH_{fus}) respectivement de $138,1 \pm 2,5$ °C et $184,5 \pm 13,1$ J g⁻¹ (Figure 52). Les données de l'analyse thermique couplées au profil de la diffraction des rayons X (Figure 53) montre que l'échantillon d'aspirine utilisé concorde avec sa forme polymorphique I, avec un réseau cristallin qui est monoclinique [Kim *et al.*, 1985 ; Aulton *et al.*, 2013].

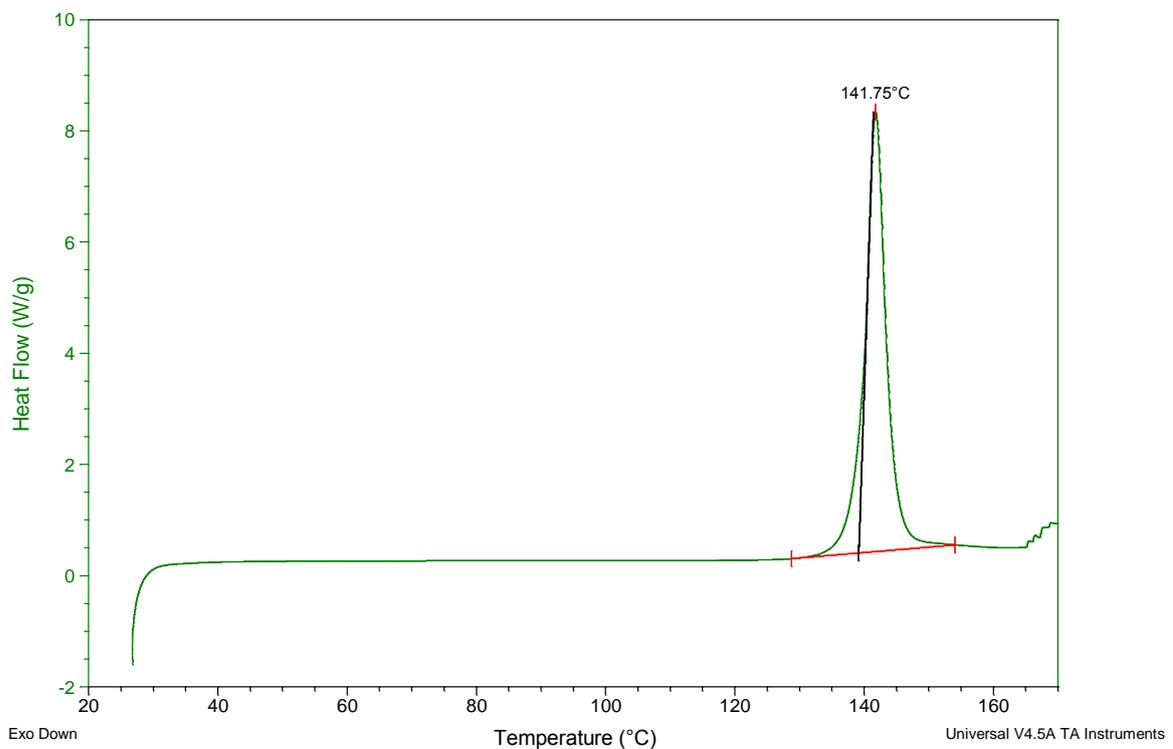


Figure 52 : Thermogramme de l'aspirine

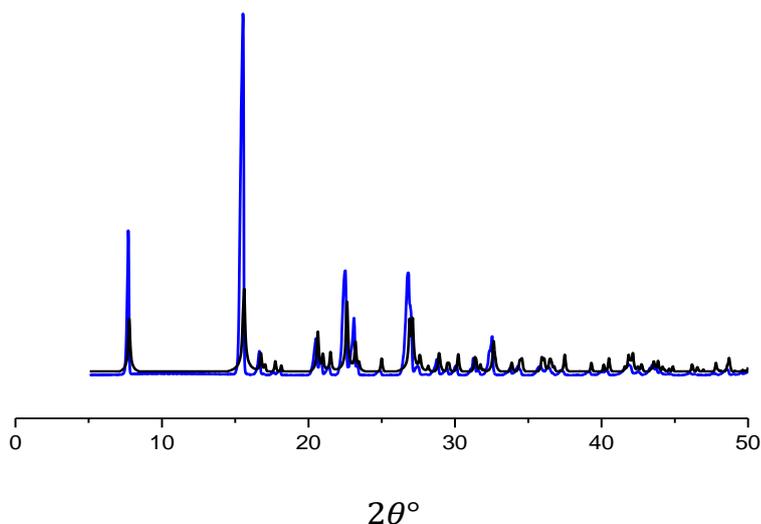


Figure 53 : Profil de diffraction des rayons X de l'échantillon d'aspirine utilisé pour réaliser les mélanges avec le ticagrelor. L'échantillon d'aspirine (diffractogramme bleu) et la forme I d'aspirine caractérisée par Kim Y *et al.* (Profil en couleur noire).

IV. Stabilité physique du mélange solide ticagrelor – aspirine

1. Préparation des échantillons pour l'analyse thermique

Pour les diagrammes température – composition chimique, des mélanges physiques binaires TIC-ASA avec des valeurs de fractions molaires de TIC comprises entre 0 et 1 ($X_{TIC} = \frac{n_{moles\ TIC}}{n_{moles\ ASA} + n_{moles\ TIC}}$) ont été préparés par mélange délicat et broyage des deux composés à l'aide d'un mortier et d'un pilon pendant 5 min (Tableau 19).

Tableau 19 : Compositions des mélanges Ticagrelor - Aspirine utilisés pour l'étude (Fractions molaires de TIC).

X_{TIC}	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	0,95
Masse (ASA) (mg)	43,4	37,8	29,0	22,3	17,0	12,8	9,3	6,4	4,0	1,8	0,9
Masse (TIC) (mg)	6,6	12,2	21,0	27,7	33,0	37,2	40,7	43,6	46,0	48,2	49,1

2. Détermination des paramètres physiques du mélange

Pour chaque fraction molaire, un échantillon de 1,5 – 4 mg est transféré dans une capsule scellée, puis les paramètres de fusion (température et enthalpie de fusion) des mélanges ont été évalués par DSC à une vitesse de 10 K min⁻¹ de 30 °C à 160 °C.

Les thermogrammes montrent deux pics endothermiques indiquant l'apparition d'une transition eutectique et d'un liquidus (Figure 54a) [Vargha, 2007 ; Herman *et al.*, 2012 ; Diarce *et al.*, 2015]. La température du début de la transition eutectique (T_{onset}), 98 °C et celle du maximum du pic du liquidus ont été utilisées pour tracer le diagramme de phases TIC-ASA illustrant la température en fonction de la composition (Figure 54b).

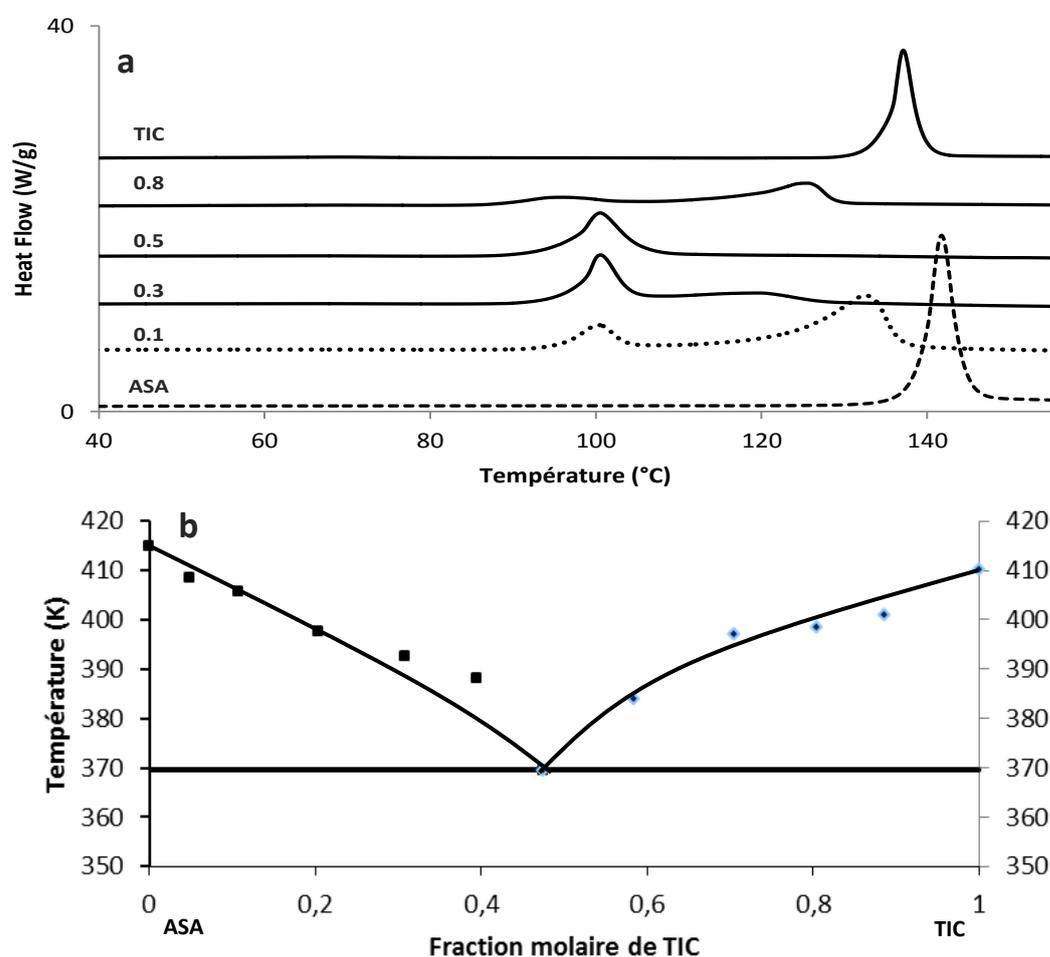


Figure 54 : Comportement à l'état solide du ticagrelor et de l'aspirine: a) courbes DSC typiques; b) diagramme de phase composition en fonction de la température avec un comportement eutectique (fraction molaire X du Ticagrelor indiquée en abscisse).

3. Estimation de la composition de l'eutectique

A partir des données physiques des mélanges obtenues de leurs thermogrammes, la dépendance entre l'enthalpie molaire de l'eutectique et la fraction molaire de ticagrelor, appelée courbe de Tammann, a été utilisée pour estimer la composition de l'eutectique (Figure 55) [Guenet, 1996 ; Rycerz, 2013]. La portion riche en aspirine de la courbe de Tammann a conduit à l'équation suivante: $\Delta H_{\text{eutectic}}(x) = 62\,249 \cdot x$ et la partie riche en ticagrelor a donné l'équation $\Delta H_{\text{eutectic}}(x) = -52\,298 \cdot x + 52\,398$.

Avec ces deux expressions la projection graphique de l'intersection des 2 équations sur l'axe des abscisses permet d'obtenir une valeur de fraction molaire de l'eutectique de 0,457. Au regard du diagramme de phases TIC-ASA et du diagramme de Tammann, le système TIC-ASA présente une transition eutectique simple à 98 °C avec une fraction molaire de transition de phase solide – liquide de 0,457 en TIC (Figure 55).

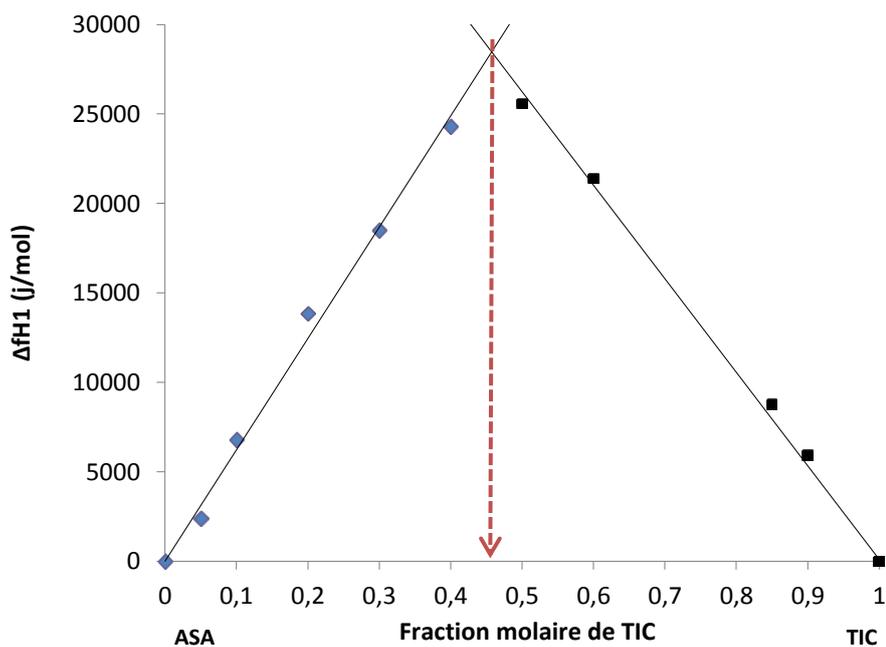


Figure 55 : Courbe de Tammann de la transition eutectique.

V. Stabilité chimique à l'état solide du mélange ticagrelor – aspirine

1. Etude du mélange en condition de stress thermique

Les 2 APIs purs de ticagrelor et d'aspirine conservés à 80 °C et à 100 °C, ne présentent aucun changement de leur aspect physique. Leur mélange physique (rapport molaire 1:1) conserve la même apparence pendant 1 jour à 80 °C. Cependant, le mélange de poudre devient jaunâtre au bout de 3 jours de conservation à 80 °C. A 100 °C, le changement de couleur s'opère en un jour (Tableau 20).

Tableau 20 : Apparence physique des APIs de Ticagrelor et d'aspirine et de leurs mélanges (rapport molaire 1: 1) sous conditions de stress thermique

APIs et Mélange TIC-ASA	25 °C	80 °C (J1)	80 °C (J3)	100 °C (J1)	100 °C (J3)	Sous lumière (1,5 W/m ²) (J3)
TIC	Poudre blanche	Poudre blanche	Poudre blanche	Poudre blanche	Poudre blanche	Poudre blanche
ASA	Poudre blanche	Poudre blanche	Poudre blanche	Poudre blanche	Poudre blanche	Poudre blanche
Mélange TIC-ASA (mol:mol)	Poudre blanche	Poudre blanche	Jaunâtre et humide	Jaunâtre et humide	Jaunâtre et humide	Poudre blanche

Il ressort clairement des résultats précédents que des interactions chimiques se produisent dans les mélanges physiques de ticagrelor et d'aspirine. A 80 °C, le mélange reste solide, alors qu'à 100 °C, le dépassement de la température eutectique transforme une partie du mélange solide en liquide selon l'équation :



Les échantillons stressés ont été étudiés par LC-HR-MSⁿ. Le profil de fragmentation de TIC a été décrit dans notre publication précédente [Sadou Yayé *et al.*, 2015]. Ces résultats seront utilisés pour analyser les produits d'interaction et de dégradation dans le mélange actuel avec le ticagrelor et l'aspirine.

Par la suite, seront considérés comme produits d'interaction (IP) tout produit issu de l'interaction entre la molécule de TIC à laquelle s'additionnent d'autres fragments moléculaires en particulier de l'ASA. En outre, les produits de dégradation (DP) sont considérés comme ceux ayant une masse molaire plus petite et provenant soit du ticagrelor directement ou de l'un des produits d'interaction. Pour chaque IP ou DP identifié par LC-HR-MSⁿ, sa composition élémentaire est déduite et l'erreur de masse (par rapport à la masse théorique exacte) est calculée pour vérification ([Tableau 21](#)).

Tableau 21 : Résultats des analyses LC-HR-MSⁿ : Temps de rétention et masses exactes des produits d'interactions du mélange Ticagrelor - Aspirine et leurs produits de dégradation correspondants obtenus par mécanisme de N-déalkylation.

Produits d'interactions TIC-ASA					Produits de dégradation correspondants de N-dealkylation de TIC				
Produits d'interactions	Temps de rétention (min)	Masse observée	Masse exacte	Erreur (ppm)	Produits de dégradation	Temps de rétention (min)	Masse observée	Masse exacte	Erreur (ppm)
TIC API	11.05	523.1819	523.1816	0.6	371	8.35	371.1488	371.1502	-3.8
							343.1433	343.1429	1.2
							325.1332	325.1323	2.8
Carbon monoxide-TIC (IP1)	13.27	551.1857	551.1883	-4.7	371-CO (DP1)	8.96	399.1429	399.1445	-4.0
		533.1766	533.1778	-2.3			381.1324	381.134	-4.2
		523.1820	523.1816	0.7			371.1492	371.1496	-1.1
		505.1707	505.1731	-4.8			371.1372	371.1384	-3.2
		399.1433	399.1445	-2.9			357.0973	357.0976	-0.8
		391.1167	391.1147	5.1			337.1092	337.1077	4.4
		363.1094	363.108	3.9			329.1022	329.1027	-1.5
							329.0910	329.0914	-1.2
							311.0807	311.0809	-0.6
							169.0176	169.0179	-1.8
Acetyl-TIC (IP2)	14.53	565.2016	565.2039	-4.1	371-COCH ₂ (DP2)	9.02	413.1587	413.1602	-3.6
		523.1921	523.1934	-2.5			371.1487	371.1502	-3.9
Diacetyl-TIC (IP3)	18.06	607.2116	607.2145	-4.8	371-(COCH ₂) ₂ (DP3)	9.72	455.1689	455.1707	-4.0
		565.2023	565.2039	-2.8			413.1595	413.1602	-1.8
		523.1916	523.1934	-3.4			371.1494	371.1496	-0.5
Triacetyl-TIC (IP4)	21.5-22.08	649.2232	649.2251	-2.9	371-(COCH ₂) ₃ (DP4)	9.85-10.88	497.1791	497.1812	-4.2
		607.2126	607.2145	-3.1			455.1696	455.1707	0.0
		565.2025	565.2039	-2.5			413.1595	413.1602	-1.7
		523.1927	523.1934	-1.3			371.1488	371.1502	-3.9
TIC-Salicylate (IP5)	19.7-20.44	643.2114	643.2144	-4.7	371-Salicylate (DP5)	10.51	491.1697	491.1707	-2.0
		523.1924	523.1934	-1.9			371.1488	371.1502	-3.8
Acetyl-TIC-Salicylate (IP6)	22.63	685.2216	685.2251	-5.1	Acetyl-371-Salicylate (DP6)	12.18	533.1790	533.1813	-4.3
		565.2014	565.2039	-4.4			413.1592	413.1602	-2.4
		523.1921	523.1934	-2.5			371.1491	371.1502	-3.0
Diacetyl-TIC-Salicylate (IP7)	21.8	727.2327	727.2356	-4.0	Diacetyl-371-Salicylate (DP7)	11.30	575.1888	575.1919	-5.4
		685.2243	685.2251	-1.2			533.1798	533.1813	-2.8
		607.2134	607.2145	-1.8			491.1706	491.1707	-0.2
		565.2033	565.2039	-1.0			413.1591	413.1602	-2.8

2. Stabilité thermique des APIs purs

L'analyse par LC-HR-MSⁿ des échantillons de poudres des APIs purs stressés à 80 °C pendant un jour n'a révélé aucun produit de dégradation. Il a été vérifié par LC-

HR-MSⁿ que le chauffage jusqu'à 160 ° C des échantillons de TIC pur par la DSC n'a pas non plus engendré de formation de produits de dégradation. Ces résultats sont concordants avec l'absence de changement physique de l'aspect des composés purs. Pour l'aspirine, il est connu qu'il se décompose rapidement en acide salicylique et acide acétique après sa fusion [Carstensen *et al.*, 1988].

3. Cinétique de dégradation du mélange solide TIC-ASA

Pour chaque température d'exposition, l'évolution des teneurs de ticagrelor et d'aspirine dans les mélanges est représentée en fonction du temps (Figure 56a, Tableau 22).

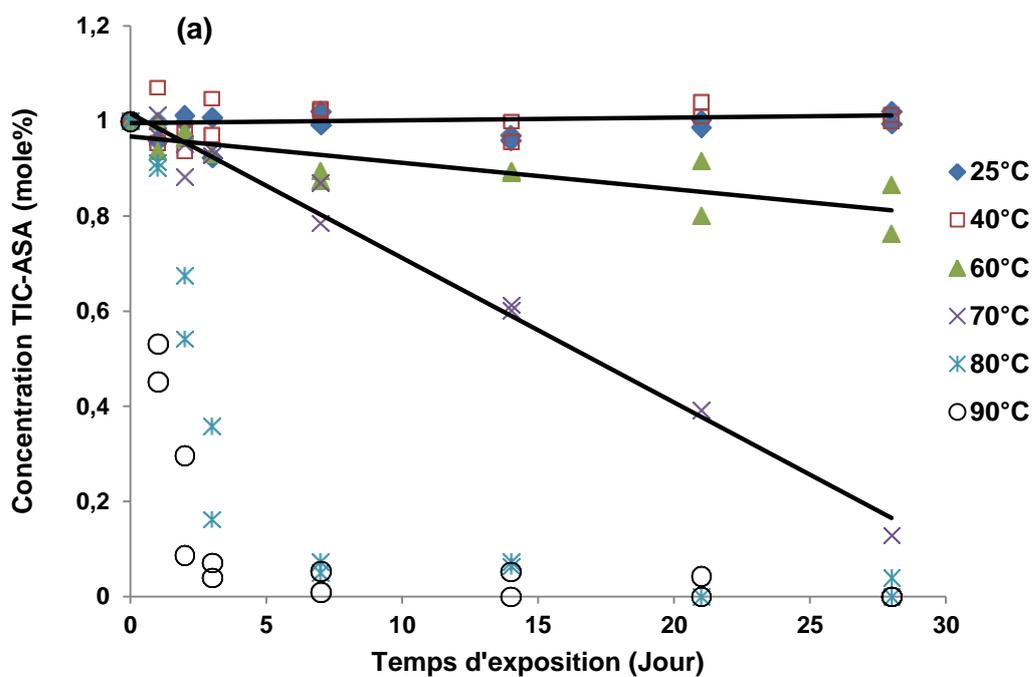
Ordre de la réaction

Comme pour le ticagrelor dans le chapitre 3, les données de décomposition du mélange ont été analysées avec les profils de cinétique d'ordre zéro, un et deux. Les expressions de cinétique d'ordre zéro ont donné des ajustements raisonnables dans les limites de précision des données. Les constantes de vitesse de dégradation (k) correspondant aux différentes températures ont permis de tracer la droite d'Arrhenius (Figure 56b). L'énergie d'activation de la réaction de décomposition observée de $130 \pm 12 \text{ kJ mol}^{-1}$ est similaire à celle trouvée par Carstensen *et al.* pour la décomposition de l'ASA en présence d'eau (environ 128 kJ mol^{-1}) même si la vitesse de réaction dans le mélange actuel de TIC-ASA est beaucoup plus faible (par exemple dans le présent mélange à 65 °C, $0,016 \text{ mole\% j}^{-1}$ de décomposition mise en évidence, alors que Carstensen *et al.* ont rapporté une perte de $7,9 \text{ mole\% j}^{-1}$) [Carstensen *et al.*, 1988]. Le facteur limitant de la vitesse de décomposition du mélange TIC-ASA pourrait donc dépendre de la décomposition de l'ASA et les produits de réaction peuvent par la suite réagir rapidement avec le TIC.

En extrapolant l'équation d'Arrhenius à 25 °C, une perte de 1% par an est obtenue. Les essais effectués sur des échantillons TIC-ASA stockés pendant un an à 25 °C ne révèlent aucun produit de décomposition. Ainsi, la dégradation obtenue de 1% par l'équation d'Arrhenius pourrait être une limite supérieure de l'estimation de décomposition du mélange. L'impact de l'aspirine sur la décomposition de TIC est développé dans les paragraphes suivants avec une explication mécanistique de la décomposition du mélange.

Tableau 22 : Equations de dégradation du mélange Ticagrelor – Aspirine en fonction de la température.

Temperature (°C)	Pente de la droite	R ²
60	0,0072	0,5682
70	0,0294	0,9823
80	0,1507	0,7111
90	0,3068	0,8548



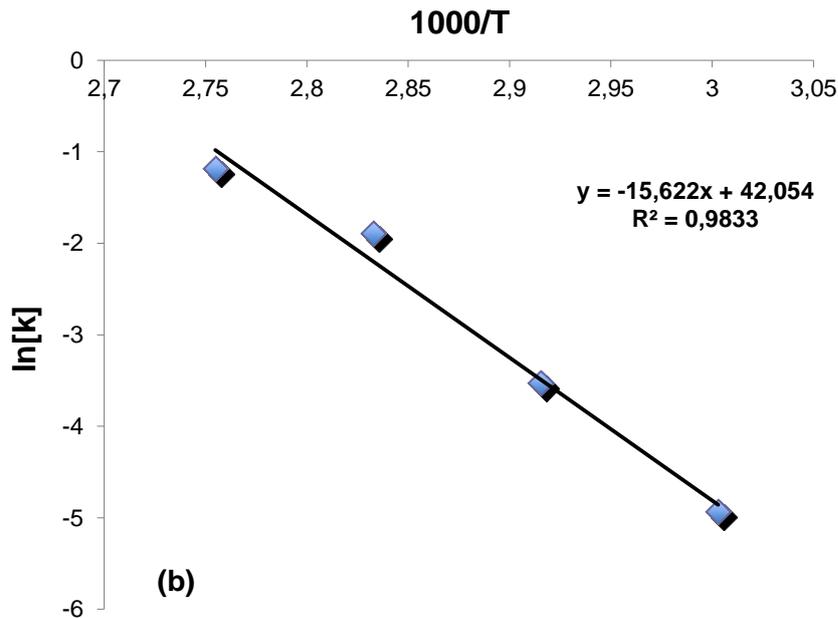


Figure 56 : Cinétique de décomposition du mélange TIC - ASA: (a) Evolution des teneurs en% molaire du mélange TIC-ASA des échantillons stressés en temps d'exposition en jours et en fonction de la température (°C) (b) Courbe d'Arrhenius obtenue à partir des constantes de vitesse de réaction avec le modèle de cinétique d'ordre zéro .

4. Caractérisation des produits d'interaction (IPs) et produits de dégradation (DPs)

Comme indiqué dans le [tableau 21](#), sept produits d'interaction ont été identifiés, nommés IP1 à IP7. Ils présentent respectivement des masses avec 28, 42, 84, 126, 120, 162 et 204 amu supérieures à celle de la molécule de TIC. On peut déduire qu'ils représentent respectivement le monoxyde de carbone-TIC, l'acétyl-TIC, le diacétyl-TIC, le triacétyl-TIC, le salicylate de TIC, le salicylate d'acétyl-TIC et le salicylate de diacétyl-TIC.

Quatre sites d'interaction possibles sur le TIC peuvent être identifiés : les trois fonctions d'alcool et l'arylamine secondaire, comme illustré avec la [figure 57b](#). Une transition caractéristique en relation avec une interaction avec l'arylamine secondaire du TIC est par exemple caractérisée par la perte neutre du groupement hydroxyéthoxycyclopentane-1,2-diol. Une interaction avec l'alcool primaire se caractérise par l'absence de perte neutre d'éthanol ou d'éthylène glycol. La présence

des deux dernières transitions suggère donc une interaction avec les alcools de cyclopentane. En conséquence, pour les produits observés, plusieurs isomères séparés par LC peuvent être trouvés correspondant aux différentes combinaisons d'interactions sur les sites susmentionnés (voir l'exemple des différents pics pour IPs2 et IPs3 sur la figure 57a).

Pour le produit m/z 371, le nombre d'IPs était supérieur à celui des sites d'interaction, ce qui suggère la formation de stéréo-isomères. En effet, dans le cas où l'acétylation implique un seul des cyclopentane-diols, la formation d'une liaison hydrogène avec l'OH libre peut générer la formation de liaison hydrogène en fonction de la position de la fonction carbonyle. Cette hypothèse est avancée au regard des différences de leurs spectres MS, qui diffèrent d'une molécule d'eau.

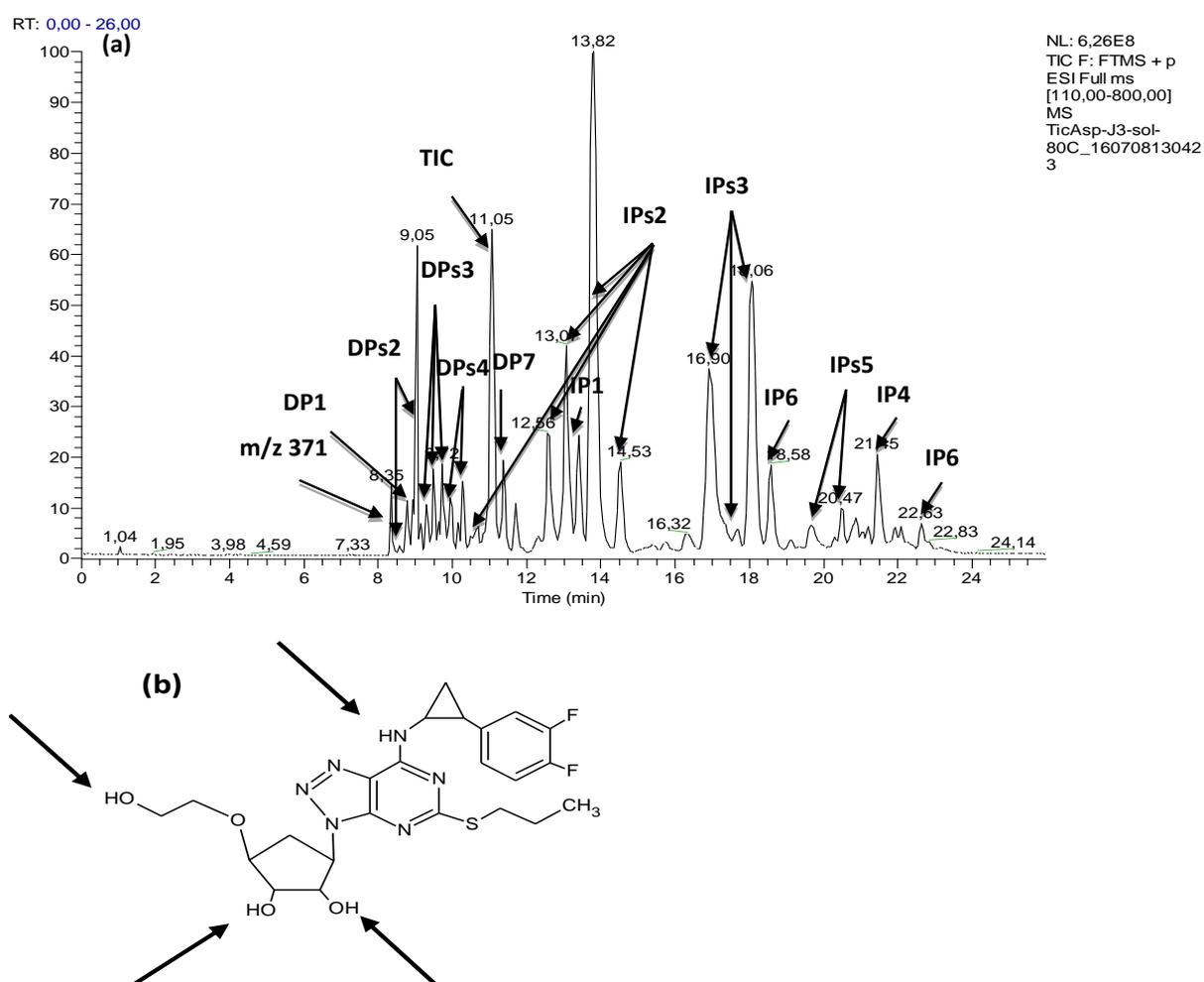


Figure 57 : a) Chromatogramme du mélange Ticagrelor - Aspirine après thermolyse à 80 °C pendant 24h; b) Sites d'interactions possibles sur la molécule TIC

5. Proposition des voies de dégradation du mélange TIC-ASA

Dans notre publication précédente, nous avons démontré que TIC conduit à la formation du produit de dégradation m/z 371 par N-déalkylation lorsqu'il est soumis au stress thermique à 80 °C en solution [Sadou Yayé *et al.*, 2015]. Cependant, l'interaction avec l'aspirine a multiplié par dix l'apparition de ce produit de déalkylation. De plus, sept produits de dégradation DP1 à DP7 ont été obtenus en raison de la N-déalkylation des produits d'interaction IP1 à IP7. Ainsi, l'arylamine est clairement le principal site d'interaction et de dégradation de TIC en présence d'ASA. Outre la formation d'acide acétique et d'acide salicylique, d'autres produits de décomposition comme le CO₂ et/ou le CO, se forment probablement à partir d'acide acétique [Mackie *et al.*, 1984 ; Ju Young ParkIn Hwa Lee, 2009] et interagissent avec le TIC, comme illustré avec la figure 58.

De ce qui précède, on peut conclure que la présence d'ASA peut affecter la stabilité chimique de TIC à l'état solide à des températures élevées.

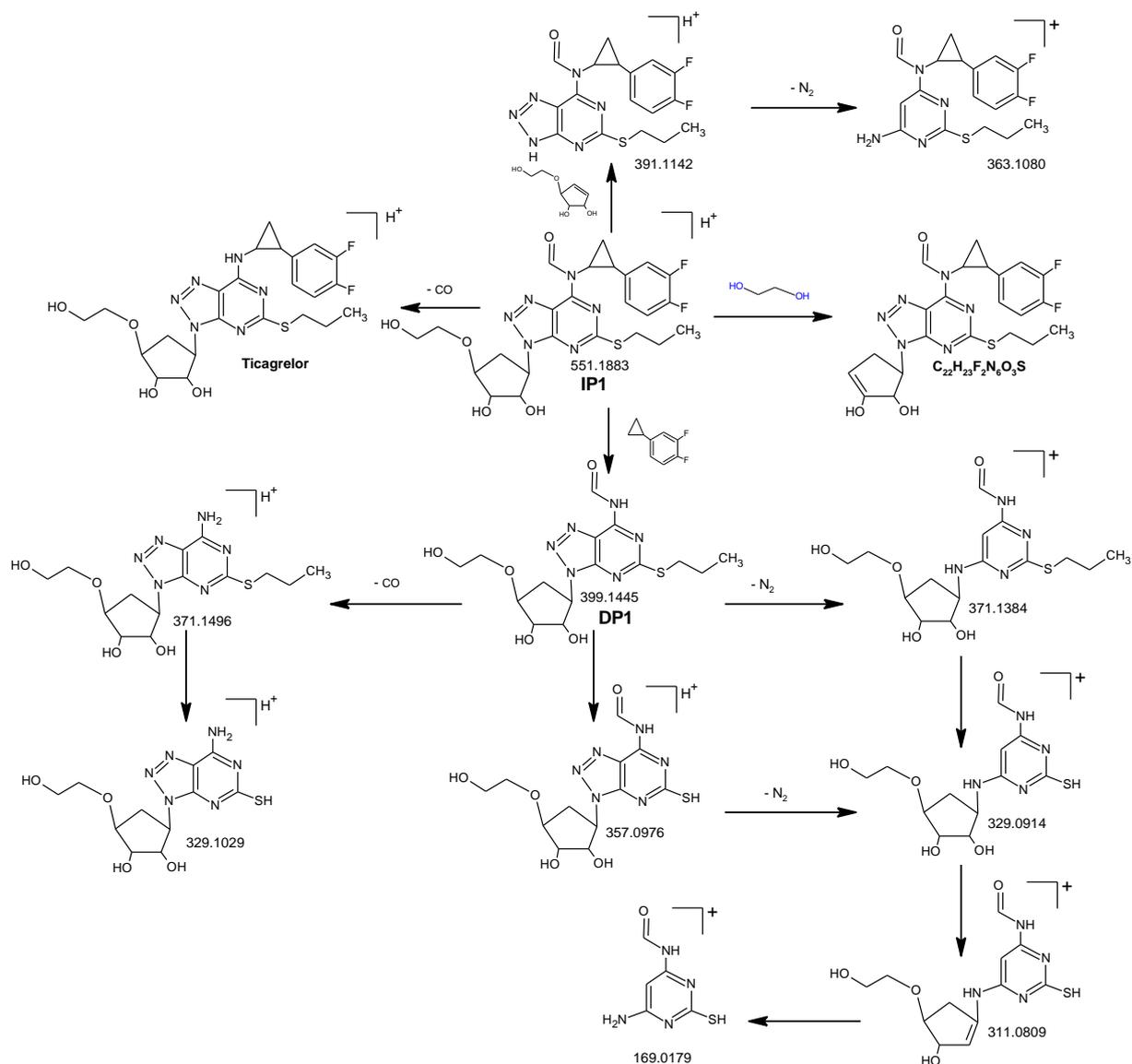


Figure 58 : Profil de fragmentation du produit d'interaction IP1 et du produit de dégradation DP1 correspondant.

VI. Investigation des phénomènes autour de la température eutectique

L'effet de la formation de liquide sur le processus de dégradation

Il a été démontré que la présence d'ASA pourrait affecter la stabilité chimique des TIC à température élevée. Comme la température eutectique se situe autour de 98 °C, l'effet de la formation d'un liquide sur la stabilité chimique du TIC en présence d'ASA doit être évalué.

Les mélanges eutectiques ont été soumis à un cycle de chauffage – refroidissement avec une vitesse de chauffage (refroidissement) de 10 °C min^{-1} jusqu'au T_{peak} de la transition eutectique (= 100 °C) et dans certains cas jusqu'à la fin du liquidus (= 130 °C), suivis du refroidissement des échantillons à température ambiante. Les creusets ont été collectés et les résidus analysés par LC-HR-MSⁿ en mode positif. Comme illustré sur la [figure 59a](#), le refroidissement immédiat après avoir passé la température eutectique s'est soldé par l'apparition d'un seul produit d'interaction de masse m/z à 565,2020. Il s'agit d'un produit d'acétylation de TIC comme cela a été démontré ci-dessus. L'augmentation de la température à celle du liquidus à environ 120 °C pour un mélange des deux APIs ($X_{\text{TIC}} = 0,3$), se traduit par une augmentation significative de l'intensité du produit d'interaction précédent avec l'apparition de deux de ses autres isomères ([Fig. 59b](#)). Par conséquent, il est clair que l'acétylation du TIC joue un rôle important dans le processus de dégradation du mélange. En outre, contrairement à l'état solide, où la vitesse des interactions chimiques est lente, l'état liquide engendre presque immédiatement une augmentation de l'un des principaux produits de dégradation, qui, en plus de l'augmentation de l'énergie d'activation thermique, peut être attribuée à l'augmentation de la mobilité moléculaire des deux API dans la phase liquide [[Yoshioka et al., 2007](#)].

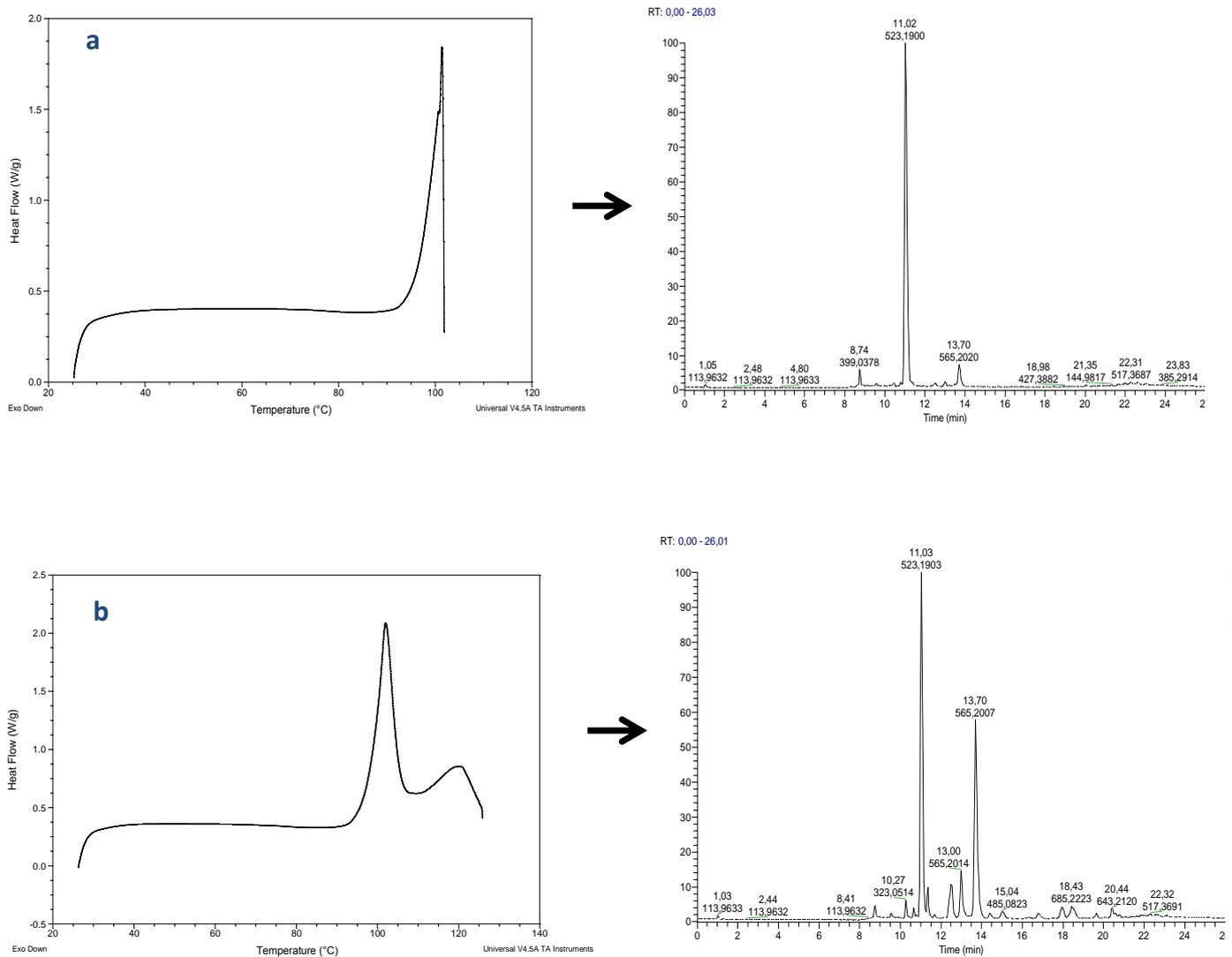


Figure 59 : Dégradation du système Ticagrelor - Aspirine ($X_{TIC} = 0,30$) dans le liquide eutectique (a) et juste après le liquidus (b)

VII. Preuves complémentaires par FT-IR

Plusieurs mesures par FT-IR ont été effectuées pour déterminer dans quelle mesure le FT-IR peut être utilisé pour explorer l'avancement des réactions de dégradation au sein des mélanges TIC-ASA. Les APIs purs exposés à 100 °C pendant 7 jours ne présentent pas de changements substantiels de leurs spectres FT-IR, ni avec les mêmes échantillons conservés à température ambiante pour la même durée, ni avec les spectres des échantillons témoins. Cela s'est traduit par une parfaite superposition des différents spectres (Figure 60 spectres a, b, f et g).

Sur les spectres FT-IR du mélange physique TIC-ASA à T0 et 25 °C, les pics caractéristiques des deux substances chimiques peuvent être reconnus sans apparition de nouvelles bandes supplémentaires (Comparaison sur la figure 60 des

spectres c et d avec les spectres a et g). Cela confirme, l'absence d'interactions physiques comme cela a été observé en DSC.

Cependant, le mélange physique TIC-ASA chauffé pendant sept jours à 100 °C a révélé quelques changements caractéristiques (Fig. 60 spectre e, Tableau 23) :

- L'absence de la bande d'élongation des fonctions OH du TIC à 3365 cm^{-1} et une diminution significative des bandes de déformation OH (environ 40%) entre 1423 et 1550 cm^{-1} .
- L'absence de la bande de vibration d'élongation à 1748 cm^{-1} attribuée au groupement carbonyle de l'ester de l'ASA, suivie d'une augmentation significative (environ 20%) de la bande du carbonyle de l'acide carboxylique, décalée vers le rouge de 1748 à 1700 cm^{-1} , et l'apparition d'une large épaulement à droite.
- Dans la région de l'empreinte digitale de 1100 à 500 cm^{-1} , des changements importants de formes et d'intensités ont été observés par rapport aux spectres du mélange à 25 °C.

Ces résultats confirment les interactions chimiques entre TIC et ASA avec l'élévation de température. Il est clair cependant que le FT-IR n'est pas très sensible aux petits changements chimiques qui peuvent s'opérer avec le mélange d'échantillons.

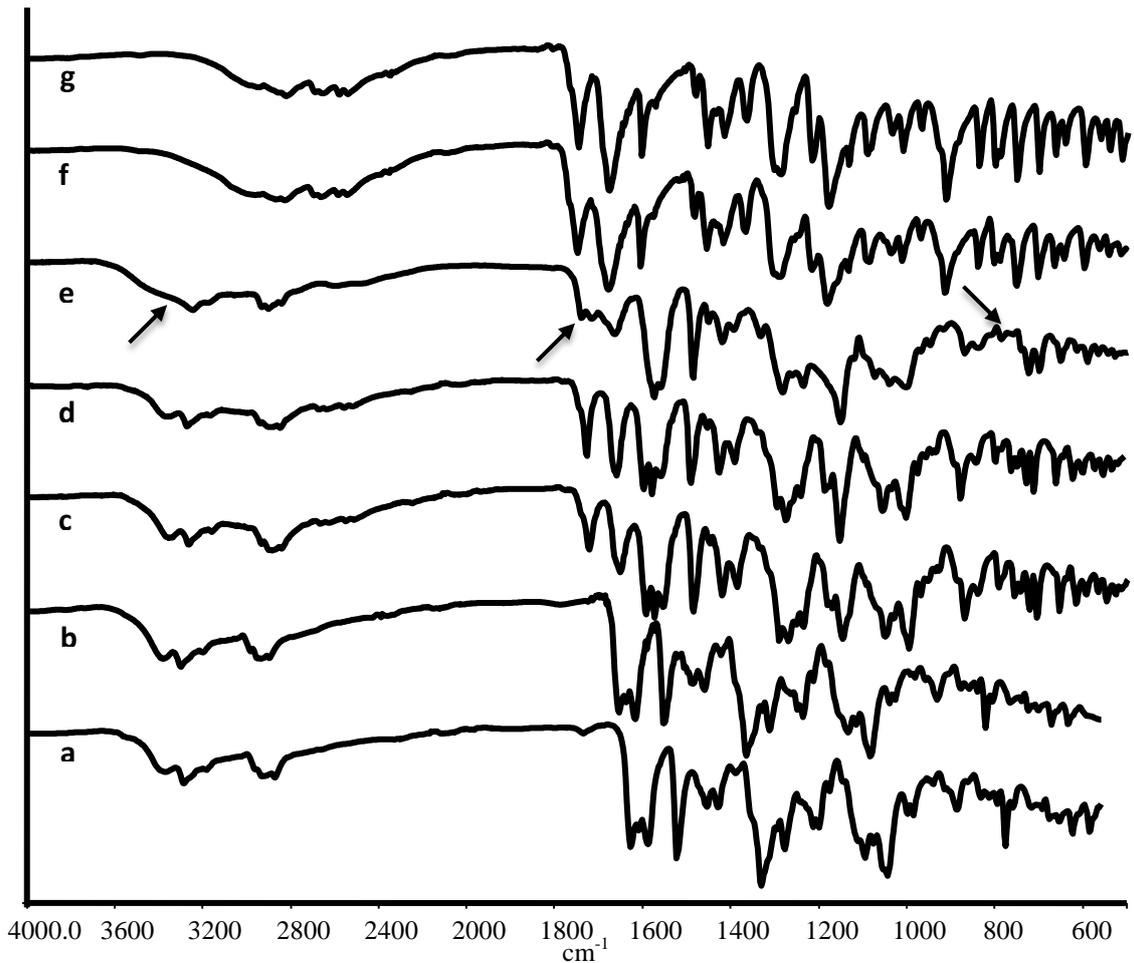


Figure 60 : Spectres IR de Ticagrelor, d'aspirine et de leur mélange ($X_{TIC} = 0,30$) maintenus dans diverses conditions: a) TIC à 25 °C à J0; b) TIC à 100 °C à J7; c) TIC-ASA à 25 °C à J0 ; d) TIC-ASA à 25 °C à J7; e) TIC-ASA à 100 °C à J7 ; f) ASA à 100 °C à J7; g) ASA à 25 °C à J0 (Les flèches indiquent des changements dans les spectres après exposition à haute température).

Tableau 23 : Spectres FT-IR des APIs purs de Ticagrelor, d'Aspirine ainsi que de leur mélange physique (m:m) après 7 jours d'exposition à 25 °C et à 100 °C.

Ticagrelor ^[a] (cm ⁻¹)	Aspirin ^[a] (cm ⁻¹)	TIC-ASP (w/w) 25°C	TIC-ASA (w/w) 100 °C	Assignements ^[1,2]
3365		3365	-	ν_{O-H}
3288		3288	3288	ν_{N-H}
2910		2910	2910	ν_{C-H} (ring) ; thio-alkyl side chain
1622		1623	1623	$\nu_{C=C}$ (ring) ; $\nu_{C=N}$ (ring)
1584		1584	1584	
1519		1519	1519	
1450		1450	1450	def C-OH
1423		1423	1423	def C-OH
1326		1326	1326	ν_{C-N}
1272		1273	1273	ν_{C-F}
1194		1186	1186	
1089		1091	-	
1037		1038	1038	
	3000-2500	3000-2500	3000-2500	ν_{C-H} (ring)
	2990	2990	-	ν_{O-H}
	1748	1748	1748	$\nu_{C=O}$ (-C(O)OCH ₃)
	1678	1682	-	$\nu_{C=O}$ (-C(O)OH)
	1604	1605	1605	$\nu_{C=C}$ (ring)
	1483	1483	-	
	1455	1455	1455	
	1417	1422	1422	
	1367	1367	-	ν_{C-OH} (-C(O)OH)
	1291	1291	-	ν_{C-OH} (-C(O)OH)
	1181	1186	1186	

[a] : Aucun changement observé sur les profils IR des APIs pures de TIC et ASA après 7 jours d'exposition à 25 et 100 °C.

[1] Binev *et al.*, 1996 ; [2] Larkin, 2011

VIII. La dégradation des mélanges TIC-ASA en analyse thermogravimétrique

Pour élucider davantage le processus de dégradation de TIC et ASA, les mélanges et les composés purs ont été étudiés par analyse thermogravimétrique (ATG). Les courbes de TG d'ASA et du TIC sous atmosphère d'azote sont présentées à la [figure 61](#). Pour ASA, sa fusion est suivie directement de deux pertes de masse successives. La première perte de masse est le résultat de la séparation entre l'acide salicylique et l'acide acétique avec une formation possible de CO et de CO₂ observée dans nos précédents résultats. Cette première perte est probablement

accompagnée de la formation de polymères ASA précédemment décrits [Edna *et al.*, 2004]. La deuxième perte de masse est due à l'évaporation / pyrolyse de ce polymère.

Il ressort clairement de la courbe TG du TIC pur qu'il est beaucoup plus stable que l'ASA, car sa perte de masse ne démarre pas avant 300 °C environ, bien loin au-delà de sa température de fusion. Cette résistance à la température élevée s'explique par la structure chimique de TIC, qui consiste en un noyau nucléoside de purine, connu pour sa résistance thermique élevée [Wang *et al.*, 2015]. En outre, d'autres groupements fonctionnels tels que le cycle aryle, OH et NH, présents dans la structure du TIC peuvent contribuer à la forte résistance thermique. Ces deux derniers sont susceptibles également de former de fortes liaisons hydrogènes intermoléculaires qui sont difficiles à casser [Mohamed *et al.*, 2016].

Des mélanges de fraction molaire de TIC ($X_{TIC} = 0,3, 0,4$ et $0,8$) ont été soumis aux mesures TG. Comme illustré avec la [figure 61](#), les profils des pertes de masse des trois mélanges se trouvent entièrement encadrés par les deux extrêmes définis par le comportement de TIC pur et de l'ASA pur. Il ne semble pas y avoir des preuves évidentes d'une interaction entre l'ASA et le TIC dans ces mélanges. En effet, les courbes d'ATG obtenues ne sont en grande partie que la somme des courbes des composés purs. Apparemment, la fraction acétyle, qui, dans les essais de stress, a joué un rôle important dans la dégradation du TIC, n'a plus la possibilité d'interagir avec le TIC. Cela pourrait être plutôt logique quand on se rend compte que le point d'ébullition de l'acide acétique est de 118 °C, ce qui implique que la molécule et ses dérivés s'évaporent rapidement dans l'expérimentation TG. Cela contraste nettement avec les résultats précédents, où la température était constamment inférieure à 118 °C et les mélanges étaient dans des récipients scellés. Dans le cas de l'expérience TG, l'acide acétique se formera autour de 100 °C à la température eutectique, avec la formation de liquide et, ensuite, en 2 min, la température aura atteint 120 °C, entraînant une évaporation rapide de l'acide acétique du mélange.

Par conséquent, il ressort clairement des résultats précédents que la dégradation de l'ASA en acide salicylique et en acide acétique est au cœur de la dégradation du TIC, lorsqu'ils sont mélangés. Cela confirme également les résultats des vitesses de réaction, ce qui semble dépendre principalement de la décomposition de l'ASA.

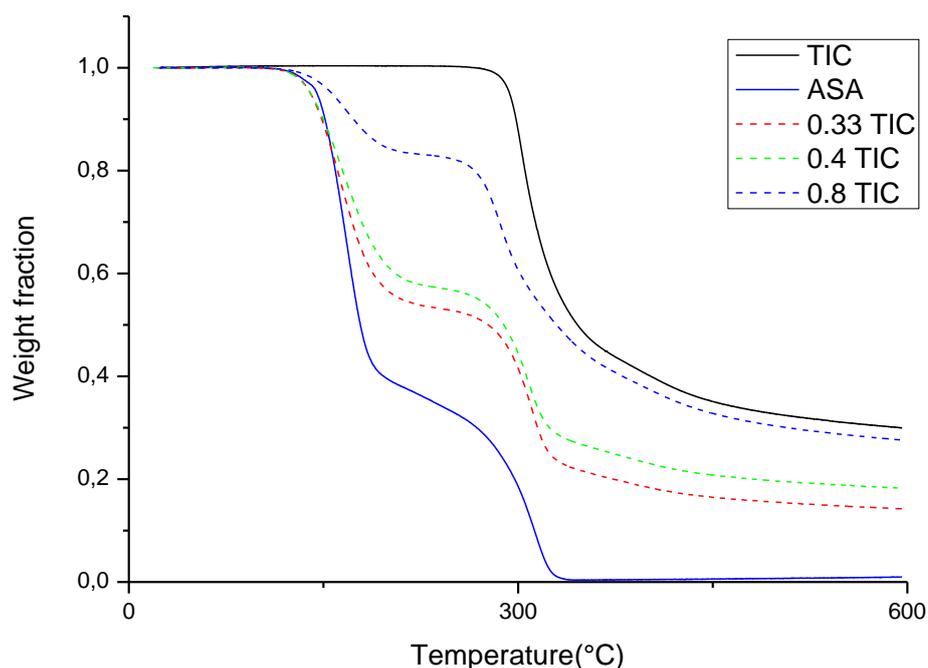


Figure 61 : Courbes d'analyse thermogravimétrique du Ticagrelor, d'Aspirine et de plusieurs de leurs mélanges sous atmosphère inerte.

IX. Conclusions et implications pharmaceutiques des interactions

L'exemple du polymorphisme du ritonavir montre toute la place de l'approche QbD dans toutes les étapes de conception du médicament, plus particulièrement la complexité des études à l'état solide. La difficulté de l'approche est encore plus grande quand il s'agit d'associations d'APIs, chacun pouvant présenter plusieurs polymorphes, qu'ils soient connus ou susceptibles de se former en fonction de leurs nouveaux environnements. Dans ce cadre strict et restrictif de mise en place des études, le diagramme de phases composition en fonction de la température a été construit pour la forme II de TIC et la forme I d'ASA. Il a été démontré à travers le diagramme de phase eutectique et la courbe de Tammann que les interactions physiques entre les deux API à l'état solide sous la forme de co-cristaux semblent être absentes et que la présence des solutions solides paraît très limitée car la courbe de Tammann arrive à une différence d'enthalpie de zéro aux concentrations des produits purs (0 et 1 respectivement). Le mélange cristallin de TIC et ASA

semble être stable à température ambiante pendant au moins un an, mais la formation d'acide acétique provenant de l'ASA doit être évitée. Nous avons clairement démontré que c'est l'un des principaux produits qui cause la dégradation du TIC, en présence d'aspirine. La caractérisation par LC-HR-MSⁿ des produits de dégradation et d'interaction (DP / IP) a révélé une forte interaction entre les sites donateurs et accepteurs des deux APIs. Le mécanisme principal de la dégradation du TIC impliquait un mécanisme de dégradation par N-déalkylation comme en témoignent les produits formés à partir des produits d'interaction entre l'aspirine et le ticagrelor.

Bien que le concept de polypill présente de nombreux avantages en matière d'observance thérapeutique du patient [Wiley *et al.*, 2014], des procédés de fabrication ou de stockage inappropriés peuvent entraîner une instabilité chimique et compromettre l'efficacité et la sécurité du médicament. Par exemple, même à température ambiante, ASA peut subir une hydrolyse catalysée par l'humidité [Carstensen *et al.*, 1988] et être à l'origine d'une dégradation du mélange TIC-ASA. En outre, les interactions TIC-ASA génèrent des produits hydrophiles (DP) et lipophiles (IP), qui modifient la pharmacocinétique et la pharmacodynamique du médicament et réduisent ainsi son activité [Springthorpe *et al.*, 2007]. En outre, tout comme cela a été évoqué dans le chapitre précédent, la dégradation induite par l'aspirine sur le ticagrelor génère des produits de N-déalkylation qui peuvent compromettre la sécurité d'utilisation du produit.

Article 3 : Investigating therapeutic usage of combined Ticagrelor and Aspirin through solid-state and analytical studies

European Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 107, 30 September 2017, Pages 62-70

Hassane Sadou Yayé, Ivo B. Rietveld, Maria Barrio, Philippe-Henri Secrétan, Antoine Faucheron, Maher Karoui, Patrick Tilleul, Najet Yagoubi, Bernard Do



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps



Investigating therapeutic usage of combined Ticagrelor and Aspirin through solid-state and analytical studies



Hassane Sadou Yayé^{a,b,*}, Ivo B. Rietveld^{c,d}, Maria Barrio^{e,f}, Philippe-Henri Secrétan^a, Antoine Faucheron^b, Maher Karoui^a, Patrick Tilleul^b, Najet Yagoubi^a, Bernard Do^{a,g}

^a Université Paris Sud, UFR de Pharmacie, UA 401 « Matériaux et Santé », 5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

^b Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Department of Pharmacy, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

^c University of Paris-Descartes, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Physical Chemistry, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

^d Normandie Université, Laboratoire SMS, EA 3233, Université de Rouen, F76821 Mont Saint Aignan, France

^e Grup de Caracterització de Materials, Departament de Física, EEBE, Universitat Politècnica de Catalunya, Campus Diagonal-Besòs, Av. Eduard Maristany 10-14, 08019 Barcelona, Catalonia, Spain

^f Barcelona Research Center in Multiscale Science and Engineering, Av. Eduard Maristany, 10-14, Barcelona 08019, Spain

^g Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe hospitalier Henri Mondor, Department of Pharmacy, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Dual antiplatelet therapy
Interaction/degradation products
Physico-chemical characterization
Polypill
Preformulation
Ticagrelor
Solid-state

ABSTRACT

The mainstay treatment for patients with acute coronary syndrome is an oral route dual antiplatelet therapy with a P2Y₁₂-receptor antagonist and Aspirin (ASA). To improve patient adherence to such treatments, combination therapies (polypill) are envisioned. Physicochemical solid-state studies have been carried out to develop a preformulation strategy of ASA with the P2Y₁₂-receptor antagonist Ticagrelor (TIC). The investigations were carried out using differential scanning calorimetry, liquid chromatography-high resolution-multistage mass spectrometry (LC-HR-MSⁿ) and as complementary techniques Fourier transform infrared measurements and thermogravimetric analysis. A simple eutectic transition at 98 °C with a mole fraction for the eutectic liquid of 0.457 has been observed and the mixing of ASA and TIC molecules in each other's crystal structures appears to be limited. No cocrystals of TIC and ASA have been found. The appearance of the eutectic liquid was linked with a clear onset of chemical instability of the two pharmaceuticals. The decomposition mechanism in the liquid phase involves prior decomposition of ASA, whose residues react with well-identified TIC interaction sites. Seven interaction products were observed by LC-HR-MSⁿ linked to corresponding degradation products. The most important degradation pathway is N-dealkylation. In conclusion, polypills of ASA and TIC are a viable approach, but the decomposition of ASA should be avoided by eliminating high temperatures and high humidity.

**Poster : Solid - liquid states interaction/degradation studies of
Ticagrelor - acetylsalicylic acid combination by using sophisticated
hyphenated techniques**

Journées d'Étude des Équilibres entre Phases (JEEP), Paris, 23 - 25 Mars 2016.

Hassane Sadou Yayé, Ivo B.Rietveld, Najet Yagoubi, Bernard Do

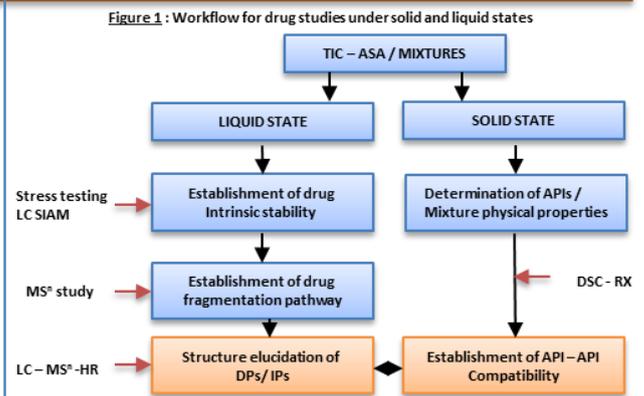
Solid – liquid states interaction/degradation studies of Ticagrelor – acetylsalicylic acid combination by using sophisticated hyphenated techniques

Introduction : Dual antiplatelet therapy, composed of aspirin (ASA) plus a P2Y₁₂-receptor antagonist such as ticagrelor (TIC), is the mainstay of treatment for patients with acute coronary syndrome (ACS).

No study so far has been reported on the physicochemical characterization of ASA – TIC drug substances. Hence, in view of the importance of such combination for the long-term treatment of ACS, the goal of this study was to apprehend the physicochemical properties of ASA – TIC drugs substances combination, through: (a) the thorough understanding of the solid state chemistry of the APIs and their combinations, and b) the characterization of the degradation products generated with the drug combination under photolysis, via LC–HR – MSⁿ studies.

Materials and Methods

- Ticagrelor and Acetylsalicylic acid standards were provided from Interchim®
 - Two complementary studies were conducted (Fig. 1):
- Liquid state approach:**
- The intrinsic stability of each drug was assessed according to ICH guidelines : Hydrolysis, Photolysis (1.50 W/m² for 4 h), thermolysis (80°C / 21 days) and oxidation (0.3% for 4h)
 - TIC – ASA (1:1) mixtures were studied under photolysis stress condition
 - Development of Stability-Indicating Assay Method (SIAM) performed to detect the drugs and their related degradation (DPs)/interaction (IPs) products. LC was run in gradient mode : B 15 % v/v from 0 to 2 min; B 15 % to 100 % v/v from 2 to 17 min; B 5 % v/v from 17 to 25 min with a fixed level from 22 to 25 min; column C18, 250 mm x 4 mm x 5 µm. The flow-rate was set at 0.8 mL min⁻¹.
 - MSⁿ – HR and LC – MSⁿ – HR were performed to determine the fragmentation pattern of the drug and the structure elucidation of DPs/IPs respectively.
- Solid state investigation:** DSC was used, at the rate of 10 K min⁻¹ in a dynamic inert N₂ atmosphere and intended for:
- The determination of physical properties of mixtures with mol-fractions from 0 to 1 TIC – ASA (enthalpy and temperatures of transitions)
 - The solidus – liquidus equilibrium studies of binary mixtures



Results and Discussion

LIQUID STATE APPROACH

Ticagrelor intrinsic stability:

- A previous study revealed the strong sensitivity of Ticagrelor to light and oxidative stress conditions, along with 9 DPs highlighted [1].

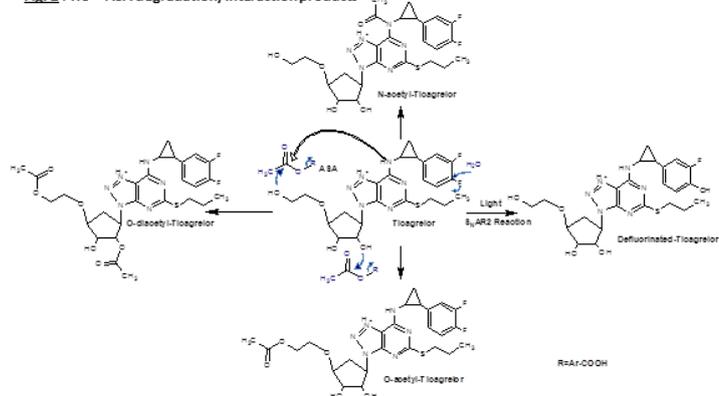
DPs/IPs structures and mechanistic explanation:

- Based on TIC fragmentation pattern [1], TIC – ASA mixture generated under light condition:

- **3 main IPs:** N-acetyl, O-acetyl and O-diacetyl-TIC due to the nucleophilic attack of the secondary nitrogen / alcohol of TIC on the electro-deficient carbon of carbonyl of ASA (Fig. 2)

- **1 DP:** defluorination under light by addition – elimination mechanism (S_NAR2) was advanced to explain DP1 generation, outlined in Fig. 2.

Fig. 2 : TIC – ASA degradation/interaction products

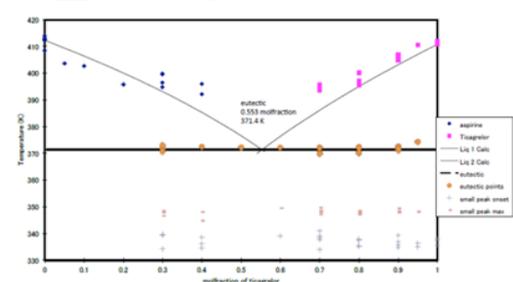


SOLID STATE APPROACH

- Conversely to the chemical behavior of the mixture, the binary phase diagram obtained by DSC does not reveal any physical interaction.
- The temperature / enthalpy of fusion of the pure substances were found at 137.97 °C/180 J.g⁻¹ and 139.01 °C/ 73,4 J.g⁻¹, respectively for TIC and ASA.
- A simple eutectic highlighted (Fig. 3):
 - Liquidus temperature t_{eut} = 97.85 °C
 - Molfraction of TIC in the eutectic point = 0.553

High eutectic temperatures are interesting for formulation strategies, especially to avoid formation of the eutectic liquid during compaction. However, it is still necessary to verify the absence of chemical degradation during the DSC measurements as certain thermal behavior of the samples is not yet understood.

Fig. 3 : Binary phase diagram of the system TIC – ASA



Conclusion

- Understanding drug intrinsic stability and drug – drug physico-chemical interactions are mandatory to implement appropriate quality measures
- Further RX experiments is needed to support our preliminary results
- Liquid – solid states compatibility assessment is a starting point for future TIC – ASA polypill, expected to enhance patient adherence to treatment

Conclusion générale et perspectives

“He who loves practice without theory is like the sailor who boards ship without a rudder and compass and never knows where he may cast ” Leonardo da Vinci

Conclusion générale et perspectives

L'évaluation de la sécurité et de l'efficacité du médicament ne se limite pas à l'étape de conception, mais s'inscrit dans une démarche de surveillance continue tout au long de son cycle de vie. Conscientes des difficultés de recueil des données et de mise en place pratique des travaux de recherche sur le médicament, les agences de régulation de par le monde s'accordent sur la nécessité d'étendre l'espace de connaissances des médicaments afin de garantir l'efficacité et la sécurité d'emploi : les certitudes d'aujourd'hui ne seront forcément pas celles de demain au fur et à mesure des avancées technologiques et scientifiques. A cet égard, la réglementation fournit les grandes lignes de tenue des études, cependant les spécifications techniques de mise en œuvre expérimentale relèvent de l'approche scientifique. L'approche de la « qualité par la conception » (QbD) est un outil performant qui permet de mieux comprendre les variables des méthodes et de définir des paramètres robustes tout au long du cycle de vie du médicament.

Dans le cadre de ce travail, le plan d'expérience mis en place pour étudier le ticagrelor a permis d'évaluer sa stabilité intrinsèque, de caractériser ses produits de dégradation et de proposer les principales voies de sa dégradation ([Chapitre 3](#)). Dans cette démarche, les méthodes analytiques ont joué un rôle central dans le développement d'une méthode indicatrice de stabilité pour la séparation de mélanges complexes avec de bonnes résolutions (CLHP), et l'élucidation structurale des produits de dégradation grâce aux prouesses de la spectrométrie de masse de haute résolution (HR – MS). Ce travail a permis de mettre en évidence 8 nouveaux produits de dégradation. Bien que mis en évidence dans les conditions ICH, ils n'ont jamais été décrits dans la littérature ni dans aucune monographie. Ces nouvelles données devraient permettre à l'industriel fabricant de revoir sa stratégie d'études de stabilité post commercialisation, aujourd'hui exigée par la réglementation, en définissant des nouvelles spécifications fondées sur la science et le risque.

L'étude des principes actifs est globale, faisant appel à des approches multiples. Raison pour laquelle les études d'interaction / compatibilité entre principes actifs pharmaceutiques requièrent une batterie de tests complémentaires, souvent en couplage non seulement pour la caractérisation des propriétés physico-chimiques des APIs mais aussi pour les études des associations d'APIs (LC-MS, HPLC-RMN,

RX, ATG, DSC, IR, etc.) (Chapitre 4). Il a été démontré dans ce dernier chapitre que la stabilité du ticagrelor est intimement liée à son environnement immédiat. Nous avons clairement mis en évidence l'existence d'une interaction entre l'aspirine et le ticagrelor. Ces informations peuvent être utilisées dans des stratégies de R&D et être une source d'opportunité notamment pour le développement d'une thérapie combinée. Il est clair que la recherche scientifique est indispensable pour fournir des informations pertinentes pour la préformulation de ces 2 APIs au regard de leurs comportements physico-chimiques différents. A cet égard, il est pertinent, en perspective, d'étudier ces interactions au sein d'un système ternaire associant le ticagrelor, l'aspirine et l'eau, plus en adéquation avec les conditions réelles.

En outre, la connaissance des voies de dégradation du ticagrelor et de son interaction avec l'aspirine pourraient avoir une grande portée scientifique en servant plus tard aux fabricants de médicaments génériques et constituent un gain de temps en R&D en les affranchissant de ces études.

De même, les connaissances acquises grâce à la compréhension sur la structure des produits de dégradation et les voies de dégradation du ticagrelor (seul ou en association avec l'aspirine) constituent le fondement d'une stratégie de contrôle. Cela a été démontré à travers l'évaluation toxicologique *in silico* des produits de dégradation et la proposition des mesures appropriées pour éviter la décomposition du ticagrelor en présence de l'aspirine. Ce travail a clairement anticipé le principe développé par les ICH Q12 paru en 2017 à l'état de draft pour consultation publique, donnant des lignes directrices sur la gestion du cycle de vie des médicaments au-delà de l'AMM.

Enfin, ce travail peut servir à alimenter des bases de données et être le point de départ d'une nouvelle étude consistant à évaluer l'impact écotoxique du Tic et de ses produits de dégradation, comme polluants, vis-à-vis de l'environnement. Ceci fait écho à la mise en évidence de toxicités potentielles de certains produits de dégradation supérieures à la molécule mère à quantités équivalentes. Ces dernières décennies ont été marquées par l'émergence des polluants médicamenteux en raison de la demande croissante des produits de santé dans la prise en charge des maladies humaines et animales. Ces derniers sont des substances actives dotées de mécanismes d'action spécifiques. Leur persistance dans l'environnement et leur présence dans les eaux de surface et même l'eau potable peut constituer un danger

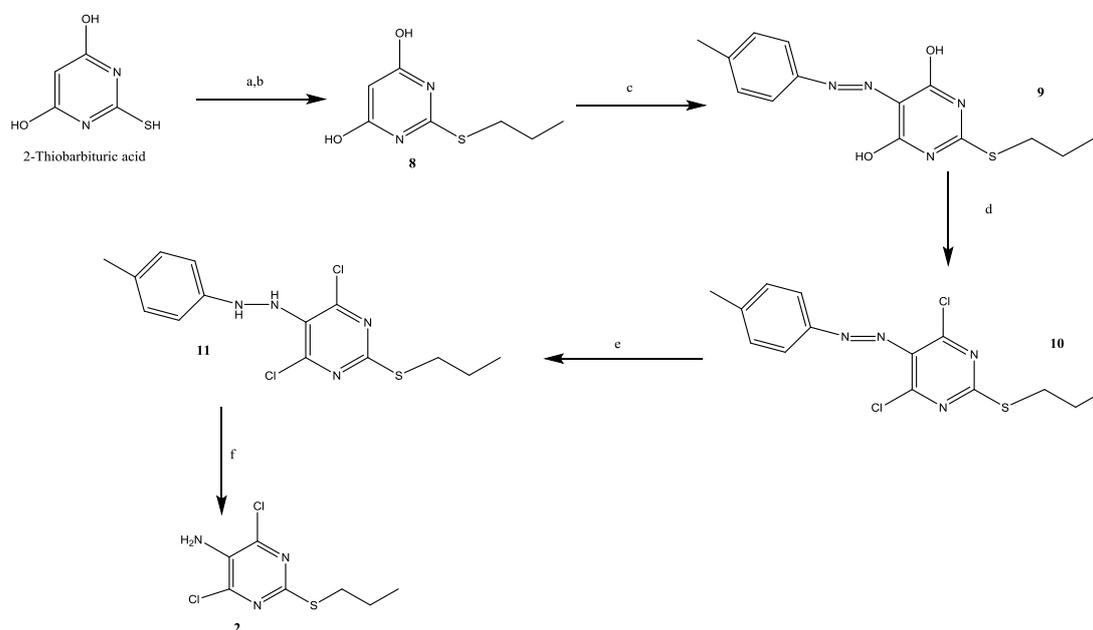
pour l'homme et l'écosystème [Bottoni *et al.*, 2010 ; Li, 2014 ; Kuo *et al.*, 2017]. Malgré les avancées scientifiques sur les méthodes d'analyse, l'évaluation des conséquences de ces polluants sur l'homme et l'écosystème reste encore à un stade embryonnaire.

A cet effet, les premiers résultats d'une étude simulant l'oxydation photocatalytique du ticagrelor en milieu hétérogène aqueux en présence du système UV / TiO₂ (0,4 W/m² / 0,5 mg/mL) [De Heredia *et al.*, 2001], montrent entre autres, l'apparition de produits de dégradation par N-déalkylation, ce qui est conforme au regard de sa grande sensibilité à la photolyse directe. Une compréhension des mécanismes de décomposition dans l'environnement permettra de mettre en place les mesures appropriées pour le recyclage du ticagrelor.

ANNEXES

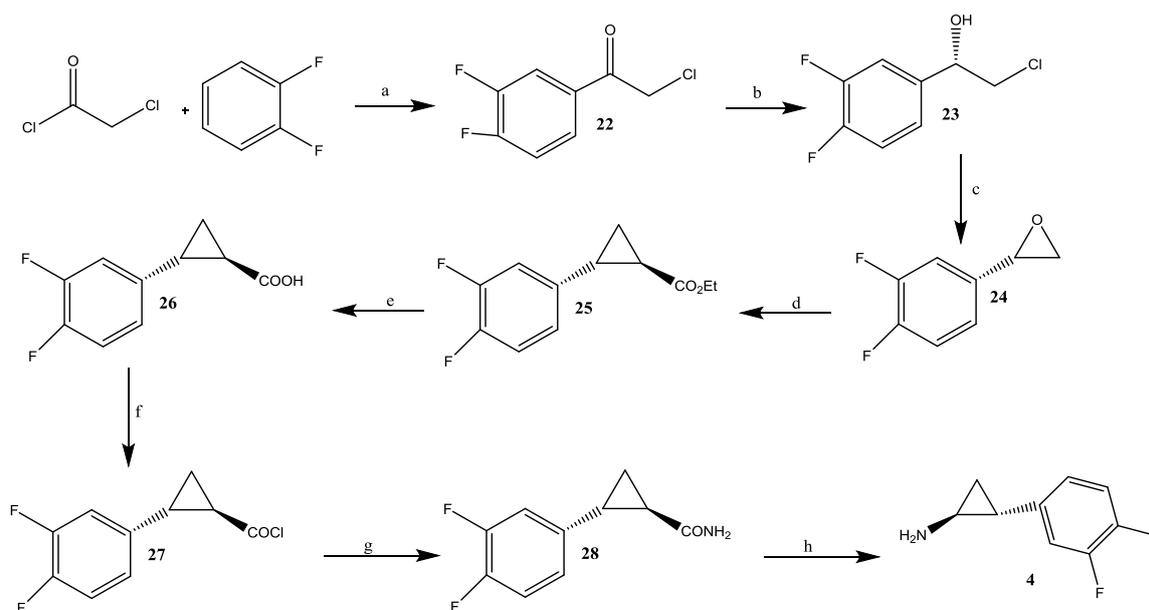
Annexe 1 :

1-Intermédiaire de synthèse du ticagrelor : synthèse du dérivé dichloro-pyrimidine



Réactifs et conditions: (a) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$, NMP; NaOH, H_2O ; (b) HCl; (c) p-toluidine NaNO_2 , H_2SO_4 , éthanol, H_2O 0°C ; (d) POCl_3 , pyridine, toluène, 90°C ; (e) Zn, HCOONH_4 , méthanol; (f) Raney-Ni, H_2 , méthanol.

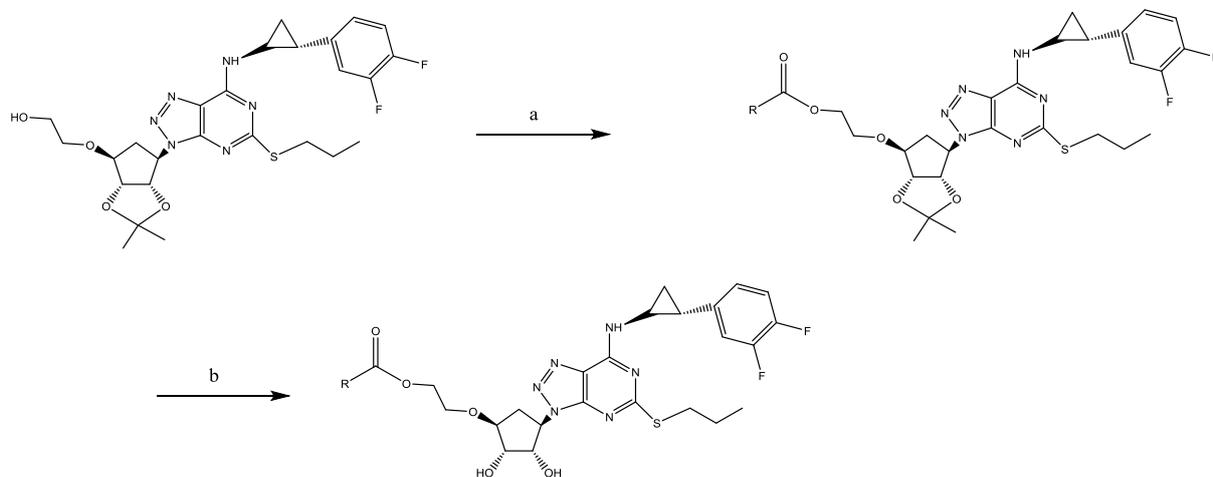
2- Intermédiaire de synthèse du ticagrelor : synthèse de l'amino-alcool



Réactifs et conditions: (a) AlCl_3 , 60°C ; (b) $\text{BH}_3\text{-Me}_2\text{S}$, (S)-DPPM, $\text{B}(\text{OCH}_3)_3$, toluène; (c) NaOH, H_2O , toluène, 40°C ; (d) t-BuOK, triethyl phosphonoacétate, toluène, $60\text{-}80^\circ\text{C}$; NaOH, méthanol, H_2O , 65°C ; (f) SOCl_2 , 35°C ; (g) ammoniac, H_2O ; (h) NaOH, NaOCl, H_2O , 40°C . (Modifié d'après Zhang *et al.*, 2012)

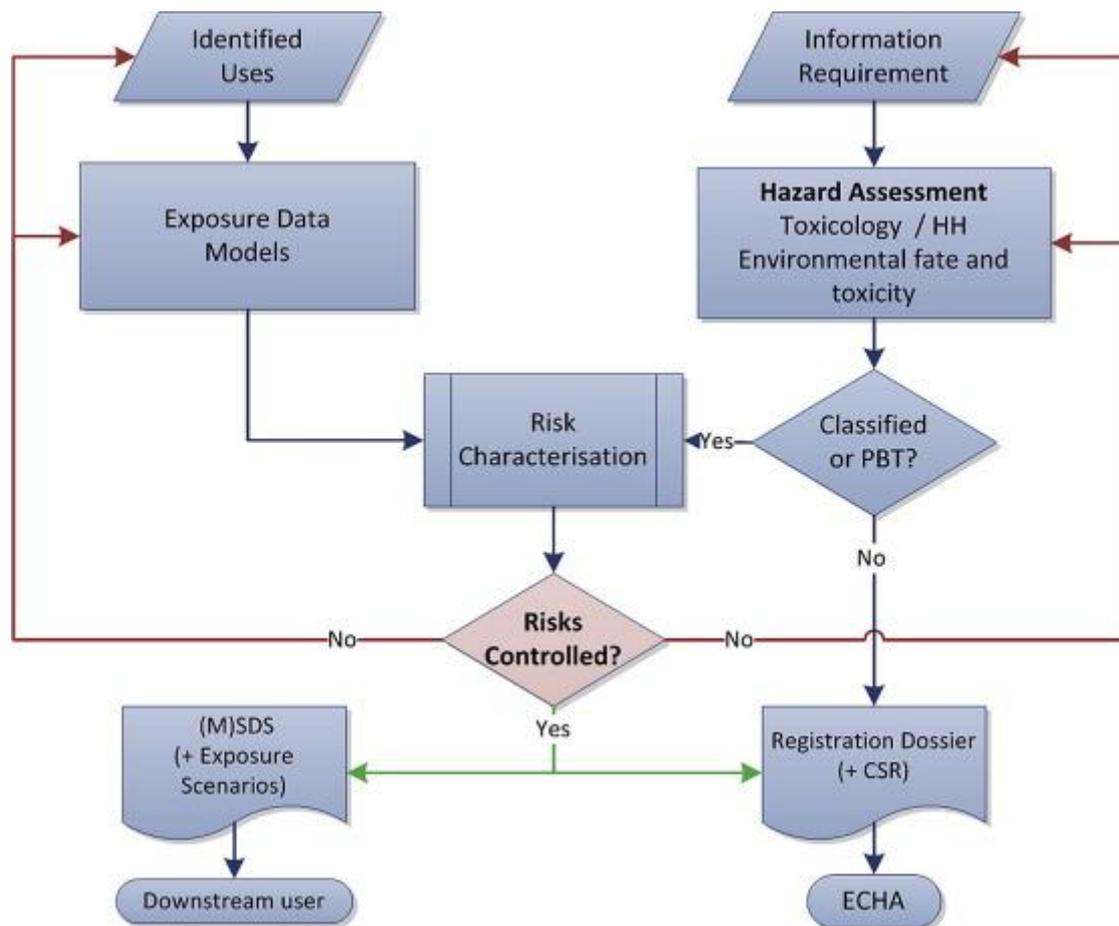
Annexe 2 :

Protection et déprotection des alcools secondaires du ticagrelor



Réactifs et conditions: (a) ROCl, ROCOCl ou anhydrides, TEA, acétonitrile; (b) 1.0% d'iode dans du méthanol (w/v), 60°C.

Annexe 3 :



The basic reach registration process per substance [EU, 2006; Penman *et al.*, 2015]

Annexe 4 :

Decision matrix for combining the output of two *in silico* systems (OOD: Out of domain, UF: Unclassified features).

Expert System	Statistical QSAR system	Comment
Positive	Positive	Most likely positive. Strong evidence from expert assessment might turn into Class 4.
Negative	Negative	Most likely negative. Expert review should support this conclusion.
Positive	Negative	Most likely positive. Strong evidence from expert assessment might turn into Class 4.
Negative	Positive	Most likely positive. Strong evidence from expert assessment might turn into Class 4.
Positive	OOD or Indeterminate	Most likely positive.
Negative	OOD or Indeterminate	Most likely negative. The absence of bacterial mutation alerts in the QSAR system together with the negative call in the expert system may be sufficient for a negative mutagenicity prediction (in most cases).
OOD / UF	Positive	Most likely positive.
OOD / UF	Negative	Inconclusive. Most likely negative but insufficient to provide a negative prediction.

Références bibliographiques

Being a candle is not easy; in order to give light one must first burn. – Rumi

Références bibliographiques

A

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 2006; 58:281–341. [PubMed: 16968944].

Abraham MH, Ibrahim A, Zissimos AM. Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements. *J Chromatogr A.* 2004 May 28; 1037(1-2):29-47.

Al Bakain RZ, Al-Degs Y, Andri B, Thiébaud D, Vial J, Rivals I. Supercritical Fluid Chromatography of Drugs: Parallel Factor Analysis for Column Testing in a Wide Range of Operational Conditions. *J Anal Methods Chem.* 2017;2017:5340601. doi: 10.1155/2017/5340601. Epub 2017 Jun 11.

Alan R. Fersht. Profile of Martin Karplus, Michael Levitt, and Arieh Warshel, 2013 Nobel Laureates in Chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Dec 3; 110(49): 19656–19657. Published online 2013 Nov 25. doi: 10.1073/pnas.1320569110 PMCID: PMC3856823.

Almond HR, Janicki CA Jr. Reaction of Haloperidol with 5 (Hydroxymethyl)-2-Furfuraldehyde, an Impurity in Anhydrous Lactose. *J. Pharm. Sci.* 1974; 63: 41–43.

Alsante K.M., Hatajik T.D., Lohr L.L., et al., Solving impurity/ degradation problems: case studies, in: S. Ahuja, K.M. Alsante (Eds.), *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceutical*, Academic Press, New York, 2003, p. 380.

Alvarez-Segura T, Torres-Lapasió JR, Ortiz-Bolsico C, García-Alvarez-Coque MC. Stationary phase modulation in liquid chromatography through the serial coupling of columns: A review. *Anal Chim Acta.* 2016 Jun 7;923:1-23.

Anderson JL, Adams CD, Antman EM, et al. ACC/AHA 2007 Guidelines for the management of patients with unstable angina/non–ST-elevation myocardial infarction— executive summary. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:652–726.

Andrew R. Johnson, Carrie M. Johnson, Dwight R. Stoll, Mark F. Vitha Identifying orthogonal and similar reversed phase liquid chromatography stationary phases using the system selectivity cube and the hydrophobic subtraction model. *J. Chrom. A*, 1249 (2012) 62– 82. ;

Aptula, A.O. and D.W. Roberts, Mechanistic applicability domains for nonanimal-based prediction of toxicological end points: General principles and application to reactive toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 2006. 19(8): p. 1097-1105.

ASCO Annual Meeting. Three-year overall survival for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in KEYNOTE-001. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr 9503).

Aufdenblatten, R.; Bohlin, M. H.; Hellström, H.; Johansson, P. W.; Larsson, U. G.; Recknagel, M.; Weiss, U. PCT patent application: WO 2010030224, 2010.

Aulton M E, Taylor K. *Aulton's Pharmaceuticals: The Design and Manufacture of Medicines*. Fourth Ed (2013) Churchill Livingstone.

Austin W.E., Holme A.E., Leck J.H., in: Dawson P.H. (Ed.), *Quadrupole Mass Spectrometry and Its Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1976 (Chapter 6).

B

Baillargeon D, Commend S. Un médicament "monstrueux": débats publics et couverture médiatique de la tragédie de la thalidomide au Canada, 1961-1963. *Can Bull Med Hist.* 2016 Spring;33(1):131-53. French.

Baird, L , Banken R, Eichler HG, Kristensen F, Lee DK, Lim JC, Lim R, Longson C, Pezalla E, Salmonson T, Samaha D, Tunis S, Woodcock J, Hirsch G. Accelerated access to innovative medicines for patients in need. *Clin. Pharmacol. Ther.* 96:559–571 (2014).

Bakeev K.A. Process Analytical Technology – Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries. 2nd ed, 2010, Wiley. ISBN 978-0-470-72207-7

Blass BE. Basic Principles of Drug Discovery and Development. ISBN: 978-0-12-411508-8.

Banzi R, Gerardi C, Bertele' V, Garattini S. Approvals of drugs with uncertain benefit-risk profiles in Europe. *Eur J Intern Med* 2015;26:572-84. doi:10.1016/j.ejim.2015.08.008 pmid: 26342723.

Barber C, Amberg A, Custer L, Dobo KL, Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S, Harvey J, Honma M, Kenyon MO, Kruhlak N, Muster W, Stavitskaya L, Teasdale A, Vessey J, Wichard J. Establishing best practise in the application of expert review of mutagenicity under ICH M7. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015 Oct;73(1):367-77. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.07.018. Epub 2015 Aug 4.

Bauer J, et al. (2001). "Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism". *Pharmaceutical Research.* 18 (6): 859–866.

Bercu JP, Morton SM, Deahl JT, Gombar VK, Callis CM, van Lier RB. In silico approaches to predicting cancer potency for risk assessment of genotoxic impurities in drug substances. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010 Jul-Aug;57(2-3):300-6. doi: 10.1016/j.yrtph.2010.03.010. Epub 2010 Apr 2.

Benigni, A. and Bossa, C., Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: A review with implications for predictive toxicology. *Chemical Reviews,* 2011. 111: p2507- 2536.

Benigni, R., Giuliani, A., Franke, R., and Gruska, A. (2000). Quantitative structure-activity relationships of mutagenic and carcinogenic aromatic amines. *Chem.Revs.* 100, 3697-3714.

Bernstein J. Polymorphism in Molecular Crystals 1st Ed. Oxford University Press, USA. ISBN 978–0–19–850605–8 (Hbk.)

Berthod A. Silica: backbone material of liquid chromatographic column packings. *J. Chromatogr.* 549 (1991) 1.

Binev. I.G., Stamboliyska. B.A, Binev. Y.I. The infrared spectra and structure of acetylsalicylic acid (aspirin) and its oxyanion: an ab initio force field treatment. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. Vol. 378, Issue 3, 31 May 1996, Pages 189-197.

Bockaert J. [G-protein coupled receptors. Nobel Prize 2012 for chemistry to Robert J. Lefkowitz and Brian Kobilka]. *Med Sci (Paris)*. 2012 Dec;28(12):1133-7. doi: 10.1051/medsci/20122812026. Epub 2012 Dec 21.

Bond AD, Boese R, Desiraju GR. (2007). On the polymorphism of aspirin, *Angewandte Chemie-International Edition*, 46, pp. 615-617, ISSN:0570-0833.

Bohlin M, Cosgrove S, Lassen B. Crystalline and amorphous form of a triazolo(4,5-d)pyrimidine compound. 2003, Patent US 20030181469 A1.

Borges EM, Collins CH. Effects of pH and temperature on the chromatographic performance and stability of immobilized poly(methyloctylsiloxane) stationary phases. *J. Chromatogr. A*, 1227 (2012), pp. 174-180.

Borges EM, Euerby MR. An appraisal of the chemical and thermal stability of silica based reversed-phase liquid chromatographic stationary phases employed within the pharmaceutical environment. *J Pharm Biomed Anal*. 2013 Apr 15;77:100-15. doi: 10.1016/j.jpba.2013.01.013. Epub 2013 Jan 11.

Bottoni P, Caroli S, Caracciolo AB. Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicol. Environ. Chem.*, 92 (2010), pp. 549-566

Buckley MM, Benfield P. 1993. Eutectic lidocaine/prilocaine cream. *Drugs* 46 (1), 126–151.

Borges EM. How to select equivalent and complimentary reversed phase liquid chromatography columns from column characterization databases. *Analytica Chimica Acta*, Volume 807, 7 January 2014, Pages 143-152.

Boussès C, Ferey L, Vedrines E, Gaudin K. Using an innovative combination of quality-by-design and green analytical chemistry approaches for the development of a stability indicating UHPLC method in pharmaceutical products. *J Pharm Biomed Anal*. 2015 Nov 10;115:114-22. doi: 10.1016/j.jpba.2015.07.003. Epub 2015 Jul 4.

Briois C, Thissen R, Thirkell L, Aradj K, Bouabdellah A, Boukrara A, Carrasco N, Chalumeau G, Chapelon O, Colin F, Coll P, Cottin H, Engrand C, Grand N, Lebreton JP, Orthous-Daunay FR, Pennanech C, Szopa C, Makarov A. Orbitrap mass analyser for in situ characterisation of planetary environments: Performance evaluation of a laboratory prototype. *Planetary and Space Science* 131 (2016) 33-45.

Brittain HG. Spectral methods for the characterization of polymorphs and solvates. *J Pharm Sci.* 1997 Apr;86(4):405-12.

Brittain HG. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, 2nd ed., Informa Healthcare USA, Inc., New York, 2009.

Bundgaard H. Polymerization of Penicillins: Kinetics and Mechanism of Di- and Polymerization of Ampicillin in Aqueous Solution. *Acta Pharma. Suec.* 1976; 13(1): 9–26.

C

Campana JE. Elementary theory of the quadrupole mass filter. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1980, 33, Issue 2, Pages 101-117.

Carr GP, Wahlich JC. A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 1990;8(8-12):613-8.

Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN, Haegele KD, Horning EC. 1975. Atmospheric-pressure ionization mass-spectrometry – Corona discharge ion-source for use in liquid chromatograph mass spectrometer-computer analytical system. *Anal Chem* 47:2369–2373.

Carroll DI, Dzidic I, Horning EC, Stillwell RN. 1981. Atmospheric-pressure ionization mass-spectrometry. *Appl Spectrosc Rev* 17:337–406.

Carstensen JT, Attarchi F. Decomposition of aspirin in the solid state in the presence of limited amounts of moisture II: Kinetics and salting-in of aspirin in aqueous acetic acid solutions. *J Pharm Sci.* 1988 Apr;77(4):314-7.

Carstensen JT, Attarchi F. Decomposition of aspirin in the solid state in the presence of limited amounts of moisture III: Effect of temperature and a possible mechanism. *J Pharm Sci.* 1988 Apr;77(4):318-21.

Caussin M, Mourier W, Philippe S, Capet C, Adam M, Reynero N, Jouini C, Colombier AS, Kadri K, Landrin I, Gréboval E, Rémy E, Marc F, Touflet M, Wirotius F, Delabre N, Le Hiress C, Rorteau V, Vimard M, Dufour M, Tharasse C, Dieu B, Varin R, Doucet J. Crushing drugs in geriatric units: an "handicraft" practice with frequent errors which imposed recommendations. *Rev Med Interne.* 2012 Oct;33(10):546-51. doi: 10.1016/j.revmed.2012.05.014. Epub 2012 Jun 15.

Cheng Y.-F., Walter T.H., Lu Z., Iraneta P., Alden B.A., Gendreau C., Neue U.D., Grassi J.M., Carmody J.L., O'Gara J.E., Fisk R., Hybrid organic–inorganic particle technology: breaking through traditional barriers of HPLC separations, LC–GC *N. Am.* 18 (2000) 1162–1172.

Chernushevich I, Loboda A, Thomson B. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36 (2001), pp. 849–865.

Chester TL, Coym JW. Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy. *J Chromatogr A.* 2003 Jun 27;1003(1-2):101-11.

Claessens HA, van Straten MA, Kirkland JJ. Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 728 (1996), pp. 259-270.

Claessens HA. Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *Trends Anal. Chem.*, 20 (2001), pp. 563-583

Claessens HA, van Straten MA. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography *J. Chromatogr. A*, 1060 (2004), pp. 23-41.

Ciociola AA, Cohen LB, Kulkarni P. FDA-Related Matters Committee of the American College of Gastroenterology. How drugs are developed and approved by the FDA:

current process and future directions. *Am J Gastroenterol.* 2014 May;109(5):620-3. doi: 10.1038/ajg.2013.407.

Čizmić M, Ljubas D, Ćurković L, Škorić I, Babić S. Kinetics and degradation pathways of photolytic and photocatalytic oxidation of the anthelmintic drug praziquantel. *J Hazard Mater.* 2017 Feb 5;323(Pt A):500-512. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.04.065. Epub 2016 Apr 29.

Cohrs, R.J.; Martin, T.; Ghahramani, P.; Bidaut, L.; Higgins, P.J.; Shahzad, A. Translational Medicine definition by the European Society for Translational Medicine. *New Horiz. Transl. Med.* 2014, 2, 86–88.

Colilla S, Crow A, Petkun W, Singer DE, Simon T, Liu X. Estimates of current and future incidence and prevalence of atrial fibrillation in the U.S. adult population. *Am J Cardiol.* 2013 Oct 15;112(8):1142-7. doi: 10.1016/j.amjcard.2013.05.063. Epub 2013 Jul 4.

Collier R. Drug development cost estimates hard to swallow. *CMAJ.* 2009 Feb 3;180(3):279-80. doi: 10.1503/cmaj.082040.

Covey TR, Thomson BA, Schneider BB. Atmospheric pressure ion sources. *Mass spectrometry reviews.* Volume 28, Issue 6, November/December 2009, Pages: 870–897,

Corradini Danilo. *Handbook of HPLC, Second Edition.* CRC Press 2010. Print ISBN: 978-1-57444-554-1. eBook ISBN: 978-1-4200-1694-9.

Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev.* 2009 Jul;109(7):3012-43. doi: 10.1021/cr900019j.

Cragg GM, Newman DJ. A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy. *J Nat Prod.* 2004 Feb;67(2):232-44.

Cramer GM, Ford RA, Hall RL. Estimation of toxic hazard – a decision tree approach. *Food Cosmet Toxicol.* 1978 Jun;16(3):255-76.

Crotti AEM, Carollo C A, Gobbo-Neto L, Santos M D, Gates PJ, Lopes NP. (2006). *LC-Hyphenated Techniques: Uses in the Structural Elucidation of Low and High*

Molecular Weight Compounds, In: Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry, C. A. Taft, pp. 1-43, Signpost Research, ISBN 81-308-0132-9, Kerala, India.

Cutler DM, McClellan M, Is technological change in medicine worth it ?, health affairs, septembre/octobre 2001, pp 11-29.

D

Daemmerich, A. Pharmacopolitics: Drug Regulation in the United States and Germany (Chapel Hill 2004).

Davis C, Lexchin J, Jefferson T, Gøtzsche P, McKee M. "Adaptive pathways" to drug authorisation: adapting to industry? *BMJ*. 2016 Aug 16;354:i4437. doi: 10.1136/bmj.i4437.

De Heredia JB, Torregrosa J, Dominguez JR, Peres JA. Oxidation of p-hydroxybenzoic acid by UV radiation and by TiO₂/UV radiation: comparison and modelling of reaction kinetic. *J Hazard Mater*. 2001 May 30;83(3):255-64.

Dejonghe, J. P.; Peeters, K.; Renard, M. PCT patent application: WO2008018822, 2008.

Dendeni M, Cimetiere N, Amrane A, Hamida NB. Impurity profiling of trandolapril under stress testing: Structure elucidation of by-products and development of degradation pathway. *Int J Pharm*. 2012 Nov 15;438(1-2):61-70. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.08.048. Epub 2012 Sep 1.

Denisov E., Damoc E., Lange O., Makarov A. Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000. *Int. J. Mass Spectrom.*, 325–327 (2012), pp. 80–85.

Desai PM, Vaerenbergh GV, Holman J, Liew CV, Heng PWS. 2015. Continuous manufacturing: the future in pharmaceutical solid dosage form manufacturing. *Pharmaceutical Bioprocessing* 3, 357-360.

DeSesso JM. Future of developmental toxicity testing. *Curr Opin Toxicol*. Vol. 3, April 2017, Pages 1-5.

Diarce G, Gandarias I, Campos-Celador Á, García-Romero A, Griesser UJ. Eutectic mixtures of sugar alcohols for thermal energy storage in the 50–90 °C temperature range. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, Volume 134, March (2015) 215-226.

Diamanti-Kandarakis E , Bourguignon JP , Giudice LC , Hauser R , Prins GS , Soto AM , Zoeller RT , Gore AC 2009 Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 30:293–342.

DiMasi JA, Grabowski HG. The cost of biopharmaceutical R & D: is biotech different? *Manage Decis Econ* 2007; 28: 469 – 79.

DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 2003; 22:151–85.

Dobo KL, Greene N, Fred C, Glowienke S, Harvey JS, Hasselgren C, Jolly R, Kenyon MO, Munzner JB, Muster W, Neft R, Reddy MV, White AT, Weiner S. In silico methods combined with expert knowledge rule out mutagenic potential of pharmaceutical impurities: an industry survey. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2012 Apr;62(3):449-55. doi: 10.1016/j.yrtph.2012.01.007. Epub 2012 Jan 31.

Doman TN, McGovern SL, Witherbee BJ, Kasten TP, Kurumbail R, Stallings WC, Connolly DT, and Shoichet BK (2002) Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. *J Med Chem* 45: 2213–2221.

Dong YD, Boyd BJ. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. *Int J Pharm*. 2011 Sep 30;417(1-2):101-11.

Dow LK, Hansen MM, Pack BW, Page TJ, Baertschi SW. The assessment of impurities for genotoxic potential and subsequent control in drug substance and drug product. *J Pharm Sci*. 2013 May;102(5):1404-18. doi: 10.1002/jps.23462. Epub 2013 Feb 21.

E

Edna MA, Dulce MA, de Moura MFV, de Farias RF. An investigation about the solid state thermal degradation of acetylsalicylic acid: polymer formation, *Thermochim. Acta* 414 (2004) 101–104.

EMA (2004). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), Guideline on the limits of genotoxic impurities, CPMP/SWP/5199/02, London.

Eichler HG, Oye K, Baird LG, Abadie E, Brown J, Drum CL, Ferguson J, Garner S, Honig P, Hukkelhoven M, Lim JC, Lim R, Lumpkin MM, Neil G, O'Rourke B, Pezalla E, Shoda D, Seyfert-Margolis V, Sigal EV, Sobotka J, Tan D, Unger TF, Hirsch G. Adaptive licensing: taking the next step in the evolution of drug approval. *Clin. Pharmacol. Ther.* 91:426–437 (2012).

Eichler HG, Baird LG, Barker R, et al. From adaptive licensing to adaptive pathways: delivering a flexible life-span approach to bring new drugs to patients. *Clin Pharmacol Ther* 2015;97:234-46. doi:10.1002/cpt.59 pmid:25669457.

EMA (2006). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), Guideline on the limits of genotoxic impurities. London, 28 June 2006 CPMP/SWP/5199/02 EMEA/CHMP/QWP/251344/2006.

Engelhardt H, Lobert T. Chromatographic determination of metallic impurities in reversed-phase HPLC columns. *Anal Chem.* 1999 May 1;71(9):1885-92. doi: 10.1021/ac981198x.

Etienne Y, Jobic Y, Frachon I, Fatemi M, Castellant P, Quintin-Roué I. Mitral and aortic valvular disease associated with benfluorex use. *J Heart Valve Dis.* 2011 May;20(3):348-50.

Ettre, LS. Chapters in the evolution of chromatography. Imperial College Press; Distributed by World Scientific, 2008

Evaluate Pharma Alpha World Preview 2014.

Evaluate Pharma report (2009).

EU, 2006. Regulation (EC) no. 1907/2006 of the European Parliament and of the council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European chemicals agency, amending directive 1999/45/ ec and repealing council regulation (EEC) no. 793/93 and commission regulation (EC) no. 1488/94 as well as council directive 76/769/EEC and commission

directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Offic. J. Eur. Union* L396, 1–843.

Euerby MR, Petersson P. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis. *J Chromatogr A*. 2003 Apr 25;994(1-2):13-36.

Euerby MR, Petersson P. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups/amino endcappings using principal component analysis. *J Chromatogr A*. 2005 Sep 23;1088(1-2):1-15.

European Medicines Agency. Pilot project on adaptive licensing, 19 March, EMA/254350/2012. www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2014/03/WC500163409.pdf. Accessed 11 Jul 2016. 2014.

F

FDA Consumer magazine. The 1937 Elixir Sulfanilamide Incident. June 1981 Issue

Fenn JB, Mann M, Mong C.-K. and S.-F. Wong, *Mass Spectrom. Rev.*, 9 (1990) 37.

Ferrer I, Thurman EM (2003). Liquid chromatography/time-of flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. *Trends Anal. Chem.* 22:750–756.

Fodil M, Nghiem D, Colas M, Bourry S, Poisson-Salomon AS, Rezigue H, Trivalle C. Assessment of Clinical Practices for Crushing Medication in Geriatric Units. *J Nutr Health Aging*. 2017;21(8):904-908. doi: 10.1007/s12603-017-0886-3.

Food and Drug Administration. Guidance for industry, PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. 2004. Sep, [Last cited on 2009 Aug 11]

Frachon I, Etienne Y, Jobic Y, Le Gal G, Humbert M, Leroyer C. Benfluorex and unexplained valvular heart disease: a case-control study. *PLoS One*. 2010 Apr 12;5(4):e10128. doi: 10.1371/journal.pone.0010128.

Fuchs VR, Sox Jr HC, Physicians'views of the relative importance of thirty medical innovations, *health affairs*, volume 20, number 5, 2001, 3042.

G

Gana I, Dugay A, Henriët T, Rietveld IB, Bernard M, Guechot C, Teulon JM, Safta F, Yagoubi N, Céolin R, Do B. Degradation pathways study of the natriuretic and β -adrenoceptor antagonist tienoxolol using liquid chromatography-electrospray ionization multistage mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2014 Aug 5;96:58-67. doi: 10.1016/j.jpba.2014.03.016. Epub 2014 Mar 25.

García-Alvarez-Coque MC, Torres-Lapasió JR, Baeza-Baeza JJ. Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 2006 Oct 10;579(2):125-45. Epub 2006 Jul 18.

Garcia T, Cook G, Nosal R. PQLI key topics - criticality, design space, and control strategy. *J Pharm Innov*. 2008;3:60-68.

Gerald N. Wogan, Stephen S. Hecht, James S. Felton, Allan H. Conney, Lawrence A. Loeb. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 14 (2004) 473–486 [2] Robert J. Turesky. Heterocyclic aromatic amines. *Advances in Molecular Toxicology*, Volume 4

Gieger T., Clarke S., Deamidation, isomerization and racemization at asparaginylyl and aspartyl residues in peptides, *J. Biol. Chem*. 262 (1986) 785–794.

Gilroy JJ, Dolan JW, Snyder LR. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. IV. Type-B alkyl-silica columns. *J Chromatogr A*. 2003 Jun 6;1000(1-2):757-78.

Gilroy JJ, Dolan JW, Carr PW, Snyder LR. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. V. Higher metal content (type-A) alkyl-silica columns. *J Chromatogr A*. 2004 Feb 13;1026(1-2):77-89.

Gonsalves G, Zuckerman D. Commentary: Will 20th century patient safeguards be reversed in the 21st century? *BMJ* 2015;350:h1500. doi:10.1136/bmj.h1500 pmid:25814537.

Goodman, M. Market watch: Pharma industry performance metrics: 2007–2012E. *Nature Rev. Drug Discov.* 7, 795 (2008).

Guenet JM. Contributions of phase diagrams to the understanding of organized polymer-solvent systems. *Thermochim Acta.* 1996;284:67–83.

H

Herman C, Haut B, Aerts L, Leyssens T, 2012. Solid–liquid phase diagrams for the determination of the solid state nature of both polymorphs of (RS)-2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-butyramide. *Int. J. Pharm.* 437, 156–161. Herrera LC, Grossert JS, Ramaley L. 2008. Quantitative aspects of and ionization mechanisms in positive-ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *JAmSoc Mass Spectrom* 19:1926–1941.

Hillisch A, Lorenz M, Diekmann S. Recent advances in FRET: distance determination in protein-DNA complexes. *Curr Opin Struct Biol.* 2001 Apr;11(2):201-7.

Hoitink M.A., Beijnen J.H., Boschma M.U.S., Bult A., van der Houwen O.A.G.J., Wiese G., Undreberg W.J., Degradation kinetics of three gonadorelin analogues: developing a method for calculating epimerization parameters, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1449–1455.

Hong H., Xie Q., Ge W., Qian F., Fang H., Shi L., Su Z., Perkins R., Tong W. Mold2, molecular descriptors from 2D structures for chemoinformatics and toxicoinformatics. *J. Chem. Inf. Model.*, 48 (2008), pp. 1337-1344.

Horiuchi S, Ikeda K, Kayashima K, Mizutani K, Ono T. Photo Enhanced Modification of Human Skin Elastin in Actinic Elastosis by N- (Carboxymethyl)lysine, One of the Glycoxidation Products of the Maillard Reaction. *J. Inve. Dermatology.* 1997; 108: 792-802.

Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegele KD, Horning MG, Stillwel RN. 1974a. Atmospheric-pressure ionization (api) mass-spectrometry-Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream. *J Chromatogr Sci* 12:725–729.

Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegele KD, Horning MG, Stillwel RN. 1974b. Liquid chromatograph mass spectrometer-computer analytical systems-Continuous-flow system based on atmospheric-pressure ionization mass-spectrometry. *Chromatogr* 99:13–21.

Horvath CG, Lipsky SR. Use of liquid ion exchange chromatography for separation of organic compounds. *Nature* 211, 748–749, 1966.

Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 40 (2005), pp. 430–443.

Hubert P., Nguyen-Huu J., Boulanger B., Chapuzet E., Cohen N., Compagnon P.A., Dewé W., Feinberg M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Valat L. Validation des procédures analytiques quantitatives: Statistiques, *STP Pharma Pratiques* 16 (2006) 28–58.

Husted S, van Giezen JJ. Ticagrelor: the first reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist. *Cardiovasc Ther.* 2009 Winter;27(4):259-74. doi: 10.1111/j.1755-5922.2009.00096.x.

Husted S, James S, Becker RC, Horrow J, Katus H, Storey RF, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in elderly patients with acute coronary syndromes: a substudy from the prospective randomi-zed PLATelet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2012;5:680–8.

I

ICH M4 – Organisation of The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. M4. 15 juin 2016.

ICH M7 (2014) – ICH M7 – Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_Step_4.pdf.

ICH Q1A – Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonisation of technical requirement for registration of pharmaceuticals for human use, March 2003.

ICH Q1B – Guidance for Industry, Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Product, International Conference on Harmonization. Available at: (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073373.pdf>), 1996.

ICH Q2 (R1) – Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Nov 2005.

ICH Q3A – Harmonised tripartite guideline. Impurities in new drug substances Q3A (R2). 25 October 2006.

ICH Q3B – Harmonised tripartite guideline. Impurities in new drug substances Q3B (R2). 2 June 2006

ICH Q6A – Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances Q6A. October 1999.

ICH Q8 – Pharmaceutical development Q8(R2). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). 2009.

ICH Q9 – Quality risk management Q9. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). 2005.

ICH Q10 – Pharmaceutical quality system Q10. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). 2008.

ICH Q11– Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities), 2012.

ICH Q12 – Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management Q12 – Final Concept Paper, in, 2014.

Issaq HJ, J. Gutiérrez J. Mixed packings in high performance liquid chromatography: II. Mixed packings vs. mixed ligands. J. Liq. Chromatogr., 11 (1988), pp. 2851-2861

J

Jagroop IA, Burnstock G, Mikhailidis DP. Both the ADP receptors P2Y1 and P2Y12, play a role in controlling shape change in human platelets. *Platelets*. 2003; 14:15–20.

Jamrógiewicz M. Consequences of New Approach to Chemical Stability Tests to Active Pharmaceutical Ingredients. *Front Pharmacol*. 2016 Feb 8;7:17. doi: 10.3389/fphar.2016.00017. eCollection 2016.

Jason L. On-Demand eSeminar. Quality by Design for Pharmaceutical Analytical Methods. *Separation Science* 2014.

Johnson AR, Vitha MF, Urness T, Marrinan T. System selectivity cube: a 3D visualization tool for comparing the selectivity of gas chromatography, supercritical-fluid chromatography, high-pressure liquid chromatography, and micellar electrokinetic capillary chromatography systems. *Anal Chem*. 2010 Jul 15;82(14):6251-8. doi: 10.1021/ac101163d.

JO n° 302 du 30 décembre 2011. Loi relative au renforcement de la sécurité sanitaire du médicament et des produits de santé.

JORF n°0149 du 28 juin 2016 texte n° 20 Arrêté du 24 juin 2016 portant approbation de l'avenant n° 10 à l'accord national relatif à la fixation d'objectifs de délivrance de spécialités génériques.

Jorgensen WL. The many roles of computation in drug discovery. *Science*. 2004 Mar 19;303(5665):1813-8.

Ju Young Park In Hwa Lee. Decomposition of acetic acid by advanced oxidation processes, *Korean Journal of Chemical Engineering*, March 2009, Volume 26, Issue 2, pp 387–391.

Kalariya PD, Patel PN, Srinivas R, Talluri MVNK. Quality by design based development of a selective stability-indication UPLC method of dolutegravir and characterization of its degradation products by UPLC-QTOF-MS/MS. *New J. Chem.*, 39 (2015), pp. 6303-6314.

K

Kaldor SW, Kalish VJ, Davies JF, Shetty B V, Fritz JE, Appelt K, et al. Viracept (nelfinavir mesylate, AG1343): A potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease. *J Med Chem.* 1997;40: 3979–3985. doi: 10.1021/jm9704098.

Kaliszan R, van Straten MA, Markuszewski M, Cramers CA, Claessens HA. Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure–retention relationships. *J. Chromatogr. A*, 855 (1999), pp. 455-486.

Khanna I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. *Drug Discov Today.* 2012 Oct;17(19-20):1088-102. doi: 10.1016/j.drudis.2012.05.007. Epub 2012 May 22.

Kauppila TJ, Kostianen R, Bruins AP. 2004. Anisole, a new dopant for atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry of low proton affinity, low ionization energy compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18:808–815.

Kauppila TJ, Kersten H, Benter T. The ionization mechanisms in direct and dopant-assisted atmospheric pressure photoionization and atmospheric pressure laser ionization. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2014 Nov;25(11):1870-81. doi: 10.1007/s13361-014-0988-7. Epub 2014 Sep 24.

Kirkland JJ, Glajch JL, Farlee RD. Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high-performance liquid chromatography column packings. *Anal. Chem.*, 61 (1989), pp. 2-11.

Kim Y, Machida K, Taga T, Osaki K. Structure redetermination and packing analysis of aspirin crystal. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1985 Jul;33(7):2641-7.

Kirsh-Volders, M., et al., The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research*, 1997. 392: p. 19-30.

Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Aug;3(8):711-5. doi: 10.1038/nrd1470.

Konstam MA, Weir MR, Reicin A, Shapiro D, Sperling RS, Barr E, Gertz BJ. Cardiovascular thrombotic events in controlled, clinical trials of rofecoxib. *Circulation*. 2001 Nov 6;104(19):2280-8.

Kroes R, Renwick AG, Cheeseman M, Kleiner J, Mangelsdorf I, Piersma A, Schilter B, Schlatter J, van Schothorst F, Vos JG & Wurtzen G (2004). Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet. *Food and Chemical Toxicology* 42, 65-83.

Kuo HWD, Xagorarakis I. Contaminants Associated with Drinking Water. *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)*, 2017, Pages 148-158.

L

Lahana R. How many leads from HTS? *Drug Discov Today*. 1999;4:447–8.

LaMattina, J.L. (2011) The impact of mergers on pharmaceutical R&D. *Nat. Rev. Drug Discov*. 10, 559–560.

Larkin P. *Infrared and Raman Spectroscopy – Principles and Spectral Interpretation*, 1st Edition, Elsevier 2011.

Le Mapihan K, Vial J, Jardy A. Reversed-phase liquid chromatography testing. Role of organic solvent through an extended set of columns. *J Chromatogr A*. 2005 Sep 23;1088(1-2):16-23.

Le Mapihan K, Vial J, Jardy A. Reversed-phase liquid chromatography column testing: robustness study of the test. *J Chromatogr A*. 2004 Dec 24;1061(2):149-58.

Le Mapihan K, Vial J, Jardy A. Organic solvent effects in reversed-phase liquid chromatography in relation to column testing. *Chromatographia* January 2003, Volume 57, Supplement 1, pp S163–S170.

Lexchin J. Post-market safety warnings for drugs approved in Canada under the Notice of Compliance with conditions policy. *Br J Clin Pharmacol* 2015;79:847-59. doi:10.1111/bcp.12552 pmid:25393960.

Li WC. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.*, 187 (2014), pp. 193-201.

Lichtenberg, F. R. The impact of new drug launches on longevity: evidence from longitudinal, disease-level data from 52 countries, 1982–2001 *Int. J. Health Care Finance Econ.* 5, 47–43 (2005).

Lichtenberg FR, The effect of new drugs on mortality from rare diseases and HIV, Working paper du NBER 8677, décembre 2001.

M

Mackie JC, Doolan KR. High-temperature kinetics of thermal decomposition of acetic acid and its products. *Int Journal of Chemical Kinetics*, Vol 16, Issue 5, May 1984, Pages 525–541.

MAC-MOD Analytica. Comparison Guide to C18 Reversed Phase HPLC Columns. Fourth Edition June 2008.

Majumdar SK. Glimpses of the history of insulin. *Bull Indian Inst Hist Med Hyderabad.* 2001 Jan-Jun;31(1):57-70.

Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*, 72 (2000), pp. 1156–1162.

Makarov A., Denisov E., Kholomeev A., W. Balschun, O. Lange, K. Strupat, S. Horning. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 78 (2006), pp. 2113–2120.

Marchand DH, Croes K, Dolan JW, Snyder LR. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. VII. Cyanopropyl columns. *J Chromatogr A.* 2005 Jan 7;1062(1):57-64.

Marshall AG, Guan S. Advantages of high magnetic field for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 10 (1996) 1819–1823.

Martin YC, Kofron JL, Traphagen LM. Do structurally similar molecules have similar biological activity? *J Med Chem.* 2002 Sep 12;45(19):4350-8.

Mehta S, Shah RP, Singh S. Strategy for identification and characterization of small quantities of drug degradation products using LC and LC-MS: application to valsartan, a model drug. *Drug Test Anal.* 2010 Feb;2(2):82-90. doi: 10.1002/dta.116.

Miller B.L., Hageman M.J., Thamann T.J., Barrón L.B., Schöneich C., Solid-state photodegradation of bovine somatotropin (bovine growth hormone): evidence for tryptophan-mediated photooxidation of disulfide bonds, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 1698–1709,

Mishra V, Siva Prasad CV. Ligand based virtual screening to find novel inhibitors against plant toxin Ricin by using the ZINC database. *Bioinformation.* 2011;7(2):46-51. Epub 2011 Sep 6.

Monfardini C, Veronese FM. Stabilization of substances in the circulation. *Bioconjugate Chem* 1998;9:418-50.

Morisette SL, Soukasene S, Levinson D, Cima MJ, Almarsson O. (2003). "Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (5): 2180–84.

Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 2000. 455: p. 29-60.

Minisci F, Fontana F. Free radicals in oxidation processes, *La Chimica e l'Industria* 80 (1998) 1309–1316.

Mohamed NA, El-Ghany NAA, Fahmy MM. Thermogravimetric analysis in the evaluation of the inhibition of degradation of rigid poly(vinyl chloride) using biologically active phthalimido aromatic hydrazide derivatives. *Polymer Degradation and Stability*, Volume 128, June 2016, Pages 46-54.

Munson MSB, Field FH. *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88 (12), pp 2621–2630. DOI: 10.1021/ja00964a001. *Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction*

Munos, B. (2009) Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat. Rev.*

Drug Discov. 8, 959–968.

Murray, A., Berndt, E. R. & Cutler, D. M. Prescription drug spending trends in the United States: looking beyond the turning point. *Health Affairs* w151–w160, (2008).

Murthy MV, Krishnaiah Ch, Srinivas K, Rao KS, Kumar NR, Mukkanti K. Development and validation of RP-UPLC method for the determination of darifenacin hydrobromide, its related compounds and its degradation products using design of experiments. *J Pharm Biomed Anal.* 2013 Jan;72:40-50.

Myers S, Baker A. Drug discovery-an operating model for a new era. *Nat Biotechnol.* 2001 Aug;19(8):727-30.

N

Naci H, Cylus J, Vandoros S, Sato A, Perampaladas K. Raising the bar for market authorisation of new drugs. *BMJ* 2012;345:e4261. doi:10.1136/bmj.e4261 pmid:22872693.

Narayanam M, Sahu A, Singh S. Characterization of stress degradation products of benazepril by using sophisticated hyphenated techniques. *J Chromatogr A.* 2013 Jan 4;1271(1):124-36. doi: 10.1016/j.chroma.2012.11.044. Epub 2012 Nov 27.

Narayanam M, Sahu A, Singh S. Characterization of stress degradation products of benazepril by using sophisticated hyphenated techniques. *J Chromatogr A.* 2013 Jan 4;1271(1):124-36. doi: 10.1016/j.chroma.2012.11.044. Epub 2012 Nov 27.

Narayanam M, Handa T, Sharma P, Jhajra S, Muthe PK, Dappili PK, Shah RP, Singh S. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 2014 Jan;87:191-217. doi: 10.1016/j.jpba.2013.04.027. Epub 2013 Apr 28.

Nauwelaers G, Bessette EE, Gu D, Tang Y, Rageul J, Fessard V, Yuan JM, Yu MC, Langouët S, Turesky RJ. DNA adduct formation of 4-aminobiphenyl and heterocyclic aromatic amines in human hepatocytes. *Chem Res Toxicol.* 2011 Jun 20;24(6):913-25. doi: 10.1021/tx200091y. Epub 2011 Apr 19.

Nielsen TE, Schreiber SL. Towards the optimal screening collection: a synthesis strategy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(1):48-56.

Nier KA, Yergey AL, Gale PJ. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry. Volume 9 Historical Perspectives, Part B Notable People in Mass Spectrometry.* Elsevier Science. 2015. ISBN: 978-0-08-100379-4.

Nogueira R, Lämmerhofer M, Lindner W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J. Chromatogr. A*, 1089 (2005), pp. 158-169.

O

Oberlies NH, Kroll DJ. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *J Nat Prod.* 2004 Feb;67(2):129-35.

OECD QSAR Toolbox. Available from: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm> 8 August 2017.

Orlandini S, Pinzauti S, Furlanetto S. Application of quality by design to the development of analytical separation methods. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013), pp. 443-450.

Olsen JV, Schwartz JC, Griep-Raming J, Nielsen ML, Damoc E, Denisov E, Lange O, Remes P, Taylor D, Splendore M, Wouters ER, Senko M, Makarov A, Mann M and Horning S (2009). A dual pressure linear ion trap orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol. Cell. Proteomics* 8: 2759–2769.

Ordoñez EY, Quintana JB, Rodil R, Cela R. Computer assisted optimization of liquid chromatographic separations of small molecules using mixed-mode stationary phases. *J. Chromatogr. A*, 1238 (2012), pp. 91-104.

P

Parr MK, Schmidt AH. Life cycle management of analytical methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2017 Jun 17. pii: S0731-7085(17)31221-9. doi: 10.1016/j.jpba.2017.06.020.

Paull KD, Shoemaker RH, Hodes L, Monks A, Scudiero DA, Rubinstein L, Plowman J, Boyd MR. Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of mean graph and COMPARE algorithm. *J Natl Cancer Inst.* 1989 Jul 19;81(14):1088-92.

Patrick J. Sinko, Yashveer Singh. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences.* 6th ed. (2011).

Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Mar;9(3):203-14. doi: 10.1038/nrd3078. Epub 2010 Feb 19.

Penman M, Banton M, Erler S, Moore N, Semmler K. Olefins and chemical regulation in Europe: REACH. *Chem Biol Interact.* 2015 Nov 5;241:59-65. doi: 10.1016/j.cbi.2015.04.001. Epub 2015 Apr 7.

Pérez S, Eichhorn P, Barceló D. Applications of Time-of-Flight and Orbitrap Mass Spectrometry in Environmental, Food, Doping, and Forensic Analysis. *Comprehensive Analytical Chemistry Volume 71.* Elsevier, 2016. ISBN: 978-0-444-63572-3

Perry RH, Cooks RG, Robert JN. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 2008, 27, 661– 699.

Pesek JJ, Matyska MT. A new approach to bioanalysis: aqueous normal phase chromatography with silica hydride stationary phases, *Bioanalysis* 4 (2012) 845–853.

Pesek JJ, Matyska MT, Boysen RI, Yang Y, Hearn MTW. Aqueous normal phase chromatography using silica-hydride-based stationary phases, *Trends Anal. Chem.* 42 (2013) 64–73.

Pharma Industry Merger and Acquisition Analysis 1995 to 2015. Available online: <http://revenuesandprofits.com/pharma-industry-merger-and-acquisition-analysis-1995-2015/> (accessed on 05 September 2017).

Poehlauer P, Manley P, Broxterman R, Gregertsen B, Ridemark M. Continuous processing in the manufacture of active pharmaceutical ingredients and finished dosage forms: an industry perspective. *Org. Process Res. Dev.*, 2012, 16 (10), pp 1586–1590. DOI: 10.1021/op300159y.

Pouchard A. Affaire du Mediator : le point si vous avez raté un épisode. *Le Monde* | 12.12.2012

Q

Qiao X, Zhang L, Zhang N, Wang X, Qin X, Yan H, Liu H. Imidazolium embedded C8 based stationary phase for simultaneous reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography. *J Chromatogr A*. 2015 Jun 26;1400:107-16. doi: 10.1016/j.chroma.2015.04.060. Epub 2015 May 6.

Quittmann, W; Zhu, W.; Ye, F.; Chen, R. M. PCT patent application: WO2007093368, 2007.

R

Rajewski RA, Stella VJ. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.* 1997; 14: 556–567.

Rawson NS. Drug safety: withdrawn medications are only part of the picture. *BMC Med.* 2016 Feb 13;14:28. doi: 10.1186/s12916-016-0579-5.

Reynolds RF, Kurz X, de Groot MC, et al. The IMI PROTECT project: purpose, organizational structure, and procedures. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2016;25(Suppl 1):5-10. doi:10.1002/pds.3933 pmid:27038353.

Reynolds S., Fussell R.J., de Kok A., Anastassiades M. (Eds.), European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General Safety of the Food Chain Chemicals, Contaminants, Pesticides, SANCO/12571/2013

http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf.

Robb DB, Covey TR, Bruins AP. 2000. Atmospheric pressure photoionization: An ionisation method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 72:3653–3659.

Robb DB, Blades MW. 2008. State-of-the-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS. *Anal Chim Acta* 627:34–49.

Roberts L. Am. Chem. Soc. Meet. (2000).

Roe EMF. Some effects of environment on electronic spectra. *Spectrochimica Acta*, Volume 11, 1956, Pages 515-533.

Roncaglioni A, Toropov AA, Toropova AP, Benfenati E. In silico methods to predict drug toxicity. *Curr Opin Pharmacol.* 2013 Oct;13(5):802-6. doi: 10.1016/j.coph.2013.06.001. Epub 2013 Jun 21.

Rotival R., Bernard M., Henriët T., Fourgeaud M., Fabreguettes J.R., Surget E., Guyon F., Do B., Comprehensive determination of the cyclic FEE peptide chemical stability in solution, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 89 (2014) 50–55.

Russel G.A., Deuterium-isotope effects in the autoxidation of arylalkylhydro-carbons. Mechanism of peroxy radicals, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 3871–3877.

Rycerz L. Practical remarks concerning phase diagrams determination on the basis of differential scanning calorimetry measurements. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, July 2013, Volume 113, Issue 1, pp 231–238.].

Ruiz-Angel MJ, Torres-Lapasió JR, García-Alvarez-Coque MC.. Effects of pH and the presence of micelles on the resolution of diuretics by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2004 Jan 2;1022(1-2):51-65.

S

Sadou Yayé H, Secrétan PH, Henriët T, Bernard M, Amrani F, Akrouit W, Tilleul P, Yagoubi N, Do B. Identification of the major degradation pathways of ticagrelor. *J Pharm Biomed Anal.* 2015 Feb;105:74-83.

Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J Pharm Biomed Anal.* 2017 May 7. pii: S0731-7085(17)30374-6. doi: 10.1016/j.jpba.2017.05.006.

SANCO AQC Guidance No 10684/2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Available from: <http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl/article.asp?CntID=727>

Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, Pascal M, Herbert JM. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost.* 2000 Nov; 84(5):891-6.

Scannell J, Blanckley A, Boldon H, Warrington B, 2012. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (March).

Scheen AJ, GietRev D. Non-observance thérapeutique : causes, conséquences, solutions. *Med Liège* 2010; 65 : 5-6 : 239-245.

Schenone M, Dancik C, Wagner B, Clemons P. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nature Chemical Biology* 9, 232–240 (2013) doi:10.1038/nchembio.1199.

Seiler KP, George GA, Happ MP, Bodycombe NE, Carrinski HA, Norton S, Brudz S, Sullivan JP, Muhlich J, Serrano M, Ferraiolo P, Tolliday NJ, Schreiber SL, Clemons PA. ChemBank: a small-molecule screening and cheminformatics resource database. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D351-9. Epub 2007 Oct 18.

Serban Moldoveanu, Victor David Eds. *Essentials in Modern HPLC Separations.* Elsevier 2012.

Shevchenko A, Chernushevich I, Ens W, Standing KG, Thomson B, Wilm M, Mann M. Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1997;11(9):1015–1024.

Springthorpe B. et al. From ATP to AZD6140: The discovery of an orally active reversible P2Y₁₂ receptor antagonist for the prevention of thrombosis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Volume 17, Issue 21, 1 November 2007, Pages 6013–6018.

Sillen H, Cook M, Davis P. Determination of unbound ticagrelor and its active metabolite (AR-C124910XX) in human plasma by equilibrium dialysis and LC–MS/MS, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 2315–2322.

Singh B, Raza K, Beg S. Developing optimized drug products employing designed experiments. *Chem. Ind. Digest.*, 12 (2013), pp. 1-7.

Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, Lowe EW. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews* January 2014, 66 (1) 334-395; DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>.

Solomon DH, Schneeweiss S, Glynn RJ, Kiyota Y, Levin R, Mogun H, Avorn J. Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2068-73. Epub 2004 Apr 19.

Springthorpe B, Bailey A, Barton P, Birkinshaw TN, Bonnert RV, Brown RC, Chapman D, Dixon J, Guile SD, Humphries RG, Hunt SF, Ince F, Ingall AH, Kirk IP, Leeson PD, Leff P, Lewis RJ, Martin BP, McGinnity DF, Mortimore MP, Paine SW, Pairaudeau G, Patel A, Rigby AJ, Riley RJ, Teobald BJ, Tomlinson W, Webborn PJ, Willis PA. From ATP to AZD6140: the discovery of an orally active reversible P2Y₁₂ receptor antagonist for the prevention of thrombosis. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007 Nov 1;17(21):6013-8. Epub 2007 Aug 19.

Suresh Kumar R, Hariram B, Divya G, Srinivasu MK, Srinivas K, Reddy Sagyam R. Development of a RP-LC method for a diastereomeric drug valganciclovir hydrochloride by enhanced approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 70 (2012), pp. 101-110.

Sushko, I.; Novotarskyi, S.; Körner, R.; Pandey, A. K.; Cherkasov, A.; Li, J.; Gramatica, P.; Hansen, K.; Schroeter, T.; Müller, K.-R.; Xi, L.; Liu, H.; Yao, X.; Öberg, T.; Hormozdiari, F.; Dao, F.; Sahinalp, C.; Todeschini, R.; Polishchuk, P.; Artemenko, A.; Kuz'min, V.; Martin, T.M.; Young, D. M.; Fourches, D.; Muratov, E.; Tropsha, A.;

Baskin, I.; Horvath, D.; Marcou, G.; Varnek, A; Prokopenko, V. V.; Tetko, I.V. (2010). "Applicability domains for classification problems: benchmarking of distance to models for AMES mutagenicity set." *J. Chem. Inf. Model*, 50, 2094-2111.

T

Taylor JB, Triggler DJ. *Comprehensive Medicinal Chemistry II Volume 1: Global Perspective*. Elsevier, 2006.

Thermo Fisher Scientific European Training Institute. (2007). Waltham: Thermo Fisher Scientific Inc., pp. 1–111. TSQ Quantum operations.

Terrier P, Desmazières B, Tortajada J, Buchmann W. APCI/APPI for synthetic polymer analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2011 Sep-Oct;30(5):854-74. doi: 10.1002/mas.20302. Epub 2011 Jan 18.

The Sunday Times Insight Team. *Suffer the children: the story of thalidomide*. London: André Deutsch; 1979.

Tischinger-Wagner, H., et al., 1987. Oxidative degradation of linoleic acid methylester in suspensions of inorganic excipients. Part 1. *Pharmazie* 42, 320–324.

Toropov AA, Toropova AP, Raska I Jr, Leszczynska D, Leszczynski J. Comprehension of drug toxicity: software and databases. *Comput Biol Med*. 2014 Feb;45:20-5. doi: 10.1016/j.combiomed.2013.11.013. Epub 2013 Nov 27.

Tralau-Stewart CJ, Wyatt CA, Kleyn DE, Ayad A. Drug discovery: new models for industry-academic partnerships. *Drug Discov Today*. 2009 Jan;14(1-2):95-101. doi: 10.1016/j.drudis.2008.10.003. Epub 2008 Nov 21.

Tsipi D, Botitsi H, Economou A. *Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and Their Metabolites*. Wiley, 2015. ISBN 978-1-118-50017-0 (cloth)

Turesky R.J., Constable A., Richoz J., Varga N., Markovic J., Martin M.V., Guengerich F.P., Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (1998) 925–936.

Ursu A, Waldmann H. Hide and seek: Identification and confirmation of small molecule protein targets. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015 Aug 15;25(16):3079-86. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.06.023. Epub 2015 Jun 12.

U

U.S. EPA (2016). "User's Guide for T.E.S.T. (version 4.2) (Toxicity Estimation Software Tool): A Program to Estimate Toxicity from Molecular Structure."

US Government Accountability Office. Drug safety: FDA expedites many applications, but data for postapproval oversight need improvement, GAO-16-192. GAO, 2015.

V

Valerio LG Jr. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Dec 15;241(3):356-70. doi: 10.1016/j.taap.2009.08.022. Epub 2009 Aug 28.

van Giezen JJJ. Optimizing platelet inhibition. *Eur Heart J Suppl*. 2008;10(Suppl D):D23–D29.

Vanarase , A.U., Alcalà, M., Rozo, J.I.J., Muzzio, F.J., Romañach, R.J., 2010. Real-time monitoring of drug concentration in a continuous powder mixing process using NIR spectroscopy. *Chemical Engineering Science* 65, 5728-5733.

Vargha V. Binary solid–liquid phase diagram of the two diastereomer racemates of triglycidyl isocyanurate (TGIC). *European Polymer Journal*, Volume 43, Issue 11, November 2007, Pages 4762–4769.

Vogt FG, Kord AS. Development of quality-by-design analytical methods. *J Pharm Sci*. 2011 Mar;100(3):797-812. doi: 10.1002/jps.22325. Epub 2010 Sep 9.

W

Wagner BK, Clemons PA. Connecting synthetic chemistry decisions to cell and genome biology using small-molecule phenotypic profiling. *Curr Opin Chem Biol.* 2009 Dec;13(5-6):539-48. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.09.018. Epub 2009 Oct 12.

Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009;361:1045–57.

Wang XJ, You JZ. Study on the molecular structure and thermal stability of purine nucleoside analogs. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, Volume 111, January 2015, Pages 1-14.

Waring MJ, Arrowsmith J, Leach AR, Leeson PD, Mandrell S, Owen RM, Pairaudeau G, Pennie WD, Pickett SD, Wang J, Wallace O, Weir A. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov.* 2015 Jul;14(7):475-86. doi: 10.1038/nrd4609. Epub 2015 Jun 19.

Waseda Y, Matsubara E, Shinoda K. *X-Ray Diffraction Crystallography, Introduction, Examples and Solved Problems.* Springer 2011. DOI 10.1007/978-3-642-16635-8

Waterman, K.C., Adami, R.C., Alsante, K.M., Antipas, A.S., Arenson, D.R., Carrier, R., Hong, J., Landis, M.S., Lombardo, F., Shah, J.C., Shalaev, E., Smith, S.W., Wang, H., 2002a. Hydrolysis in pharmaceutical formulations. *Pharm. Dev. Tech.* 7, 1113–1146.

Waterman, K.C., Adami, R.C., Alsante, K.M., Hong, J., Landis, M.S., Lombardo, F., Roberts, C.J., 2002b. Stabilization of pharmaceuticals to oxidative degradation. *Pharm. Dev. Tech.* 7, 1–32.

Wax PM. Elixirs, diluents, and the passage of the 1938 Federal Food, Drug and Cosmetic Act. *Ann Intern Med.* 1995 Mar 15;122(6):456-61.

White WB, Faich G, Borer JS, Makuch RW. Cardiovascular thrombotic events in arthritis trials of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Am J Cardiol.* 2003 Aug 15;92(4):411-8.

WHO (2009) Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. Technical Report Series No. 953. World Health Organization, Geneva.

Wichard JD. In silico prediction of genotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2017 Aug;106(Pt B):595-599. doi: 10.1016/j.fct.2016.12.013. Epub 2016 Dec 12.

Wiley B, Fuster V. The concept of the polypill in the prevention of cardiovascular disease. *Ann Glob Health.* 2014 Jan-Feb;80(1):24-34.

Wilkins S. Celebrating 100 years of X-ray crystallography. *Acta Crystallogr. A* 69 (2013) 1–4.

Wilson NS, Nelson MD, Dolan JW, Snyder LR, Wolcott RG, Carr PW. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography I. A general quantitative relationship. *J Chromatogr A.* 2002 Jul 5;961(2):171-93.

Wiese S, Teutenberg T, Schmidt T.C. A general strategy for performing temperature-programming in high performance liquid chromatography—prediction of segmented temperature gradients. *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011), pp. 6898-6906.

Woodcock, J. Evidence vs. access: can twenty-first-century drug regulation refine the tradeoffs? *Clin. Pharmacol. Ther.* 91:378–380 (2012).

Y

Yamashita M, Fenn JB, *J. Phys. Chem.*, 88 (1984) 4451.

Yang SY. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discov Today.* 2010 Jun;15(11-12):444-50. doi: 10.1016/j.drudis.2010.03.013. Epub 2010 Apr 1.

Yoshioka S, Aso Y. Correlations between molecular mobility and chemical stability during storage of amorphous pharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2007 May;96(5):960-81.

Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, Woodcock J. Understanding pharmaceutical quality by design. *AAPS J.* 2014 Jul;16(4):771-83. doi: 10.1208/s12248-014-9598-3. Epub 2014 May 23.

Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001;345:494–502.

Z

Zhong H, Er D, Dong L, Wen L. Theoretical study on the poly(m-phenylene) derivatives with lower HOMO–LUMO gaps. *Synthetic Metals*, Volume 229, July 2017, Pages 16-21.

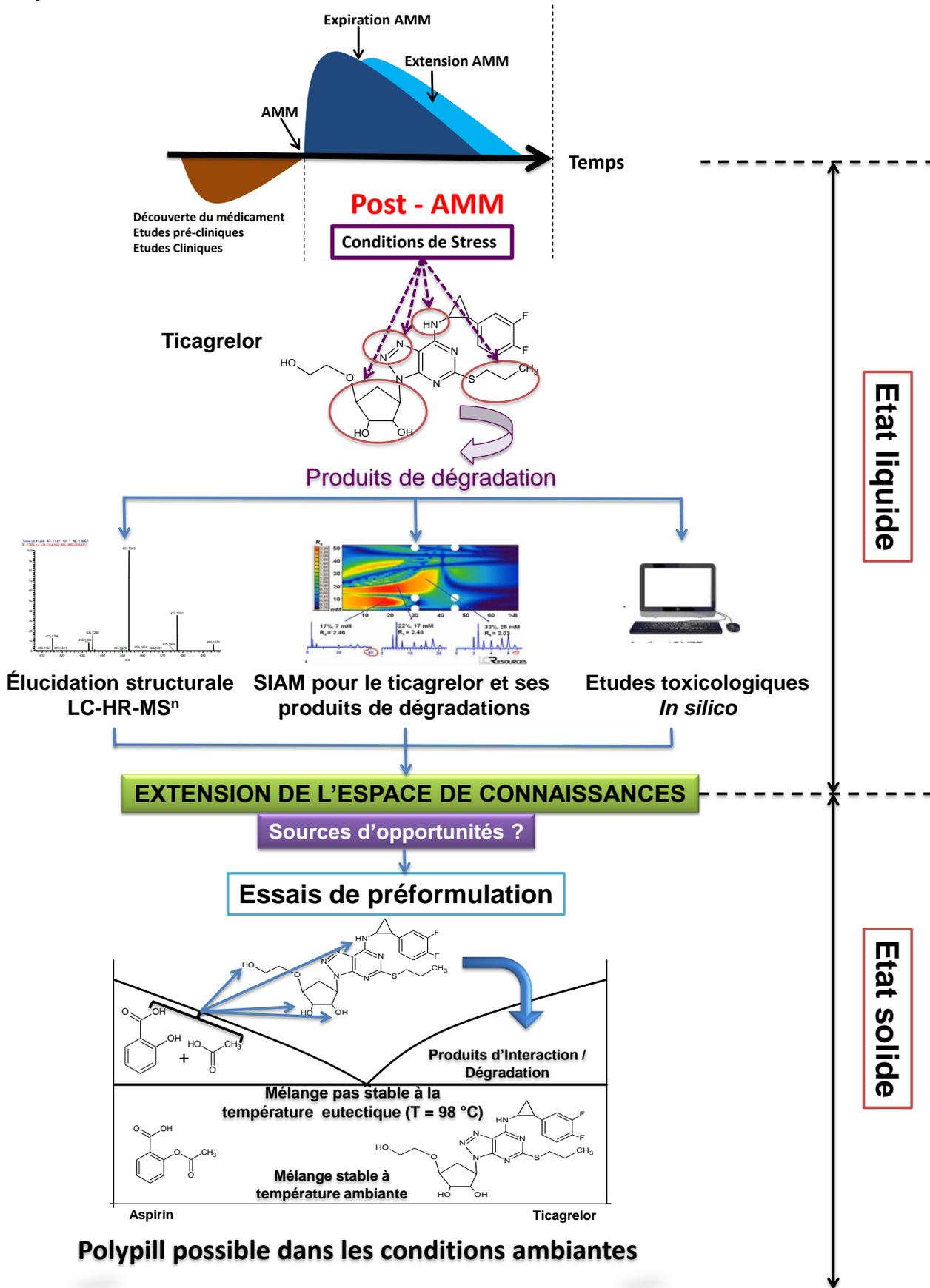
Zimmermann A, Greco R, Walker I, Horak J, Cavazzini A, Lämmerhofer M. Synthetic oligonucleotide separations by mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2014 Aug 8;1354:43-55. doi: 10.1016/j.chroma.2014.05.048. Epub 2014 May 27.

Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. *J Cell Mol Med*. 2009 Feb;13(2):238-48.

Zubarev R.A., Makarov A. Orbitrap Mass Spectrometry *Anal. Chem.*, 85 (2013), pp. 5288–5296.

Graphical

abstract



Titre : Etude du cycle de vie du Ticagrelor par une approche combinée prédictive et caractérisation structurale

Mots clés : Médicament Post-AMM, Ticagrelor – Aspirine, Qualité par la conception, Tests de Stress, Stabilité intrinsèque, Elucidation structurale, Voies de dégradation, Evaluation toxicologique *In silico*

Les scandales sanitaires ayant émaillé le médicament ont mis la sécurité d'utilisation au cœur des préoccupations des acteurs de santé. Tout au long de son cycle de vie, le médicament est susceptible d'exposition à des conditions de stress pouvant conduire à sa dégradation et potentiellement, à la modification du rapport bénéfique/risque. Ce problème est d'autant plus marqué en milieu hospitalier où les médicaments en post – AMM sont manipulés pour des besoins spécifiques des patients. Quid de la maîtrise des modifications de leurs microenvironnements ? Etendre son espace de connaissances est admis comme étant le meilleur moyen pour circonscrire ces phénomènes. Dans le cadre de ce projet doctoral, une stratégie d'étude du cycle de vie des médicaments en post – AMM a été mise en place afin de renforcer leur sécurité d'utilisation. Compte tenu de la place prépondérante des formes solides dans l'arsenal thérapeutique, le ticagrelor, un récent antiagrégant plaquettaire (AAP) présenté sous forme de comprimés, a été choisi

l'utilisation des conditions de stress pour évaluer sa stabilité intrinsèque et l'élucidation structurale des produits de dégradations grâce au couplage LC-HR-MSⁿ donnant accès aux compositions élémentaires. Les voies de dégradation ont été proposées et la sécurité des produits a été évaluée grâce à l'approche toxicologique *in silico*. Par ailleurs, compte tenu de l'utilisation des AAP en association, dans la seconde partie de ce travail, l'extension de l'espace de connaissances du ticagrelor a permis d'envisager une stratégie de préformulation avec l'aspirine à l'état solide en utilisant des techniques complémentaires comme la LC-HR-MSⁿ, la DSC, la DRX ou l'ATG. La formation d'un simple eutectique a été observée avec le mélange des deux principes actifs. Nous avons démontré que la dégradation du ticagrelor est liée à la décomposition de l'aspirine, modulée par les conditions environnementales. Le modèle d'étude du ticagrelor ouvre clairement des perspectives sur la maîtrise de la sécurité en l'élargissant à d'autres médicaments et pourra

Title: Ticagrelor life cycle study combining prediction and structural characterization

Key words: Commercial drugs, Ticagrelor – Aspirin, Quality by Design, Stress testing, Intrinsic stability, Structural elucidation, Degradation pathways, *In silico* toxicological evaluation

Tragedies caused by the misuse of pharmaceuticals have put the drug safety at the core of the concerns of healthcare providers. Throughout its life cycle, a drug may be subjected to environmental stresses, which can lead to its degradation. Thorough understanding about the susceptibility of a drug to degrade is an essential step to avoid it. This problem is in particular relevant in a hospital setting, where commercial drugs are usually applied to specific cases without a clear understanding of its limitations. As part of this PhD project, a life cycle study strategy for a commercial drug has been implemented in order to increase its safety in use. Given the prominence of solid forms in the therapeutic arsenal, ticagrelor, a recent antiplatelet agent (APA) in tablet form, was chosen for this study. The first step was devoted to the evaluation of the intrinsic stability and the structural elucidation of

the degradation products making use of LC-HR-MSⁿ, providing access to the elemental composition. Degradation pathways have been proposed and the safety of the products has been evaluated via an *in silico* toxicological approach. Furthermore because antiplatelet agents are often used in combination therapy, in the second part, a preformulation strategy with aspirin in the solid state has been studied using the complementary techniques LC-HR-MSⁿ, DSC, PXRD, and TGA. The mixture of the two active pharmaceutical ingredients gave rise to a simple eutectic. We have demonstrated that the degradation of ticagrelor in these mixtures is closely related to the stability of aspirin, which is modulated by environmental conditions. The ticagrelor study provides a model for the safety management of other drugs and can contribute to their appropriate recycling.

