



HAL
open science

**Mise en forme de biomolécules par compression :
maîtrise des paramètres de formulation et de procédé
afin de garantir efficacité biologique et stabilité**

Charbel Madi

► **To cite this version:**

Charbel Madi. Mise en forme de biomolécules par compression : maîtrise des paramètres de formulation et de procédé afin de garantir efficacité biologique et stabilité. Mécanique [physics]. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0167 . tel-04723373

HAL Id: tel-04723373

<https://theses.hal.science/tel-04723373v1>

Submitted on 7 Oct 2024

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.

THESE PRESENTEE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR
DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Ecole doctorale Sciences Physiques et de l'Ingénieur
Spécialité Mécanique

Par **Charbel MADI**

Mise en forme de biomolécules par compression : maîtrise des paramètres de formulation et de procédé afin de garantir efficacité biologique et stabilité

Sous la direction du Pr. Virginie BUSIGNIES et du Pr. Pierre TCHORELOFF

Soutenue le 20 septembre 2024

Membres du jury :

Mme. CHARRUEAU Christine	Professeure des universités	Université de Paris Cité	Rapporteur
M. SHARKAWI Tahmer	Maître de conférences	Université de Montpellier	Rapporteur
Mme. CAZALBOU Sophie	Maître de conférences	Université de Toulouse	Examineur
M. CHERIF Mehdi	Professeur des universités	ENSAM Bordeaux-Talence	Examineur (président du jury)
Mme. BUSIGNIES Virginie	Professeure des universités	Université de Bordeaux	Directeur
M. TCHORELOFF Pierre	Professeur des universités	Université de Bordeaux	Co-directeur

Membre invité :

Mme. HSEIN Hassana	Maître de conférences	Université de Bordeaux	Co-encadrante
--------------------	-----------------------	------------------------	---------------

Résumé

Mise en forme de biomolécules par compression : maîtrise des paramètres de formulation et de procédé afin de garantir efficacité biologique et stabilité

Depuis la découverte de l'insuline en 1921, les protéines et peptides thérapeutiques sont de plus en plus étudiés en vue du développement de nouveaux médicaments. Dans la plupart des cas, ces molécules biologiques sont administrées par voie parentérale. Cependant, elles sont souvent sujettes à des instabilités sous forme liquide, nécessitant un stockage à basse température, impliquant une logistique complexe. Pour remédier à ces contraintes, les industries pharmaceutiques travaillent activement sur le développement de comprimés contenant des biomolécules, visant à réduire les instabilités lors du stockage. La première étape pour fabriquer des comprimés à partir de formulations liquides consiste à sécher les formulations afin d'obtenir une poudre, qui sera ensuite comprimée. Plusieurs techniques de séchage telles que la lyophilisation ou l'atomisation permettent d'obtenir une poudre à partir d'une formulation liquide. Toutefois, pour stabiliser les biomolécules durant ces procédés, les formulations doivent intégrer des excipients tels que des lyo ou cryoprotecteurs comme le tréhalose et le saccharose (sucres non réducteurs), le lactose (sucre réducteur), des agents de masse comme le mannitol, des surfactants, des agents tampons, etc. Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié la faisabilité du développement de comprimés contenant une protéine modèle, plus précisément la lactate déshydrogénase (LDH). Différents excipients et conditions de lyophilisation et de compression ont été évalués. Initialement, des formulations placebo contenant du tréhalose, du saccharose, du lactose ou du mannitol ont été lyophilisées, puis leurs propriétés physico-chimiques ont été étudiées. Ces poudres ont ensuite été comprimées, et leur comportement lors de la compression a été caractérisé. Il a été démontré que le tréhalose et le lactose, une fois lyophilisés puis comprimés, étaient amorphes et présentaient des propriétés mécaniques spécifiques telles qu'une résistance mécanique élevée des comprimés obtenus dès les faibles pressions de compression, un comportement fragile très marqué de ces comprimés et des profils de recouvrement élastique spécifiques, différents des profils des poudres cristallines commerciales. En revanche, le mannitol, cristallin après lyophilisation, a montré un comportement en compression différent, avec un profil de compressibilité différent des excipients amorphes et des propriétés mécaniques des comprimés réalisés également différenciées. Finalement, la caractérisation du comportement en compression du saccharose lyophilisé a été difficile à évaluer en raison de son hygroscopicité élevée. La seconde partie de l'étude a impliqué la modification des formulations en augmentant la concentration du tréhalose ou du lactose dans les solutions lyophilisées dans l'objectif d'améliorer les propriétés d'écoulement des poudres obtenues après séchage, afin d'anticiper sur les difficultés de remplissage de la matrice de compression, en vue d'une transposition industrielle. Cette modification s'est avérée insuffisante pour améliorer les propriétés d'écoulement et oriente donc vers d'autres solutions technologiques. Finalement, l'addition de la LDH aux formulations contenant du tréhalose et du lactose a été réalisée dans différentes conditions de concentration et en faisant varier les paramètres procédés. Il a été montré qu'il est possible de préserver l'activité enzymatique de la LDH à 100% après lyophilisation. A l'inverse, cette partie de l'étude a montré une perte quasi-totale en présence de mannitol. De plus, les poudres de tréhalose et de lactose contenant la LDH, obtenues après lyophilisation puis comprimées à des pressions allant de 12,5 MPa à 250 MPa, ont permis de maintenir intégralement l'activité enzymatique de la LDH, malgré les stress mécaniques générés par l'opération de compression. Enfin, une étude de stabilité sur la LDH lyophilisée dans des matrices de tréhalose ou de lactose, comprimée à 50 MPa et stockée entre 4 °C et 40 °C, a confirmé la conservation totale de son activité enzymatique pendant 4 mois, quelles que soient les conditions de température.

Mots clés : lyophilisation, compression, atomisation, procédés, propriétés physico-chimiques, propriétés mécaniques

Abstract

Tableting Biomolecules by Compression: Mastering Formulation and Process Parameters to Ensure Biological Efficacy and Stability

Since the discovery of insulin in 1921, therapeutic proteins and peptides have been increasingly studied for the development of new medications. In most cases, these biological molecules are administered parenterally. However, they are often subject to instability in liquid form, requiring low-temperature storage and involving complex logistics. To address these constraints, pharmaceutical industries are actively working on the development of tablets containing biomolecules, aiming to reduce instabilities during storage. The first step in manufacturing tablets from liquid formulations is to dry the formulations to obtain a powder, which is then compressed. Several drying techniques, such as freeze-drying or spray-drying, can produce a powder from a liquid formulation. However, to stabilize the biomolecules during these processes, the formulations must include excipients such as lyoprotectants or cryoprotectants like trehalose and sucrose (non-reducing sugars), lactose (reducing sugar), bulking agents like mannitol, surfactants, buffer agents, etc.

In this thesis, we studied the feasibility of developing tablets containing a model protein, specifically lactate dehydrogenase (LDH). Various excipients and freeze-drying and compression conditions were evaluated. Initially, placebo formulations containing trehalose, sucrose, lactose, or mannitol were freeze-dried, and their physicochemical properties were studied. These powders were then compressed, and their behavior during compression was characterized. It was demonstrated that trehalose and lactose, once lyophilized and then compressed, were amorphous and exhibited specific mechanical properties such as high mechanical resistance of the tablets obtained at low compression pressures, a pronounced fragile behavior of these tablets, and specific elastic recovery profiles different from those of commercial crystalline powders. In contrast, mannitol, crystalline after freeze-drying, showed different compression behavior, with a compressibility profile different from the amorphous excipients and differentiated mechanical properties of the tablets produced. Finally, the characterization of the compression behavior of freeze-dried sucrose was difficult to assess due to its high hygroscopicity.

The second part of the study involved modifying the formulations by increasing the concentration of trehalose or lactose in the lyophilized solutions with the aim of improving the flow properties of the powders obtained after drying, to anticipate difficulties in filling the compression die for industrial transposition. This modification proved insufficient to improve flow properties, indicating the need for other technological solutions. Finally, the addition of LDH to formulations containing trehalose and lactose was carried out under different concentration conditions and by varying the process parameters. It was shown that it is possible to preserve 100% of the enzymatic activity of LDH after freeze-drying. Conversely, this part of the study showed an almost total loss in the presence of mannitol. Moreover, trehalose and lactose powders containing LDH, obtained after freeze-drying and then compressed at pressures ranging from 12.5 MPa to 250 MPa, maintained the enzymatic activity of LDH entirely, despite the mechanical stresses generated by the compression operation. Finally, a stability study on freeze-dried LDH in trehalose or lactose matrices, compressed at 50 MPa and stored between 4 °C and 40 °C, confirmed the total preservation of its enzymatic activity for 4 months, regardless of the temperature conditions.

Key words: freeze-drying, compression, spray-drying, process, physico-chemical properties, mechanical properties

Institut de Mécanique et d'Ingénierie de Bordeaux

I2M, UMR 5295, Université de Bordeaux - bât A4 RdC, 351 cours de la libération, 33405 TALENCE Cedex, France

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut de Mécanique et d'Ingénierie (I2M) à l'Université de Bordeaux. Ma réussite au cours de ces trois années de thèse et mon immersion dans le domaine pharmaceutique, qui m'était initialement inconnu, reposent sur l'appui et l'engagement de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde gratitude envers l'ensemble des membres du jury de thèse, notamment les professeurs Christine CHARRUEAU et Mehdi CHERIF et les docteurs Sophie CAZALBOU et Tahmer SHARKAWI pour leur disponibilité à évaluer et à juger mon travail, ainsi que leurs précieux retours.

Je tiens particulièrement à remercier le Professeur Pierre Tchoreloff, le Professeur Virginie Busignies et le Docteur Hassana Hsein pour leur soutien indéfectible, leur expertise inestimable et leur accompagnement tout au long de ce parcours. Leurs conseils éclairés, leurs encouragements et leur dévouement ont grandement contribué à l'aboutissement de cette recherche. Je souhaite également adresser mes remerciements les plus sincères au Professeur Vincent Mazel, dont l'engagement et les suggestions avisées ont été d'une valeur inestimable pour l'élaboration de ce projet. Chacun d'entre eux m'a apporté un enseignement précieux, enrichissant mon travail de leurs visions et expertises complémentaires.

Je souhaite également exprimer ma gratitude envers mes collègues de laboratoire : Julie, Coline, Nivetha, Léo, Sylvain et Joanne, pour leur collaboration et les échanges fructueux. Leurs contributions et leur soutien ont créé un environnement de travail stimulant et agréable, et je leur en suis infiniment reconnaissant. Ils occupent une place spéciale dans mon parcours et comptent beaucoup pour moi.

Je suis également reconnaissant envers tous les laboratoires qui ont généreusement ouvert leurs portes et mis à ma disposition leurs équipements et installations lorsque ceux-ci n'étaient pas disponibles dans notre propre laboratoire. Leur accueil chaleureux et leur partage de ressources ont grandement facilité mes recherches et enrichi mon expérience.

De plus, je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers ma famille et mes amis, pour leur soutien inconditionnel, leurs encouragements constants et leur compréhension tout au long de cette période intense de ma vie. Leur présence et leur soutien ont été essentiels pour surmonter les défis de ce parcours académique.

Finalement, je tiens à exprimer ma gratitude la plus profonde envers Tatiana, qui a été une présence constante tout au long de cette aventure. Dans les hauts et les bas de ma thèse, elle a été une source inépuisable de soutien et d'encouragement. Merci, Tatiana, pour ton soutien indéfectible.

Liste des abréviations

ARN_m	Acide Ribonucléique messenger
BET	Brunauer, Emmett et Teller
BFI	Brittle Fracture Index
BSA	Albumine Sérum bovin (bovine serum albumin)
CCP	Poudre cristalline commerciale (Commercial Crystalline Powder)
CCMP	Poudre cristalline commerciale broyée (Commercial Crystalline Milled Powder)
DSC	Calorimétrie Différentielle à Balayage (Differential Scanning Calorimetry)
DRX	Diffraction des Rayons X
FD	Lyophilisé (Freeze-Dried)
In-die	Dans la matrice de compression
LDH	Lactate déshydrogénase
MCC	Cellulose Microcristalline
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MPa	Mégapascal
P_{comp}	Pression de compression
PEG	Polyéthylène Glycol
PFK	Phosphofructokinase
SD	Atomisé (Spray-Dried)
SRS	Sensibilité à la vitesse de déformation (Strain-Rate Sensitivity)
T_{eu}	Température eutectique
T_g	Température de transition vitreuse
T_g'	Température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée au maximum
T_n	Température de nucléation
T_s	Température de solidification totale
T_e	Température de l'étagère
T_p	Température du produit
T_{entrée}	Température d'entrée
T_{sortie}	Température de sortie
Out-of-die	En sortie de la matrice de compression

Table des matières

Résumé	2
Abstract	3
Remerciements	4
Liste des abréviations	5
Liste des figures	8
Liste des tableaux	13
Introduction générale	14
Chapitre 1. Etat de l'art	17
1.1 La lyophilisation.....	19
1.2 Le séchage par atomisation	57
1.3 Le comprimé et la compression pharmaceutique	69
1.4 Conclusion	97
Chapitre 2. Matériels et méthodes	98
2.1 Matériels	99
2.2 Méthodes.....	100
Chapitre 3. Propriétés en compression du tréhalose et du saccharose lyophilisés : caractérisations physico-chimiques et mécaniques	113
3.1 Introduction.....	114
3.2 Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 3	116
3.3 Résultats et discussions	117
3.4 Conclusion	138
Chapitre 4. Les propriétés en compression de différents excipients lyophilisés et atomisés dans les formulations pharmaceutiques	139
4.1 Introduction.....	140
4.2 Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 4	142
4.3 Résultats et discussions	143
4.4 Conclusion	166
Chapitre 5. Etude des propriétés en compression des poudres lyophilisées avec différentes concentrations en excipient	167

5.1	Introduction.....	168
5.2	Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 5	169
5.3	Résultats et discussions	170
5.4	Conclusion	189
Chapitre 6. Etude de l'effet des procédés de lyophilisation et de compression sur l'activité biologique d'une protéine modèle : la lactate déshydrogénase		191
6.1	Introduction.....	192
6.2	Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 6	194
6.3	Résultats et discussions	195
6.4	Conclusion sur l'effet de la lyophilisation et de la compression sur l'activité de la LDH	203
6.5	Etude de stabilité	204
6.6	Conclusion sur l'étude de stabilité.....	207
Conclusion générale		208
Bibliographie		212
Annexes		225

Liste des figures

Figure 1 – Schéma d'un lyophilisateur avec ses trois constituants principaux.	19
Figure 2 – Diagramme d'état de l'eau montrant les différents changements d'états pendant un cycle de lyophilisation.	21
Figure 3 – Représentation schématique des variations de la température d'étagère, de la température du produit et de la pression dans la chambre au cours des trois étapes d'un cycle de lyophilisation (adapté de (Hedoux, 2015)).	22
Figure 4 – Représentation schématique de l'évolution de la température du produit pendant la phase de congélation selon une rampe de température de refroidissement définie.	23
Figure 5 – Diagramme de phase binaire du mélange eau/saccharose. (Hedoux, 2015).....	25
Figure 6 – Structure chimique du tréhalose.....	37
Figure 7 – Diffractogramme rayons X du tréhalose cristallin di-hydraté. Pics caractéristiques : 1 - $2\theta = 8,9^\circ$, 2- $2\theta = 12,9^\circ$, 3- $2\theta = 13,9^\circ$, 4- $2\theta = 24,3^\circ$. Adapté de (Megarry et al., 2011).	37
Figure 8 – Diagramme de phase (température-composition) du mélange eau-tréhalose (Cesàro et al., 2008).	38
Figure 9 – Structure chimique du saccharose.	40
Figure 10 – Diffractogramme rayons X du saccharose cristallin (Kaur et al., 2021).....	40
Figure 11 – Diagramme de phase eau-saccharose (Hedoux, 2015).	41
Figure 12 – Structure chimique du D-mannitol.	43
Figure 13 – Diffractogramme des rayons X des polymorphes du D-mannitol (Cares-Pacheco et al., 2014).	44
Figure 14 – Diagramme de phase eau-mannitol (Rodrigues et al., 2021). HH (mannitol hémihydraté) ; β -m et δ -m (β -mannitol et δ -mannitol) ; lh (glace).	44
Figure 15 – Structure chimique du lactose.	47
Figure 16 – Diffractogrammes des rayons X du lactose α monohydrate (A) et du lactose β anhydre (B) (Thomas et al., 2009).	47
Figure 17 – Diagramme de phase eau-lactose (McSweeney and Fox, 2009).	48
Figure 18 – Apparences physiques des lyophilisats suite au procédé de lyophilisation. La correspondance des lettres figurant sur la figure est donnée dans le tableau 3 (Patel et al., 2017).	53
Figure 19 – Schéma d'un atomiseur de laboratoire avec ces quatre composants principaux.	58
Figure 20 – Représentation schématique d'un atomiseur à cycle ouvert (www.niro.com).	59
Figure 21 – Représentation schématique d'un atomiseur à cycle fermé (www.niro.com).	60
Figure 22 – Schéma des différents modes de contact pulvérisation-air (www.buchi.com).....	61
Figure 23 – Contraintes axiale (σ_{ax}) et radiale (σ_{rad}) appliquées sur un comprimé par les poinçons et la matrice.	70
Figure 24 – Outillages de la machine à compression : poinçon supérieur (A), poinçon inférieur (B), matrice (C) (www.directindustry.fr).....	71
Figure 25 – Schéma des différentes étapes d'un procédé de compression visant à produire un comprimé monocouche à l'aide d'une machine à compression mono-station.	72

Figure 26 – Evolution de la pression axiale en fonction de la distance entre les poinçons pendant l'étape de compression. E_1 représente l'énergie net de compression, E_2 représente l'énergie élastique. Les points ACD, ACE et ECD délimitent respectivement l'énergie totale de compression, l'énergie net de compression et l'énergie plastique.	74
Figure 27 – Schéma du fonctionnement d'une presse rotative ; téléchargé et traduit de (www.ramaco.com).	76
Figure 28 – Représentation schématique de la diminution de la porosité en fonction du rapprochement des poinçons.	81
Figure 29 – Schéma du mécanisme de décalottage ; adapté de (Nakamura et al., 2012).	83
Figure 30 – Schéma de principe de la compression diamétrale.	84
Figure 31 – Schéma représentant le test de BFI ; (A) test de traction sur un comprimé à méplat troué, (B) test de traction sur un comprimé non troué à méplat.	86
Figure 32 – Schéma d'illustration de la méthode de largeur de bande à demi-puissance adapté de (Meynard et al., 2022a).	88
Figure 33 – Profils de tablétabilité de différents grades de mannitol adaptés de (Paul et al., 2019). Les caractéristiques particulières de chacun des grades de mannitol sont présentées dans l'étude (Paul et al., 2018) (Symboles pleins, vitesse de compression lente soit un dwell time de 100 ms ; Symboles ouverts, vitesse de compression rapide soit un dwell time de 10 ms).	91
Figure 34 – Photographie annotée du lyophilisateur pilote Cryotec.	101
Figure 35 – Enregistrements des cycles de lyophilisation « conservateurs » (a) et « agressif » (b).	102
Figure 36 – Photographie annotée du Büchi Mini spray dryer B-191.	104
Figure 37 – Photographie annotée du broyeur à bille Restsch vibration mill MM 2000, du cylindre et de la bille de broyage.	104
Figure 38 – Photographie annotée de la Styl'One Evolution et de la station de compression.	106
Figure 39 – Schéma des réactions chimiques générales du kit de dosage CytoTox 96®.	111
Figure 40 – Aspect macroscopique d'un lyophilisat de tréhalose (lyophilisation de 6 ml de solution de tréhalose 5% m/v dans les conditions « conservatrices » décrites dans le Chapitre 2).	117
Figure 41 – Images de la structure interne du tréhalose lyophilisé obtenues en MEB (A) préparation de l'échantillon permettant la conservation de la structure en nids d'abeille, (B) après broyage léger du lyophilisat. (Grossissement x500).	118
Figure 42 – Diffractogrammes du tréhalose avant lyophilisation (A), après lyophilisation (B), après compression de la poudre lyophilisée à 50 MPa (C) et à 150 MPa (D).	120
Figure 43 – Isotherme de sorption de la vapeur d'eau pour le FD tréhalose.	122
Figure 44 – Profils de compressibilité « in-die » pour le tréhalose cristallin et le tréhalose lyophilisé (FD tréhalose). Pour le tréhalose lyophilisé, 2000 ms et 70 ms indiquent le temps du cycle de compression.	124
Figure 45 – Profils de compressibilité « out-of-die » pour le tréhalose cristallin et le tréhalose lyophilisé (FD tréhalose). Pour le tréhalose lyophilisé, 2000 ms et 70 ms indiquent le temps du cycle de compression.	124

Figure 46 – Images MEB de la structure interne des comprimés de tréhalose lyophilisé obtenus à 12,5 (A), 25 (B), 50 (C), 75 (D), 100 (E), 150 (F), 200 (F) et 250 MPa (H). (Grossissement x500)	125
Figure 47 – Profils de compressibilité « in-die » (A) et « out-of-die » (B) pour le tréhalose cristallin, le tréhalose lyophilisé (FD tréhalose) et trois excipients de compression directe (MCC, cellulose microcristalline ; Lac, lactose monohydrate ; aCP, phosphate de calcium anhydre). Pour le tréhalose lyophilisé, 2000 ms et 70 ms indiquent le temps du cycle de compression.....	127
Figure 48 – Profils de tabléabilité montrant l'évolution de la contrainte de rupture en fonction de la pression de compression axiale. FD tréhalose (2000 ms) et (70 ms) indiquent le temps du cycle de compression. Chaque point correspond à la moyenne de trois mesures.....	130
Figure 49 – Courbes force/déplacement obtenues durant le test de rupture diamétrale pour les comprimés de tréhalose lyophilisé (FD trehalose) et de cellulose microcristalline (MCC) obtenues à une pression de compression de 50 MPa.....	130
Figure 50 – Profils de tabléabilité montrant l'évolution de la contrainte de rupture en fonction de la pression de compression axiale. Pour FD tréhalose, 2000 ms et 70 ms indiquent le temps du cycle de compression. Chaque point correspond à la moyenne de trois mesures.....	131
Figure 51 – Test de compression diamétrale d'un comprimé de tréhalose lyophilisé (pression de compression de 50 MPa). Les images enregistrées au moment de la rupture montrent des ruptures aléatoires et non diamétrales signe d'une forte tendance à une rupture fragile.	133
Figure 52 – Variation du pourcentage de recouvrement élastique en fonction de la pression de compression axiale appliquée pour les différents systèmes granulaires étudiés. Pour FD tréhalose, 2000 ms et 70 ms indiquent le temps du cycle de compression. Pour chaque pression de compression, chaque point correspond à la moyenne de trois mesures.	134
Figure 53 – Valeurs du rapport d'amortissement (damping ratio) déterminées sur des comprimés de tréhalose lyophilisé (FD tréhalose), de tréhalose cristallin, de MCC, de Lac et d'aCP (pression de compression de 150 MPa) au moyen de la technique d'excitation impulsionnelle.....	135
Figure 54 – Images de la structure interne du saccharose lyophilisé obtenues en MEB. (Grossissement X150)	136
Figure 55 – Diffractogrammes des excipients sous les différentes formes étudiées : cristallin (CCP), cristallin broyé (CCMP), lyophilisé (FD) et atomisé (SD). (A) tréhalose lyophilisé et atomisé ; (B) tréhalose cristallin et cristallin broyé ; (C) lactose lyophilisé et atomisé ; (D) lactose cristallin et cristallin broyé ; (E) mannitol lyophilisé, atomisé, cristallin et cristallin broyé.....	144
Figure 56 – Isothermes de sorption de la vapeur d'eau pour les systèmes granulaires lyophilisés (FD lactose et FD mannitol).	146
Figure 57 – Images MEB du FD tréhalose (A et D), du FD lactose (B et E) et du FD mannitol (C et F). A, B et C : images de la surface des lyophilisats ; D, E et F : images internes des lyophilisats. (Grossissement x400)	147
Figure 58 – Représentation des distributions de taille granulométrique du SD tréhalose, SD lactose et SD mannitol.	149
Figure 59 – Images en microscopie électronique à balayage du SD tréhalose (A), du SD lactose (B) et du SD mannitol (C). (Grossissement x800).....	150

Figure 60 – Imageries MEB du CCP tréhalose, lactose et mannitol (respectivement A, B et C) et du CCMP tréhalose, lactose et mannitol (respectivement D, E et F). (Grossissement x400)	151
Figure 61 – Profils de compressibilité « in-die » des poudres FD, SD, CCP et CCMP (FD : lyophilisé, SD : atomisé, CCP : cristallin, CCMP : cristallin broyé).....	153
Figure 62 – Images MEB de la surface des comprimés de tréhalose, lactose et mannitol lyophilisés (FD) et atomisés (SD) à 25 et 250 MPa. (Grossissement x400 (A-F), x800 (G, H))	155
Figure 63 – Profils de recouvrement élastique des poudres de tréhalose (A), de lactose (B) et de mannitol (C). FD : lyophilisé, SD : atomisé, CCP : cristallin, CCMP : cristallin broyé.....	157
Figure 64 – Profils des énergies plastiques des poudres de (A) tréhalose, (B) lactose et (C) mannitol. FD : lyophilisé, SD : atomisé, CCP : cristallin, CCMP : cristallin broyé.....	158
Figure 65 – Profils de tablétabilité des poudres de (A) tréhalose, (B) lactose et (C) mannitol. FD : lyophilisé, SD : atomisé, CCP : cristallin, CCMP : cristallin broyé.....	159
Figure 66 – Imagerie en microscopie électronique à balayage des comprimés de tréhalose et de lactose produits à 150 MPa. (A, B) SD tréhalose après compression et 24 heures après compression, (C, D) FD tréhalose après compression et 24 heures après compression, (E, F) FD lactose après compression et 24 heures après compression. (Grossissement x50 (A, B, E, F), x180 (C, D)).....	161
Figure 67 – Imagerie par tomographie à rayons X montrant une fissure se propageant de la surface jusqu'à l'intérieur d'un comprimé de FD tréhalose produit à 150 MPa.	162
Figure 68 – Rapports d'amortissement (damping ratio) déterminés sur les comprimés des différents systèmes étudiés.	165
Figure 69 – Diffractogrammes des lyophilisats de tréhalose et de lactose obtenus à partir de solutions de concentrations croissantes, 10 à 30% m/v pour le tréhalose (FD T10%, FD T15% et FD T30%) et 10 à 20% m/v pour le lactose (FD L10%, FD L15% et FD L20%) et des comprimés obtenus à 25 et 250 MPa.....	170
Figure 70 – Images en microscopie électronique à balayage du tréhalose et du lactose lyophilisés ; (A) FD T5%, (B) FD L5%, (C) FD T10%, (D) FD L10%, (E) FD T15%, (F) FD L15%, (G) FD T30% et (H) FD L20%. (Grossissement x400)	173
Figure 71 – Images en microscopie électronique à balayage de la surface des comprimés de tréhalose lyophilisé comprimé à 25 MPa (A, C, E et G) et 250 MPa (B, D, F et H) du FD tréhalose 5, 10, 15 et 30%. (Grossissement x400).....	174
Figure 72 – Images en microscopie électronique à balayage de la surface des comprimés de lactose lyophilisé comprimé à 25 MPa (A, C, E et G) et 250 MPa (B, D, F et H) du FD lactose 5, 10, 15 et 20%. (Grossissement x400)	175
Figure 73 – Profils de compressibilité du FD tréhalose (A) et du FD lactose (B) obtenus à partir de solutions à différentes concentrations.	178
Figure 74 – Variation de la masse volumique « in-die » en fonction de la pression de compression pour le FD tréhalose (A) et le FD lactose (B) aux différentes concentrations.	179
Figure 75 – Recouvrement élastique des comprimés de FD tréhalose (A) et de FD lactose (B) à différentes pressions de compression.....	180
Figure 76 – Energies plastiques du FD tréhalose (A) et du FD lactose (B) à différentes concentrations.	181

Figure 77 – Profils de tablétabilité (24 heures après compression) du FD T5% (A) et du FD L5% (B). (1), (1.1) et (1.2) représentent les résultats obtenus avec les comprimés de 10 mm. (2) représente les résultats obtenus avec les comprimés de 11 mm de diamètre.....	183
Figure 78 – Profils de tablétabilité (24 heures après compression) du FD tréhalose (A) et de FD lactose (B) à différentes concentrations. Dans la légende, (2) représente les valeurs pour les comprimés produits avec le poinçon de 11 mm de diamètre.....	184
Figure 79 – Représentation des fonctions d'écoulement du FD L5, 10, 15 et 20% et des droites de l'indice d'écoulement constant ($ff_c=1$ en rouge, $ff_c=2$ en noir, $ff_c=4$ en bleu, $ff_c=10$ en violet).	188
Figure 80 – Evaluation du pourcentage d'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation à l'aide d'un cycle conservateur ou d'un cycle agressif et après compression des poudres lyophilisées.	196
Figure 81 – Evaluation du pourcentage de l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation (cycle agressif) en présence de lactose et après compression de la poudre lyophilisée (FD lactose) à différentes pressions.	199
Figure 82 – Evaluation du pourcentage de l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation (cycle agressif) en présence de mannitol et après compression de la poudre lyophilisée (FD) à différentes pressions.....	201
Figure 83 – Evaluation du pourcentage de l'activité enzymatique de la LDH à différentes concentrations (350 µl/ml et 1 mg/ml) après lyophilisation (cycle agressif) en présence de tréhalose et après compression de la poudre lyophilisée à différentes pressions (25 et 250 MPa).....	203
Figure 84 - Evaluation du pourcentage de l'activité enzymatique de la LDH tout de suite après dissolution et 24 heures après dissolution et stockage à 25 °C.....	205
Figure 85 – Etude de stabilité menée sur plusieurs mois, à différentes températures de stockage. L'activité enzymatique de la LDH a été évaluée après lyophilisation (cycle agressif) en présence de tréhalose (A) ou de lactose (C) et après compression à 50 MPa des lyophilisats de tréhalose (B) ou de lactose (D).	206

Liste des tableaux

Tableau 1 – Les différentes propriétés du tréhalose, saccharose, lactose et mannitol.	50
Tableau 2 – Surface spécifique du saccharose et du mannitol lyophilisés en fonction de la température de nucléation.	52
Tableau 3 – Quelques critères de qualité pour un lyophilisats (tableau adapté de (Patel et al., 2017)).	54
Tableau 4 – Différents types d'atomiseurs/buses.	60
Tableau 5 – Effets des paramètres du procédé et de la formulation sur les caractéristiques finales du produit atomisé (adapté de (Patel et al., 2015)).	63
Tableau 6 – Excipients utilisés dans les procédés de lyophilisation et de compression.	99
Tableau 7 – Paramètres utilisés lors du procédé de spray-drying.	103
Tableau 8 – Paramètres de l'étude de stabilité.	112
Tableau 9 – Energie plastique des différents excipients comprimés à 150 MPa.	128
Tableau 10 – BFI (Brittle Fracture Index) des excipients étudiés à différentes pressions de compression.	133
Tableau 11 – Caractérisations physico-chimiques des trois excipients étudiés. (FD : lyophilisé, SD : atomisé, CCP : cristallin, CCMP : cristallin broyé).....	145
Tableau 12 – Valeurs expérimentales du BFI calculées pour les différents produits étudiés.	164
Tableau 13 – Températures de transition vitreuse et humidité résiduelle des différents échantillons analysés. FD T10%, FD T15% et FD T30% représentent les échantillons de FD tréhalose obtenus à partir de solutions de concentrations 10, 15 et 30% m/v respectivement. FD L10%, FD L15% et FD L20% représentent les échantillons de FD lactose obtenus à partir de solutions de concentrations 10, 15 et 20% m/v respectivement.	171
Tableau 14 – Valeurs des masses volumiques pycnométriques et de surface spécifique des différents échantillons analysés.	176
Tableau 15 – Valeurs de BFI des différents comprimés étudiés.....	185
Tableau 16 – Echelle de classification du comportement en écoulement des poudres.	188

Introduction générale

La part des biomolécules (anticorps monoclonaux, protéines recombinantes, matériel génique de type petits ARN interférents ou ARNm ...) sur le marché pharmaceutique est en constante croissance et cela conduit à l'émergence de nouvelles approches thérapeutiques. En première intention, ces biomolécules sont formulées sous forme de solutions ou de dispersions aqueuses destinées à être administrées par voie parentérale. Cependant, les aspects en lien avec la stabilité de ces formes galéniques sont contraignants et l'arrivée rapide sur le marché des vaccins contre la Covid-19 a particulièrement mis en lumière les enjeux de stabilité et de logistique associés à ces formes pharmaceutiques (notamment en ce qui concerne le maintien de la chaîne du froid à très basse température).

Les biomolécules thérapeutiques constituent un axe majeur de recherche et de développement dans l'industrie pharmaceutique. En effet, compte tenu du succès de nombreuses biomolécules en tant que médicaments hautement efficaces (Haddadzadegan et al., 2022; Kinch, 2015) un vif intérêt a été accordé cette dernière décennie au développement de voies alternatives d'administration autres que la voie conventionnelle (la voie parentérale). Parmi celles-ci, la voie orale suscite un intérêt particulier en raison de ses nombreux avantages tels qu'une meilleure acceptation du traitement par les patients, une facilité d'administration ainsi qu'une haute sélectivité et des interactions hautement spécifiques avec leur cible, basées sur un mécanisme d'action bien défini (Craik et al., 2013). D'autres voies d'administration peuvent également être envisagées comme par exemple, la voie buccale, nasale ou encore vaginale... Quand il s'agit d'une administration par voie orale, les comprimés représentent la forme galénique solide la plus fréquemment utilisée.

Les biomolécules sont souvent obtenues au cours des procédés primaires et après purification sous forme de formulations liquides, qui sont sujettes à des instabilités physico-chimiques pouvant entraîner la perte de leur activité.

Par conséquent, différentes techniques de séchage ont été et sont encore étudiées afin d'améliorer la stabilité des biomolécules et potentiellement, d'obtenir des systèmes solides nécessaires à la production de comprimés. La lyophilisation est la méthode de choix pour l'obtention de formulations biopharmaceutiques sous forme de poudre. Une autre technique souvent mise en œuvre est la pulvérisation ou atomisation (spray-drying). Il convient de noter immédiatement que la structure tridimensionnelle de ces biomolécules est sensible aux conditions environnementales et peut être altérée pendant ces opérations de dessiccation (Otsuka et al., 2006), étant donné qu'elles sont soumises à des contraintes de température et/ou de changement d'état du liquide environnant (congélation, évaporation). De même, si un procédé de compression est envisagé après dessiccation

et obtention d'une poudre, cette opération va générer des sollicitations mécaniques fortes (pression de compression, frictions ...) également susceptibles d'altérer les structures moléculaires des biomolécules.

Afin de stabiliser et de protéger les biomolécules pendant les processus de séchage, il est donc important d'adapter la composition de la formulation à la nature du principe actif à sécher. Généralement, les biomolécules sont des produits à forte activité thérapeutique qui sont administrés à faible dose, et sont instables en solution du fait de leur nature, de leur structure chimique, de leur poids moléculaire élevé (Hedoux, 2015) et des conformations tridimensionnelles associées indispensables pour obtenir les effets biologiques et thérapeutiques escomptés. Pour pouvoir s'affranchir de ces limitations (effet de la température, des variations de pH, de la présence de cristaux de glace et d'une déshydratation importante), des excipients ayant différents rôles peuvent être ajoutés aux solutions avant le procédé de séchage. Il est donc important de prendre en compte la nature et la concentration de ces excipients ajoutés lors de la conception des conditions opératoires des cycles de lyophilisation ou d'atomisation. Parmi les grandes familles d'excipients, il est possible de citer les agents tampon qui régulent le pH, les agents stabilisants (cryoprotecteurs efficaces à basses températures et lyoprotecteurs qui stabilisent les biomolécules lors de la déshydratation) et les agents de masse dont le rôle est de conférer une rigidité et un volume aux poudres.

Pour tenter de mieux définir les conditions de dessiccation des biomolécules, le premier objectif de ce travail a été de concevoir une formulation « modèle » séchée par lyophilisation ou par atomisation et de caractériser les solides déshydratés obtenus à l'issue de ces procédés de séchage. Une protéine modèle (la lactate déshydrogénase) a ensuite été intégrée à cette formulation afin de tester la conservation de l'activité enzymatique de la protéine juste après lyophilisation puis après compression. Une première étape a donc été la fabrication de comprimés pharmaceutiques par compression à partir des poudres obtenues après séchage pour évaluer leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leur comportement en compression. En effet, il est admis que les produits obtenus après séchage par lyophilisation ou par atomisation, présentent des structures et des textures différentes selon le procédé mis en œuvre et souvent différentes de celles des excipients conventionnellement utilisés en compression pharmaceutique (ces derniers étant le plus souvent obtenus par cristallisation). Dans un second temps, l'ajout d'une protéine modèle dans les formulations servira à évaluer l'impact des procédés de séchage et de compression sur la conservation de son activité enzymatique. Pour répondre à ces objectifs, ce manuscrit sera réparti en six chapitres.

Le premier chapitre de ce manuscrit expose l'état actuel de l'art et des connaissances dans les domaines couverts par ce projet de thèse. Il aborde notamment les divers aspects liés aux paramètres

de formulation et de procédé pour le développement galénique des biomolécules sous forme de comprimé. Les procédés de lyophilisation, d'atomisation et de compression sont ainsi développés. Une attention particulière sera portée aux excipients utilisés lors ces processus et à l'influence des procédés de séchage et de compression sur l'activité biologique des biomolécules.

Le second chapitre est consacré aux différents matériels et méthodes utilisés au cours de ce projet.

Les chapitres trois, quatre et cinq présentent les résultats de l'étude sur le comportement en compression et les propriétés physico-chimiques de divers excipients avant et après séchage par lyophilisation ou atomisation.

Le troisième chapitre examine spécifiquement le comportement en compression et les caractéristiques physico-chimiques du tréhalose lyophilisé, en le comparant à d'autres excipients conventionnellement utilisés en compression directe. Le quatrième chapitre approfondit l'étude du comportement du tréhalose lyophilisé, cette fois en le comparant à d'autres excipients lyophilisés tels que le lactose et le mannitol. Les propriétés physico-chimiques et le comportement en compression sont également examinés sur différentes formes de tréhalose, lactose et mannitol : cristalline, broyée et atomisée. Le cinquième chapitre se concentre sur l'impact des modifications des paramètres de formulation (augmentation de la concentration) de tréhalose et de lactose sur le comportement en compression et l'écoulement de la poudre, dans le but d'améliorer la facilité de mise en œuvre par le procédé de compression de ces formulations.

Enfin, le chapitre six présente les résultats de l'ajout d'une protéine modèle, la lactate déshydrogénase, aux formulations, afin d'évaluer l'influence des paramètres de formulation et des procédés de lyophilisation et de compression sur son activité enzymatique. Ce chapitre se conclut par une étude de stabilité sur six mois, portant sur des lyophilisats et des comprimés contenant de la lactate déshydrogénase.

Dans leur ensemble, ces résultats offrent une première indication sur la faisabilité de produire des comprimés à partir de poudre lyophilisée, contenant une protéine tout en préservant son activité biologique pendant plusieurs mois.

Chapitre 1. Etat de l'art

SOMMAIRE

1.1	La lyophilisation.....	19
1.1.1	Equipement et fonctionnement	19
1.1.2	Description du procédé de lyophilisation.....	20
1.1.2.1	La congélation.....	22
1.1.2.2	Les transferts de chaleurs pendant l'étape de congélation (Pikal et al., 1984).....	29
1.1.2.3	La dessiccation primaire	30
1.1.2.4	La dessiccation secondaire.....	33
1.1.3	Les excipients de lyophilisation.....	34
1.1.3.1	Les grandes familles d'excipients	35
1.1.4	La surface spécifique des excipients lyophilisés	51
1.1.5	Les critères de qualité pour un lyophilisat	53
1.1.6	Les avantages et les inconvénients de la lyophilisation pharmaceutique	55
1.2	Le séchage par atomisation	57
1.2.1	Description du procédé d'atomisation	57
1.2.2	Les différents systèmes d'atomiseurs	59
1.2.3	Les différents types de buses	60
1.2.4	Modes de contact pulvérisation-air de séchage	61
1.2.5	Effets des paramètres du procédé et des formulations	61
1.2.6	Atomisation des différents excipients.....	63
1.2.7	Les avantages et les inconvénients du procédé d'atomisation.....	67
1.3	Le comprimé et la compression pharmaceutique	69
1.3.1	La compression pharmaceutique.....	69
1.3.2	Principe de la compression.....	70
1.3.2.1	Instrumentation des presses	70
1.3.2.2	Les étapes du procédé.....	71
1.3.2.3	L'énergie plastique	74
1.3.3	Les différentes machines à compression	75
1.3.4	Avantages et inconvénients de la compression directe.....	77
1.3.5	Les excipients.....	77
1.3.6	Etudes et paramètres permettant la caractérisation des systèmes granulaires en compression.....	79
1.3.6.1	La porosité	79
1.3.6.2	La compressibilité	80
1.3.6.3	Le recouvrement élastique	82

1.3.6.4	Résistance à la traction, compactibilité et tablétabilité	83
1.3.6.5	Le BFI (Brittle Fracture Index)	85
1.3.6.6	La viscoélasticité	87
1.3.7	Cas des excipients particuliers (le lactose, le mannitol et le saccharose)	88
1.3.8	Influence de la compression pharmaceutique sur les propriétés biologiques des molécules thérapeutiques.....	93
1.4	Conclusion	97

1.1 La lyophilisation

La lyophilisation (freeze drying en anglais, FD) est la technique de séchage la plus utilisée dans les industries pharmaceutiques et biopharmaceutiques. C'est un procédé de séchage où le solvant est congelé à basses températures puis éliminé par sublimation. La sublimation est un processus physique de changement d'état d'un corps de son état solide vers son état gazeux sans passer par l'état liquide. Même si la lyophilisation permet d'éviter le chauffage à haute température en favorisant la sublimation (passage de l'état solide à l'état gazeux), et de potentiellement s'affranchir de l'altération des biomolécules thermosensibles, c'est un procédé qui est long, complexe et qui demande une optimisation de la formulation en amont ainsi qu'une optimisation des paramètres du procédé. L'optimisation de la formulation demande l'ajout de différents types d'adjuvants, en prenant en considération la nature de la biomolécule à lyophiliser afin de permettre sa protection pendant les différentes phases du procédé puis de conservation. Du point de vue procédé, l'optimisation du cycle de lyophilisation consiste à faire varier différents paramètres tels que la pression et la température pendant les étapes de congélation et de séchage de sorte à obtenir le cycle le plus court possible afin de réduire les coûts énergétiques, tout en parvenant à obtenir des lyophilisats conformes aux normes requises pour la commercialisation et à préserver l'activité de la biomolécule en question. Pour pouvoir réaliser ce travail d'optimisation, il est nécessaire de comprendre de nombreux phénomènes physiques tels que les transferts thermiques, les transferts de matières et les transformations de phase qui surviennent au cours du cycle.

1.1.1 Equipement et fonctionnement

Les éléments dont un lyophilisateur est toujours constitué sont schématisés dans la **Figure 1**.

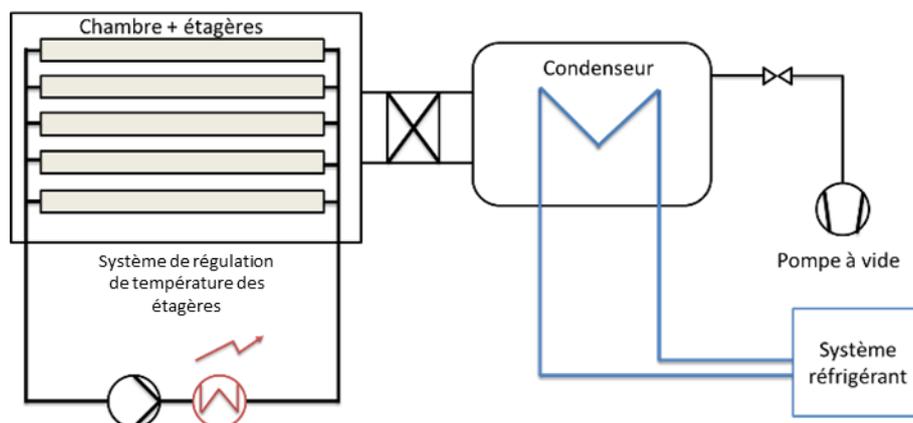


Figure 1 – Schéma d'un lyophilisateur avec ses trois constituants principaux.

La chambre de séchage est une enceinte hermétiquement fermée qui permet d'atteindre des niveaux de vide acceptables. Elle abrite des étagères creuses dans lesquelles circule un fluide (huile de silicone fluide en générale) qui permet le réglage de la température afin d'initier les phénomènes de transferts décrits dans la partie **1.1.2.2**. Les formulations sont placées sur ces étagères soit dans des flacons, soit dans des plateaux.

Le condenseur peut avoir des localisations différentes, dans la chambre de séchage ou à l'extérieur selon le modèle de l'appareil. Dans le deuxième cas, il est porté à basse température et permet de piéger la vapeur d'eau issue du phénomène de sublimation.

Le système de pompage (pompe à 1 ou 2 étages) est situé après le condenseur. Les systèmes utilisés permettent d'atteindre des pressions de l'ordre de 15 à 25 μbar , et les vitesses de pompage peuvent varier de 200 à 5000 litres par minute (Hedoux, 2015).

Il existe plusieurs types de lyophilisateurs sur le marché, des lyophilisateurs de laboratoire dont les surfaces d'étagères peuvent varier de 0,03 m^2 à 0,135 m^2 , des lyophilisateurs pilotes (avec des surfaces d'étagères de 3 à 5 m^2) et des lyophilisateurs industriels pouvant atteindre des dimensions allant jusqu'à 200 m^2 . Actuellement, de nouvelles technologies sont en train d'émerger pour optimiser la lyophilisation. Parmi ces technologies, la lyophilisation assistée par micro-onde vise à accélérer le séchage tout en améliorant la qualité finale du lyophilisat (Fan et al., 2019). Une autre avancée est la conception d'un procédé de lyophilisation en continu qui permet de s'affranchir des différents problèmes observés avec la lyophilisation par lot, tels que les transferts de chaleurs irréguliers à l'origine d'une inhomogénéité de la température dans les flacons même au sein du même lot et d'une variabilité de la qualité du produit d'un lot à l'autre (De Meyer et al., 2015).

1.1.2 Description du procédé de lyophilisation

Au préalable de la description du procédé de lyophilisation en lui-même, il est important de décrire comment s'opèrent les changements d'états de l'eau en considérant le diagramme de phase de l'eau en tant que corps pur (**Figure 2**). Les domaines de pression et de température pouvant donner lieu à une sublimation sont restreints. L'eau à l'état liquide à température ambiante devra premièrement être congelée par abaissement de la température (la cristallisation de l'eau est une transition de phase exothermique). Une fois l'eau congelée, l'étape suivante est un abaissement de la pression, jusqu'à atteindre un niveau suffisamment bas, qui permet, à la température considérée, la transformation de la glace en gaz par sublimation (la transition de phase solide/gaz est une transformation endothermique).

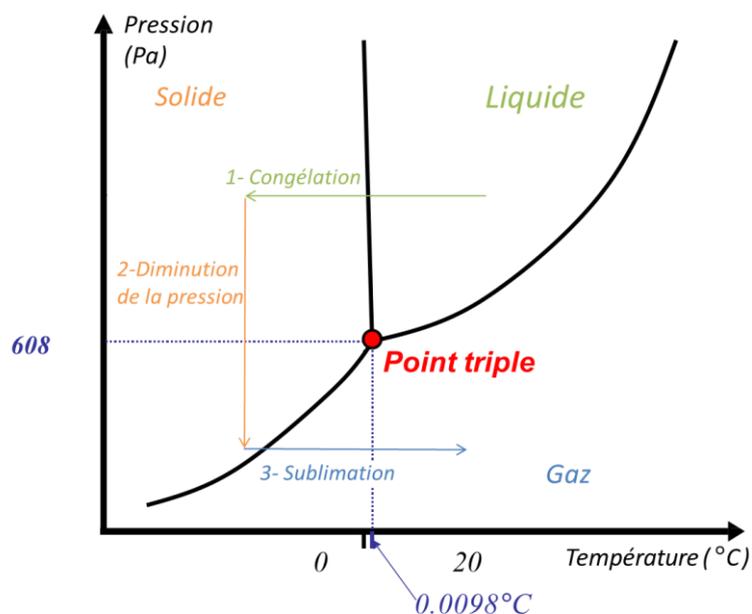


Figure 2 – Diagramme d'état de l'eau montrant les différents changements d'états pendant un cycle de lyophilisation.

Un cycle de lyophilisation consiste donc à congeler les formulations jusqu'à des niveaux de température suffisamment bas et par la suite, à diminuer la pression et à fournir de l'énergie en augmentant la température afin que la sublimation s'opère. Les étapes d'un cycle de lyophilisation sont associées à différentes transitions de phases (congélation et sublimation) et à différents transferts (transferts de chaleur et de matières). La première étape du cycle est la congélation où des transferts de chaleurs sont mis en jeu, suivie de la dessiccation primaire (étape de sublimation) où les principaux transferts de matière s'opèrent. L'étape finale est la dessiccation secondaire où l'eau liée est éliminée.

La congélation démarre dès que les échantillons liquides sont placés dans le lyophilisateur (**Figure 3 -1**). Au cours de cette phase, la température des étagères ainsi que celle des échantillons diminuent progressivement, conduisant à la formation de cristaux de glace par abaissement de la température. Initialement, les premiers noyaux de glace se forment à la température de nucléation, suivie d'une augmentation de la température jusqu'à la température de fusion (**Figure 3 - 2**). Ce processus, appelé surfusion, sera expliqué ultérieurement. La dernière étape de la congélation consiste à abaisser la température des échantillons jusqu'au niveau prédéterminé par la température des étagères, assurant ainsi la congélation totale de l'échantillon (**Figure 3 - 3**). Cette phase de congélation est accompagnée de transferts de chaleur, qui seront examinés plus en détail par la suite.

Après la congélation, la dessiccation primaire débute par la réduction de la pression dans la chambre de séchage à des niveaux suffisamment bas, accompagnée d'une augmentation de la température

des étagères (**Figure 3 - 4**) et du produit (**Figure 3 - 5**). Les transferts de chaleurs mis en jeu durant cette étape favorisent ainsi les transferts de matière lors de la sublimation des cristaux de glace. Cette étape, la plus longue et la plus coûteuse du processus, permet d'éliminer la majeure partie de l'eau. Enfin, pendant la dessiccation secondaire le vide est maintenu et la température des étagères est augmentée pour favoriser l'élimination de l'eau résiduelle qui n'a pas été transformée en glace pendant la congélation. Ce stade implique la désorption de l'eau de la matrice vitreuse formée pendant la congélation. Généralement, la température des étagères est maintenue légèrement au-dessus de la température ambiante (25 – 50 °C) (**Figure 3 - 6**).

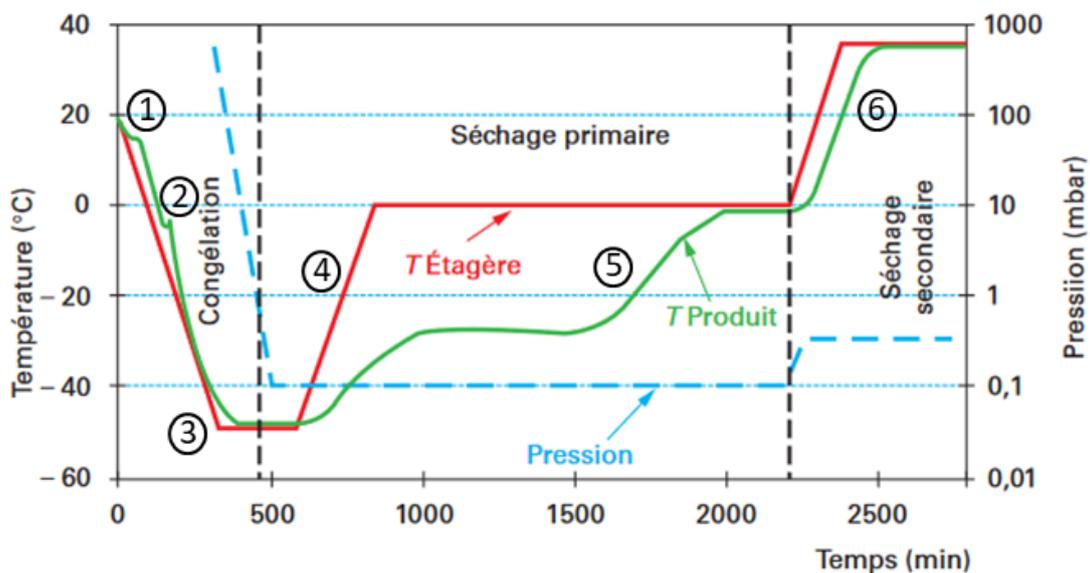


Figure 3 – Représentation schématique des variations de la température d'étagère, de la température du produit et de la pression dans la chambre au cours des trois étapes d'un cycle de lyophilisation (adapté de (Hedoux, 2015)).

1.1.2.1 La congélation

La première étape du procédé de lyophilisation est la **congélation**. Cette étape permet dans un premier temps, la transition de l'eau pure (eau libre) de l'état liquide à l'état solide sous forme de cristaux de glace. Dans le cas de l'eau pure, la température de fusion est de 0 °C. Par contre, l'ajout d'un soluté dans la solution induit à une diminution de cette température appelé abaissement cryoscopique.

Au cours de la phase de congélation, par effet cinétique, un phénomène de surfusion apparaît. La surfusion est la phase, au cours du refroidissement, où l'eau reste en phase liquide bien que sa température soit plus basse que son point de fusion. Ce phénomène est fréquemment visualisé lors de l'étape de congélation et tient au fait que la solution doit atteindre la température de nucléation qui

est plus basse que la température de fusion et dépendant de la vitesse de refroidissement avant que la croissance cristalline puisse opérer et permettre la solidification effective de la totalité de l'eau libre (**Figure 4**). Lorsque la vitesse de refroidissement est faible, le degré de surfusion est faible et les cristaux de glace sont de grande taille (Izutsu, 2018; Pisano et al., 2019). En revanche, lorsque la vitesse de refroidissement est élevée, le degré de surfusion est élevé et les cristaux de glace sont de petite taille (Kasper and Friess, 2011).

La congélation de l'eau au cours de la lyophilisation est un procédé complexe, surtout quand il s'agit de formulations pharmaceutiques. Trois étapes se succèdent au cours de la congélation (Searles et al., 2001):

- Refroidissement de la solution en dessous de la température d'équilibre avec une rampe de congélation bien définie.
- Nucléation primaire : c'est la formation des premiers nucléis stables de glace (eau libre dans le système). La température de nucléation est fondamentalement dépendante de la cinétique de refroidissement imposée au système. Elle peut varier de quelques degrés en dessous de 0 °C (congélation lente) à plusieurs dizaines de degrés en dessous de 0 °C (congélation très rapide).
- La croissance cristalline (cristallisation de l'eau libre) est l'évolution des nucléis de glace en cristaux de glace conduisant à la solidification sous forme cristalline de la totalité de l'eau libre. Cette phase de croissance cristalline se situe dans l'intervalle de température t_n - t_s (température de nucléation – température de solidification totale).

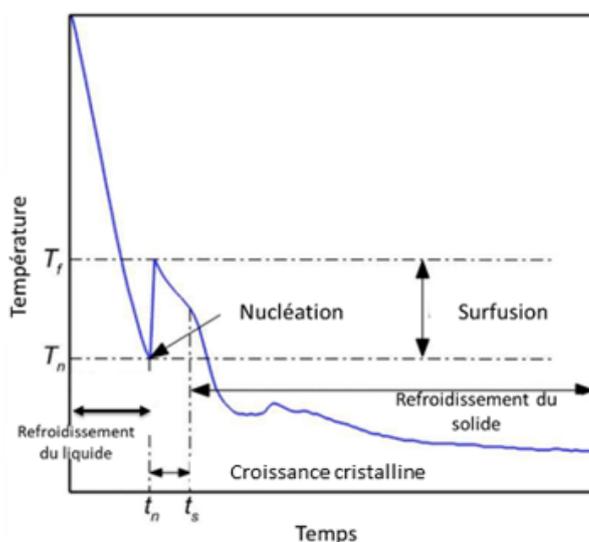


Figure 4 – Représentation schématique de l'évolution de la température du produit pendant la phase de congélation selon une rampe de température de refroidissement définie (Pierre Tchoreloff, 2024).

L'eau pure (c'est-à-dire exempte d'impuretés et d'autres particules) peut être surfondue jusqu'à -48 °C (Moore and Molinero, 2011) dans des conditions de congélation rapides, mais la surfusion des formulations pharmaceutiques congelées dans des lyophilisateurs est généralement observée aux alentours de -20 °C (Searles et al., 2001) dans des conditions de congélation classiques, de l'ordre de -1 °C/mn.

Pendant la nucléation primaire, qui débute une fois la température de nucléation atteinte, le nombre de sites de nucléation est d'autant plus grand que le degré de surfusion est élevé. La vitesse de nucléation définit donc le nombre de cristaux de glace qui vont se former et leur taille finale pour une quantité de matière donnée. La cristallisation ou la croissance cristalline s'effectue par apport de molécules d'eau sur les nucléis formés, le système étant hors d'équilibre (surfusion). Cette phase de croissance des cristaux de glace est exothermique et la température du mélange glace-liquide augmente jusqu'à atteindre la température de congélation d'équilibre. La cristallisation ne se produit pas instantanément. C'est un phénomène qui s'opère selon sa cinétique propre, en parallèle à l'évacuation en continue de la chaleur, jusqu'à la transformation totale de l'eau cristallisable, de l'état liquide à l'état solide (Patapoff and Overcashier, 2002). C'est à cette température d'équilibre que la cristallisation va essentiellement être réalisée puis se terminer à une température légèrement inférieure T_s , après consommation de la quasi-totalité des molécules d'eau libre. La température du produit commence alors à chuter, la rampe de refroidissement étant maintenue constante pendant toute cette phase (**Figure 4**).

Le degré de surfusion est un paramètre très important car il détermine le phénomène de nucléation (du point de vue cinétique). Plus la surfusion est importante, plus la nucléation est importante. Dans ces conditions, la chaleur de cristallisation sera absorbée majoritairement par la solution surfondue au moment de la nucléation et le temps de plateau à la température d'équilibre sera plus court (Geidobler and Winter, 2013).

La vitesse de la croissance cristalline dépend fortement de la température de nucléation et donc du degré de surfusion.

- Pour une température de nucléation basse (degré de surfusion élevé) : la vitesse de nucléation est grande générant un grand nombre de nucléis et la phase de croissance cristalline est plus rapide car elle consomme moins de matière. Dans ce cas, il y a formation de nombreux petits cristaux de glace et une grande partie de l'eau cristallisable cristallise instantanément après nucléation (Geidobler and Winter, 2013).
- Pour une température de nucléation plus élevée (degré de surfusion faible), le nombre de nucléis est plus faible et la croissance cristalline est plus importante et plus lente car elle consomme davantage de matière et s'effectue à une température plus élevée. Dans ce cas, il y a formation de cristaux moins nombreux mais plus gros. Au contraire du premier cas, une

plus petite quantité de glace se forme instantanément et la croissance cristalline se prolonge plus longtemps (Geidobler and Winter, 2013).

Au fur et à mesure de la croissance cristalline, la concentration des constituants de solutés de la formulation est augmentée dans la région interstitielle entre les cristaux de glace en croissance. La concentration totale en soluté augmente rapidement. Elle ne dépend que de la température pour une concentration initiale en soluté donnée. En refroidissant d'avantage, la concentration de la solution augmente jusqu'à une concentration C'_g et une température T'_g critiques en dessous de laquelle la solution concentrée se solidifie soit sous la forme d'un mélange eutectique qui cristallise, soit par vitrification/amorphisation (Cameron, 2013) selon le comportement du système et la vitesse de refroidissement. Lorsqu'une telle solution est refroidie, deux phases sont donc présentes, la glace et la solution concentrée solidifiée. La composition de la solution concentrée est déterminée via le diagramme de phase binaire eau/soluté, spécifique de chaque soluté. Par exemple, le diagramme de phase binaire eau/saccharose (**Figure 5**), montre qu'une solution de saccharose 5% (m/v) refroidie présente deux phases (glace + solution concentrée de saccharose). La concentration de cette solution augmente à fur et à mesure que la température diminue jusqu'à atteindre la concentration critique ($C'_g = 80\%$ m/v dans le cas du saccharose) à une température T'_g de $-33\text{ }^\circ\text{C}$. En dessous de cette température, la solution concentrée se solidifie. C'est à ce stade que la sublimation peut commencer.

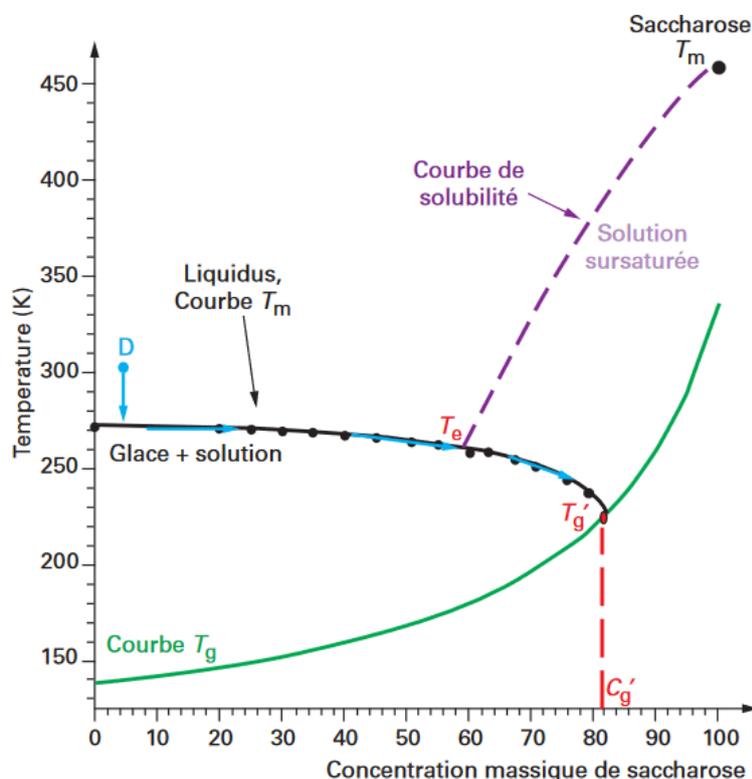


Figure 5 – Diagramme de phase binaire du mélange eau/saccharose. (Hedoux, 2015).

Pour la plupart des formulations utilisées en lyophilisation, la zone d'intérêt de ces diagrammes de phases correspond aux domaines de faible concentration en soluté. Le système, au cours du refroidissement, suit donc la courbe (liquidus) d'équilibre de congélation de l'eau en présence du soluté avec une augmentation progressive de la teneur en soluté lorsque plus de molécules d'eau pure sont impliquées dans la formation de glace. La température la plus basse à laquelle le soluté reste liquide est la température de fusion eutectique (T_{eu}) pour les systèmes eutectiques. Lorsque la solution atteint T_{eu} et une certaine concentration de soluté (C_{eu}), la courbe de congélation rencontrera le solidus. Le concentré de congélation est alors saturé et la congélation eutectique (cristallisation du soluté) se produira (Cameron, 2013; Nail et al., 2002).

Le système ne peut donc être complètement solidifié qu'en dessous de T_{eu} . T_{eu} et C_{eu} sont indépendants de la concentration initiale de la solution. En général, plus la solubilité d'un soluté donné dans l'eau est faible, plus T_{eu} est élevé (Nail et al., 2002).

Le changement de phase liquide solide est extrêmement différent pour les composés poly hydroxylés, comme le saccharose, qui ne cristallisent pas du tout à partir d'une solution au cours de la congélation (Franks and Auffret, 2008). Le fait que le saccharose ne cristallise pas pendant la congélation est une indication de sa structure cristalline extrêmement complexe (Franks and Auffret, 2008). Les interactions entre les groupes -OH du sucre et celles entre les groupes -OH du sucre et les molécules d'eau sont très similaires en termes d'énergie et de configuration, ce qui entraîne des probabilités de nucléation très faibles (Franks and Auffret, 2008). Dans ce cas, l'eau continue à cristalliser au-delà de la température de fusion eutectique, et la solution devient de plus en plus sursaturée et visqueuse. La viscosité croissante ralentit la cristallisation de la glace jusqu'à ce qu'à une certaine température caractéristique, aucune autre congélation ne se produise (Franks and Auffret, 2008). Cela s'appelle la vitrification (Liu, 2006) ou amorphisation qui correspond à l'obtention d'un solide non organisé mais qui présente les propriétés d'un solide par le fait du niveau de viscosité très élevé atteint (10^{12} à 10^{14} cPoise) qui « fige » le système. A ce stade, il y a absence presque totale de mobilité moléculaire. La température à laquelle ce mécanisme de solidification par amorphisation se produit est appelée température de transition vitreuse (T_g') (Franks and Auffret, 2008). Il est à noter que l'augmentation de la viscosité au cours de cette phase de refroidissement s'effectue progressivement et correspond donc à un domaine de température centré sur la T_g' . Le système amorphe formé est composé à la fois du soluté à une certaine concentration particulière, en général noté C_g' (propre à chaque soluté) et d'une certaine quantité d'eau non cristallisée (« unfrozen water » en anglais) à une concentration en général notée W_g' (Jennings, 1999; Nail et al., 2002).

Le système amorphe est thermodynamiquement instable par rapport à la forme cristalline, mais la viscosité est suffisamment élevée pour que les mouvements moléculaires soient extrêmement limités, de l'ordre du millimètre par an (Franks, 1998; Franks and Auffret, 2008; Kett et al., 2005). Il en résulte

l'obtention d'un système amorphe mécaniquement résistant et dont les propriétés s'apparentent à celle d'un solide.

Dans le cas des matériaux cristallins, les « systèmes eutectiques », presque toute l'eau est congelée et peut être facilement éliminée lors du séchage primaire. Par contre, dans les solutés amorphes, environ 20% de l'eau non congelée est associée à la solution solide et doit être éliminée par un processus de diffusion lors du séchage secondaire (Jennings, 1999).

Bien que la température de nucléation soit le paramètre qui influence le plus la morphologie (nombre et taille des cristaux) de la glace (Shibkov et al., 2003), d'autres paramètres tels que les solutés et leurs concentrations peuvent aussi avoir des effets (Luyet, 1958). La température de nucléation détermine la taille des cristaux formés, et par la suite, possède une influence sur le temps de séchage et la texture (porosité) du lyophilisat final. Une étude a montré que des cristaux plus larges accélèrent la sublimation, alors que des cristaux de petite taille la ralentissent (Hottot et al., 2004, 2007). Cela peut être expliqué par le fait que les cristaux de grande taille génèrent des pores plus larges, ce qui apporte moins de résistance au flux de vapeur d'eau pendant la sublimation (Konstantinidis et al., 2011).

Il existe plusieurs méthodes pour induire et contrôler la nucléation. Parmi ces méthodes, il y a l'induction de la nucléation par de fortes impulsions électriques (Petersen et al., 2006) qui ne peut être utilisée que pour les formulations à base de sels. Une autre méthode est l'utilisation des ondes acoustiques ultrasonores (Saclier et al., 2010) qui présente une limite d'utilisation à un environnement restreint. Elle n'est pas utilisable dans des lyophilisateurs industriels. La congélation induite par le vide est une autre technique (Kramer et al., 2002) moins utilisée, qui consiste à abaisser la pression de la chambre, ce qui provoquera la congélation en surface. L'inconvénient de cette technique réside dans l'impact sur l'apparence du produit en fin de cycle. Finalement, la technique la plus connue et la plus simple à réaliser est la technique appelée « ice-fog technique » (littéralement, la technique du brouillard glacé) (Rambhatla et al., 2004). Cette technique consiste à injecter un flux d'azote gazeux refroidi dans la chambre de séchage en cours de congélation à une température donnée afin d'initier l'ensemencement de petits cristaux en surface des flacons pour provoquer la nucléation.

Un point important à considérer est que lors de la congélation, la cristallisation de l'eau ne se fait pas à volume constant (la masse volumique de l'eau à l'état liquide est de 1 g/ml et de 0,92 g/ml à l'état solide). Dans le cas de la congélation de formulations contenant des biomolécules telles que les protéines, cette expansion volumique associée à la cristallisation peut induire des stress mécaniques sur les biomolécules et générer des déformations des structures tridimensionnelles des protéines. De plus l'augmentation de la concentration en protéines dans la fraction non congelée peut entraîner des interactions protéines-protéines menant à une agrégation. De la même façon, l'augmentation de la concentration des tampons peut entraîner des variations de pH ou encore leur cristallisation

(également avec augmentation de volume) à l'origine d'une dégradation des protéines dans la solution non congelée ou à l'interface glace-eau (Hedoux, 2015). Ces différents stress peuvent être minimisés en apportant des modifications à la formulation ou bien en jouant sur les paramètres de conduite du procédé. Il est possible de congeler les produits en utilisant différentes méthodes telles que l'utilisation de l'azote liquide (congélation rapide conduisant à la vitrification du système), une congélation progressive en contrôlant les températures d'étagères ou le chargement des flacons sur des étagères pré-refroidies. Ces différents types de congélations entraînent différents effets de refroidissement en modifiant les effets de nucléation et de croissance cristalline et génèrent ainsi des systèmes caractérisés par différentes tailles de cristaux (Jiang and Nail, 1998). Par exemple, il a été démontré par (Tang and Pikal, 2004) qu'un taux de refroidissement modéré de -1 °C/min est considéré comme un taux de congélation acceptable car il permet à la fois de bons niveaux de surfusion qui favorisent la nucléation et la création d'une grande surface de glace et des temps de congélations/croissance cristalline relativement rapides. Dans cette même étude, il est également conseillé de maintenir les flacons à la température finale pendant un temps qui dépend du taux de remplissage des flacons. Cela permet de garantir l'uniformité de la température dans l'ensemble du système solidifié à une température inférieure à la température de congélation totale.

Finalement, afin de concevoir un cycle de lyophilisation optimisé et pouvoir définir les conditions de températures pendant l'étape de congélation, il est important de définir les températures caractéristiques associées aux formulations réalisées :

- **La température de nucléation (T_n)** est la température à partir de laquelle il y a formation des premiers germes cristallins stables (nucléi) au cours du refroidissement de l'eau ou d'un mélange eutectique. Cette température signe le phénomène de surfusion lié au retard (effet cinétique) à la création des nucléi. Cette température dépend de la vitesse de refroidissement. Au cours d'un cycle de lyophilisation pour lequel la rampe d'abaissement de la température est de l'ordre de -1 °C/min , cette température est généralement $10\text{ à }20\text{ °C}$ en dessous de la T_f dans le cas de l'eau. Elle peut être variable en raison des phénomènes de nucléations hétérogènes aléatoires qui peuvent également survenir.
- **La température eutectique (T_{eu})** est la température minimale à laquelle peut être amené un mélange eau-excipient qui présente un comportement eutectique, tout en restant liquide. A cette température la solution concentrée (C_{eu}) se comporte comme un composé pur et cristallise sous la forme de petits cristaux des deux espèces intimement associées.
- **T_g'** correspond à la température de transition vitreuse d'un mélange eau-soluté qui a atteint sa composition limite, caractérisée par la concentration du soluté C'_g dans la solution concentrée et une concentration en molécules de solvant W'_g . Au cours de la congélation, à une température inférieure ou égale à T_g' , le système est à l'état solide amorphe et est mécaniquement suffisamment résistant pour pouvoir résister à la mise sous vide lors de

l'étape de sublimation. Si la température du produit dépasse la T_g' , le système perd en viscosité et passe à l'état caoutchouteux ce qui peut avoir des conséquences délétères dans la suite du procédé. Il y a un risque soit d'effondrement du lyophilisat sur lui-même lors de la sublimation (on parle de collapsus du système) soit d'ébullition (phénomène de « puffing ») en fonction de la température de conduite de l'étape de sublimation.

- **La température de congélation totale ou de solidification totale (T_s)** est la température à laquelle la totalité du système mis en refroidissement se solidifie. Cette température est obligatoirement plus faible que la T_g' dans le cas d'un composé amorphe ou que la T_{eu} dans le cas d'un composé cristallin. Il est généralement considéré que cette température de congélation totale se situe quelques degrés en dessous de la T_g' ou de la T_{eu} .

1.1.2.2 Les transferts de chaleurs pendant l'étape de congélation (Pikal et al., 1984)

La température dans la chambre de séchage du lyophilisateur peut être ajustée grâce à un liquide cryogénique (huile silicone de faible viscosité) circulant dans les étagères creuses. Les flacons contenant les formulations sont déposés dans des plateaux en aluminium ou bien directement sur les étagères.

Les transferts thermiques jouent un rôle très important pendant toutes les étapes de la lyophilisation. Ils sont nécessaires pour refroidir la formulation, former des cristaux de glace et finalement pour créer un gradient de température entre le produit congelé dans le flacon et l'étagère afin de favoriser la sublimation puis la dessiccation.

Les transferts de chaleurs peuvent être perturbés par plusieurs facteurs tels que l'inhomogénéité de températures sur la surface de l'étagère, le défaut de contact entre l'étagère et le plateau et le mauvais contact entre le fond du flacon et le plateau. Ces perturbations peuvent induire une différence de température allant jusqu'à 30 °C entre le plateau et le produit. L'**équation 1** exprime le flux de chaleur entre l'étagère et le flacon :

$$\frac{dQ}{dt} = A_{fl} K_{fl} (T_{\text{étag}} - T_p) \quad \text{Équation 1}$$

Où (A_{fl}) est la section transverse du flacon, (K_{fl}) est le coefficient de transfert thermique du flacon (cal/s.cm². °C), $T_{\text{étag}}$ et T_p sont respectivement les températures des étagères et du produit au fond du flacon.

(K_{fl}) est la somme de trois coefficients résultant de trois mécanismes différents, la conduction entre le flacon et le plateau au point de contact, le transfert de chaleur par les radiations provenant des

étagères, des côtés de l'enceinte et le phénomène de convection provenant du gaz circulant dans l'espace entre l'étagère et la base du flacon. Dans la plupart des cas, les transferts par conduction sont considérés comme étant majoritaires.

L'**équation 2** exprime les flux de chaleurs par radiation entre les étagères et le flacon (Pikal et al., 1984) :

$$\frac{dQ_r}{dt} = A_{fl} K_r e \sigma (T_2^4 - T_1^4) \quad \text{Équation 2}$$

Où (K_r) est le coefficient de radiation provenant des étagères et des côtés de l'enceinte, (e) est l'émissivité efficace de l'échange thermique (elle dépend des surfaces relatives de l'interface, de son émissivité et d'un facteur géométrique), (σ) est la constante de Stefan-Boltzmann et T_2 et T_1 sont respectivement les températures absolues de la surface des étagères et du flacon.

1.1.2.3 La dessiccation primaire

Après la congélation, la température est augmentée sur les plateaux, la pression est diminuée pour atteindre une valeur inférieure à la pression de vapeur saturante d'équilibre de l'eau à la température du produit congelé, et le **séchage primaire** débute. C'est pendant cette étape que se produit la sublimation qui consiste à éliminer l'eau précédemment congelée sous forme de cristaux de glace. C'est l'étape la plus longue et donc la plus onéreuse énergétiquement du procédé (Hedoux, 2015) car c'est pendant cette étape que se fait l'élimination de la majeure partie de l'eau.

Les principaux transferts de matières s'effectuent pendant cette étape du cycle. La sublimation est une transition de phase endothermique, donc cette étape nécessite un apport d'énergie (transferts de chaleur) pour permettre le transfert de masse. Le flux de chaleur par conduction dans la couche sèche suit la loi de Fourier et s'écrit en fonction du gradient de température selon l'**équation 3** (Pikal et al., 1984):

$$\frac{dQ}{dt} = A_{fl} K_G \frac{dT}{dx} = -A_{fl} K_G \frac{T_{fs} - T_p}{l_{max} - l} \quad \text{Équation 3}$$

Où (K_G) est la conductivité thermique de la couche congelée, (T_{fs}) est la température du produit au front de sublimation, (l_{max}) est l'épaisseur maximale de la couche congelée, (l) est l'épaisseur de la couche sèche et ($l_{max} - l$) est l'épaisseur de la couche congelée pendant le séchage primaire.

En effet, il existe une relation qui relie les flux de chaleurs (dQ/dt) pénétrant dans le produit aux flux de matières (dm/dt) accompagnant la sublimation. La cinétique de sublimation de la glace induite par les flux de chaleurs peut être modélisée par l'**équation 4** :

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \frac{dm}{dt} \quad \text{Équation 4}$$

Où ΔH_s est l'enthalpie de sublimation.

Le flux de matière durant le procédé de lyophilisation correspond à la sublimation de la glace en vapeur d'eau. Pikal et al. ont exprimé le flux de matière en terme de résistance au flux de vapeur d'eau du produit congelé jusqu'au condenseur, RFM (résistance au flux de matière) (Pikal et al., 1984). La vitesse de sublimation ($\frac{dm}{dt}$) est donnée par l'**équation 5** et est proportionnelle à :

$$\frac{dm}{dt} \propto \frac{P_{\text{glace}} - P_{\text{ch}}}{RFM} \quad \text{Équation 5}$$

Où ($P_{\text{glace}} - P_{\text{ch}}$) est la différence de pression entre la chambre de séchage et la pression de vapeur saturante de la glace (P_0) située à l'interface de sublimation et qui dépend de la température du produit. Deux facteurs s'opposent au flux de matière durant la lyophilisation : la résistance du produit et la résistance du bouchon et de la chambre.

La résistance du produit : Au fur et à mesure de la sublimation, il se crée une interface ou front de sublimation entre la partie sèche et la partie congelée. Le front de sublimation se déplace progressivement depuis la surface (situation initiale) vers la profondeur du produit. La vapeur issue de la sublimation de la glace doit s'évacuer en passant obligatoirement à travers la couche supérieure déjà séchée. Ce phénomène constitue une résistance au flux de matière qui sera dépendante de la structure de la couche poreuse séchée (RFM_p). La résistance au flux de matières engendrée par la couche sèche peut être calculée à partir de l'**équation 6** :

$$RFM_p = \frac{1}{A_p} \frac{3}{4} \frac{\tau^2}{\varepsilon} \frac{l}{d_{tc}} \sqrt{\frac{\pi RT}{2M_E}} \quad \text{Équation 6}$$

Où (A_p) est l'aire de la section du produit perpendiculairement à la direction du flux de la vapeur d'eau, (l) est l'épaisseur de la structure poreuse, (ε) est la porosité de la structure poreuse et (M_E) est la masse molaire de l'eau.

On considère dans cette équation que la structure du lyophilisat est formée de tubes capillaires tortueux de diamètre (d_{tc}) et de tortuosité (τ).

La résistance du bouchon du flacon : Dans l'industrie pharmaceutique, afin de réduire les contaminations lors de la sortie des flacons du lyophilisateur, les flacons sont souvent munis de bouchons crénelés engagés dans l'embouchure du flacon mais laissant un espace pour la diffusion de la vapeur d'eau. Ces bouchons permettent aussi la fermeture des flacons sous vide ou sous gaz inerte, avant l'ouverture de la chambre de séchage. La résistance de ces bouchons au passage du flux de matière, RFM_B s'exprime selon l'**équation 7** :

$$RFM_B = \frac{P_{fl} - P_{ch}}{dm/dt} \quad \text{Équation 7}$$

Où (P_{fl}) est la pression de vapeur dans le flacon au-dessus du produit et P_{ch} est la pression dans la chambre de séchage.

La résistance due au transfert des molécules d'eau à l'état gazeux, depuis la chambre de séchage jusqu'au condenseur. Cette résistance (RFM_{cond}) est donnée par l'**équation 8** :

$$RFM_{cond} = \frac{P_{ch} - P_{cond}}{N_{fl}(dm/dt)} \quad \text{Équation 8}$$

Où (P_{ch}) est la pression dans la chambre de séchage et (P_{cond}) est la pression au niveau du condenseur et (N_{fl}) est le nombre de flacons dans le lyophilisateur.

Toutes les résistances au flux de vapeur s'ajoutent entre elles pour donner une résistance totale (RFM_{tot}) donnée par l'**équation 9** :

$$RFM_{tot} = RFM_p + RFM_B + RFM_{cond} \quad \text{Équation 9}$$

(RFM_p) est généralement très élevée par rapport à (RFM_B) et (RFM_{cond}) qui sont souvent considérées comme relativement négligeables.

Il est très important d'optimiser les paramètres du procédé de sorte à réduire la durée de cette étape. La pression dans la chambre (P_c) et la température de l'étagère (T_e) sont les seuls paramètres contrôlables pendant cette étape. La littérature montre qu'une augmentation de la température du produit (T_p) de 1 °C, suffit pour réduire le temps de la dessiccation primaire de 13% (Pikal et al., 1990). Pour déterminer la température de produit (T_p) optimale, il est important de prendre en compte deux

températures critiques qui dépendent du produit à lyophiliser, la T_g' et la T_c . La T_c est la température au-dessus de laquelle il y a effondrement de la structure macroscopique du lyophilisat (Assegehegn et al., 2019). Elle est généralement 2 °C plus élevée que la T_g' pour les produits amorphes ou que la T_{eu} pour les produits cristallins en fin de lyophilisation. Le risque majeur lié au dépassement des températures critiques du produit est un effondrement structurel qui peut modifier les propriétés du lyophilisat (porosité, esthétique et stabilité). Pendant le processus de lyophilisation conventionnel, il est établi que le maintien de la T_p 2 ou 3 °C en dessous de la T_g' permettrait d'assurer des conditions de lyophilisation optimales et de conserver intacte l'organisation microscopique dans le lyophilisat afin de maintenir la stabilité des produits biopharmaceutiques (Tang and Pikal, 2004).

Toutefois, il a été démontré que l'effondrement n'influence pas nécessairement l'activité biologique des biomolécules (Schersch et al., 2010). Conseiller de fixer une T_p 2 à 3 °C en dessous de la T_g' ou de la T_{eu} a plutôt pour objectif l'obtention d'un lyophilisat élégant commercialement. Quant à la pression de la chambre de séchage (P_c), elle est optimisée en fonction de la température du produit pour obtenir la meilleure capacité de transfert de matière et est fixée entre 0,05 et 0,2 mbar (Tang and Pikal, 2004).

1.1.2.4 La dessiccation secondaire

La dernière étape du cycle de lyophilisation est la dessiccation secondaire. L'objectif de cette étape est de réduire l'humidité résiduelle à des niveaux optimisés (généralement de l'ordre de 1 %) pour assurer une bonne stabilité des lyophilisats à la fin du cycle. A la fin du séchage primaire, le produit contient toujours 5 à 20 % d'eau selon les formulations (Tang and Pikal, 2004). L'eau résiduelle qui n'a pas pu être cristallisée dans le cas d'un système amorphe ou qui a cristallisé dans le cas d'un système eutectique, est éliminée par désorption en augmentant graduellement la température du produit, en général jusqu'à une température légèrement supérieure à la température ambiante et en la maintenant pendant plusieurs heures. Cette température peut atteindre dans certains cas des valeurs plus élevées, jusqu'à 50 °C (Tang and Pikal, 2004). Pendant cette étape, il est important que la température du produit reste inférieure à la température de transition vitreuse T_g qui est fonction de son degré de solvation afin d'éviter le collapse. En effet, la T_g est la température au-dessus de laquelle le soluté pur ou plus ou moins solvato est passé d'un état solide vitreux à un état mou caoutchouteux. Cette transition s'effectue sur un domaine de température dans lequel la transformation s'effectue progressivement et ce domaine de température dépend du degré de solvation du soluté (les molécules de solvant jouent un rôle de plastifiant et diminuent la T_g quand leur concentration augmente). La T_g évolue donc progressivement au cours du cycle de lyophilisation depuis la valeur de T_g' jusqu'à la valeur de T_g du soluté sec.

Il est important d'augmenter lentement la température de l'étagère pendant la dessiccation secondaire afin d'éviter un risque de collapse du lyophilisat. Une cinétique de montée en température de 0,1 à 0,15 °C/min pour les produits amorphes est généralement considéré comme sûr et approprié (Tang and Pikal, 2004). Cependant, la vitesse de désorption de l'eau dépend de la pression de la chambre (P_c) et de la température du produit (T_p) (Pikal et al., 1990). De plus, il a été démontré par (Pikal et al., 1990) que pour éliminer une plus grande quantité d'eau résiduelle, il est préférable de maintenir une température d'étagère élevée pendant une courte période de temps plutôt qu'une température plus basse pendant une longue période.

Selon la formulation, un temps de séchage de 3 à 6 heures après l'atteinte de la température finale est optimal. Des études ont montrées que des biomolécules telles qu'une protéine comme l'hormone de croissance humaine, même exposée à des températures allant jusqu'à 100 °C dans des lyophilisats relativement humides (15 % d'humidité résiduelle) n'étaient pas dénaturées (Tang and Pikal, 2004). D'autres études menées avec d'autres protéines ont montrées que celles-ci n'étaient pas dénaturées à des températures allant jusqu'à 150 °C dans un lyophilisat très sec (Tang and Pikal, 2004). Des observations similaires ont également été constatées sur l'hormone de croissance bovine (Hageman, 1988).

Finalement, il est connu qu'une importante humidité résiduelle diminue la stabilité des lyophilisats durant leur stockage. C'est pour cela qu'à la fin d'un cycle de lyophilisation, il est recherché un pourcentage d'humidité résiduelle très bas (autour de 1 %). Or, dans le cas des protéines, ce n'est pas toujours le cas et le pourcentage d'humidité résiduelle est ajusté selon la biomolécule à lyophiliser afin d'avoir un produit dont la stabilité pendant le stockage est optimale (Hageman, 1988; Tang and Pikal, 2004).

1.1.3 Les excipients de lyophilisation

Afin de minimiser l'instabilité des biomolécules durant la préparation de la formulation, pendant la lyophilisation et même durant le stockage, l'ajout d'excipients est primordial.

Ces excipients sont connus comme étant des substances qui peuvent souvent représenter la majorité d'une formulation et dont le rôle est de conférer une stabilité au produit (Pramanick et al., 2013). Il est donc essentiel de bien choisir les excipients adaptés à la formulation sur la base d'un rationnel scientifique.

Il existe plusieurs critères qui permettent de choisir les excipients adéquats pour les formulations de biomolécules. Il s'agit des :

- Critères physicochimiques ;
- Critères pharmacocinétiques ;

- Risques d'interactions avec le médicament ;
- Coûts ;
- Exigences réglementaires opposables.

Un excipient idéal serait un produit chimiquement stable, inerte, sûr, multifonctionnel et rentable économiquement (Rayaprolu et al., 2018).

Le choix des excipients pour la lyophilisation est donc d'une grande importance, et est basé sur le type de la biomolécule à lyophiliser. Il est nécessaire que les excipients choisis répondent aux attentes suivantes :

- Protéger la biomolécule des risques d'instabilité.
- Assurer la formation d'un produit dont la structure a une résistance acceptable.
- Dans le cas d'une formulation destinée à être reconstituée, le lyophilisat obtenu doit avoir un temps de reconstitution acceptable.
- Une teneur en humidité résiduelle acceptable.
- Un excipient influence indirectement la durée du cycle de lyophilisation. Le choix de l'excipient devra prendre en compte ce paramètre d'un point de vue du rendement économique.

1.1.3.1 Les grandes familles d'excipients

Les grandes familles d'excipients utilisés en lyophilisation ainsi que leurs rôles sont les agents stabilisants, les agents de masse, les agents tampons et les agents tensioactifs.

Les agents stabilisants :

Ils sont utilisés pendant la lyophilisation des produits pharmaceutiques, et « protègent » les biomolécules des instabilités physiques et chimiques pendant les deux étapes du procédé, la congélation et le séchage. C'est la famille d'excipients la plus importante pour les formulations contenant des biomolécules. Il existe deux grands types d'agents stabilisants (Wang et al., 2004) :

- Les cryoprotecteurs qui protègent les biomolécules au cours de la congélation.
- Les lyoprotecteurs qui stabilisent les biomolécules pendant les étapes de séchage.

Il existe deux mécanismes décrits dans la littérature qui expliquent la façon dont ces excipients stabilisent les biomolécules. Le premier mécanisme est l'**hypothèse de vitrification** qui décrit l'immobilisation des molécules protéiques dans une matrice formée par les agents stabilisant sous forme amorphe. Cette matrice amorphe protège les biomolécules des effets mécaniques liés à la cristallisation de l'eau, en même temps qu'elle empêche leurs interactions et évite la modification de leurs structures (Green and Angell, 1989). Le deuxième mécanisme est l'**hypothèse du remplacement de l'eau** qui se base sur la théorie de formation de liaisons hydrogènes entre les

groupements hydroxyles des sucres utilisés (par exemple le saccharose ou le tréhalose) et les groupements polaires de la protéine. Ces liaisons hydrogène entre la protéine et le sucre remplacent les liaisons hydrogène entre la protéine et l'eau présent dans la formulation, une fois que ce dernier est éliminé pendant l'étape de séchage (Ohtake et al., 2011). La première hypothèse représente une stabilisation d'un point de vue cinétique, alors que la deuxième est une stabilisation thermodynamique (Mensink et al., 2017).

Pour choisir un agent stabilisant adéquat, il est important de connaître ses propriétés critiques. La T_g de l'excipient sec est un paramètre très important pour le choix des conditions de stockage et de transport (Roughton et al., 2012). En effet, après la lyophilisation, l'excipient amorphe et la protéine forment une matrice vitreuse caractérisée par une T_g . C'est en-dessous de cette température critique que le lyophilisat et la protéine sont les plus stables.

Le pourcentage d'humidité résiduelle est aussi un paramètre à prendre en considération (une humidité résiduelle égale à 1 % (m/v) est souvent considérée comme idéale). Sachant qu'une hausse du taux d'humidité résiduelle réduit la T_g (l'eau joue un rôle de plastifiant), il est important d'optimiser l'étape de dessiccation secondaire pour produire un lyophilisat capable de stabiliser la protéine pendant le stockage (Chang et al., 2005).

Finalement, les températures critiques T_g' (pour le système hydraté) et T_c sont aussi des paramètres très importants à considérer. Ces deux caractéristiques sont celles qui déterminent les conditions de congélation et la durée des cycles de lyophilisation. Un excipient ayant une T_g' inférieure à $-40\text{ }^\circ\text{C}$ induit des temps de lyophilisation très longs (Carpenter et al., 2002) du fait de la limitation des transferts thermiques à ces températures. Pour cela, il est préférable d'utiliser des agents stabilisants dont les T_g' et même la T_c sont les plus élevées possible afin de pouvoir réaliser une dessiccation primaire à une température de produit T_p plus élevée afin d'accélérer l'étape de dessiccation primaire et de s'affranchir du risque d'effondrement.

Parmi les agents stabilisants, il est possible de citer les disaccharides (saccharose, tréhalose...), les polyols (PEG pour polyéthylène glycol), certains polymères (PVP pour polyvinylpyrrolidone, les dextrans), ou encore les cyclodextrines. Dans la suite de ce paragraphe, nous avons fait le choix de détailler les excipients utilisés pour le travail expérimental, le saccharose et le tréhalose.

Le tréhalose :

Le tréhalose (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) est un disaccharide, cristallin, non réducteur (il ne possède pas de fonction aldéhyde qui confère la capacité de donneur d'électrons dans une réaction d'oxydo-réduction). Il est constitué de deux molécules de glucose liées par une liaison 1,1- α -glycosidique (**Figure 6**).

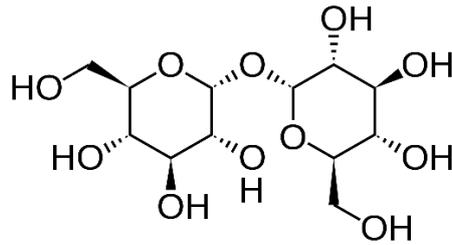


Figure 6 – Structure chimique du tréhalose.

L'utilisation d'un sucre non réducteur permet d'éviter la réaction de Maillard. Cette réaction se produit entre des sucres réducteurs et des composés qui portent des groupements aminés tels que les acides aminés des protéines et conduit à la formation d'une liaison covalente entre les deux. Cette réaction est à éviter car elle peut conduire à la modification de la charge des protéines, de leurs capacités de liaisons aux cibles et de leurs taux de dégradation, ce qui pourrait entraîner une réduction de leur efficacité et de leur stabilité (Zhang et al., 2009). C'est un sucre difficilement hydrolysé par les acides et la liaison glycosidique n'est pas clivée par l' α -glucosidase. Sa formule moléculaire est $C_{12}H_{22}O_{11}$ et il possède une masse moléculaire de 342,31 g/mol. Le tréhalose est souvent commercialisé sous sa forme cristalline di-hydraté. Le tréhalose di-hydraté possède une température de fusion T_f de 97 °C. Après l'élimination de l'eau à l'état lié, il se re solidifie à 130 °C et pour former le tréhalose anhydre dont la température de fusion est égale à 203 °C (Richards et al., 2002). Il existe deux polymorphes du tréhalose, le α,β (néotréhalose) et le β,β (isotréhalose), qui sont synthétiques et rarement trouvés dans la nature (Richards et al., 2002).

Le pseudo polymorphe α,α -tréhalose dihydraté est produit par extraction des levures et d'autres sources naturelles ou bien synthétisé chimiquement. Comme tout produit cristallin, le diffractogramme du tréhalose cristallin di-hydraté montre des pics caractéristiques de ce produit (**Figure 7**).

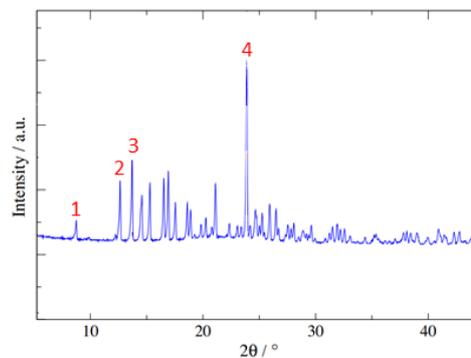


Figure 7 – Diffractogramme rayons X du tréhalose cristallin dihydraté. Pics caractéristiques : 1 - $2\theta = 8,9^\circ$, 2- $2\theta = 12,9^\circ$, 3- $2\theta = 13,9^\circ$, 4- $2\theta = 24,3^\circ$. Adapté de (Megarry et al., 2011).

Le tréhalose est très utilisé en tant que lyoprotecteur durant la lyophilisation du fait de sa capacité à générer des systèmes amorphes en milieu hydraté (Green and Angell, 1989; Randolph, 1997). Le diagramme de phase binaire Tréhalose/H₂O (**Figure 8**) permet de déterminer sa T_g' à une valeur de -30 °C et pour une concentration C'_g de 80 % m/m. La T_g du tréhalose à l'état sec est relativement élevée (107 °C) (Simperler et al., 2006). La T_c du tréhalose hydraté se situe à une valeur de -29 °C (Mehmood and Farooq, 2015). Ces propriétés font du tréhalose un excipient de choix pour la lyophilisation.

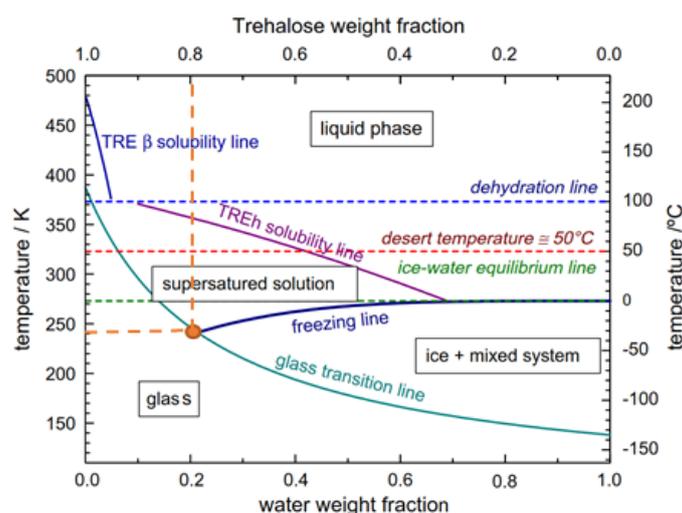


Figure 8 – Diagramme de phase (température-composition) du mélange eau-tréhalose (Cesàro et al., 2008).

La lyophilisation du tréhalose en présence de molécules biologiques est bien décrite dans la littérature. Dans leur étude, Kawai et Suzuki (Kawai and Suzuki, 2007) ont préparé des formulations de 1 ml contenant 100 µg de LDH (lactate déshydrogénase) en présence de 100 mg d'excipient (tréhalose, saccharose, maltose ou lactose). Ces formulations ont par la suite été congelées par immersion dans l'azote liquide pour au moins 1 minute pour ensuite être transférées dans le lyophilisateur pré-refroidi à -40 °C. La lyophilisation a alors débuté avec une pression de chambre de $3,0 \times 10^{-2}$ torr (0,04 mbar) en augmentant la température étagère jusqu'à -25 °C avec une vitesse de chauffage de 5 °C / 6 heures (0,014 °C/min). Pour la dessiccation secondaire, la température des étagères a été augmentée de -25 °C jusqu'à +25 °C à une vitesse de 5 °C/3 heures (0,027 °C/min) (Kawai and Suzuki, 2007). Dans les conditions de cet essai, les lyophilisats contiennent moins de 0,5 % d'humidité, et tous les produits montrent la présence d'une T_g après l'analyse DSC, avec une T_g de 99,7 °C pour le tréhalose (Kawai and Suzuki, 2007). Après dosage de l'activité enzymatique, il a été démontré que la LDH avait perdu 40 % de son activité après lyophilisation en présence de tréhalose dans ces conditions de cycle (Kawai and Suzuki, 2007).

Une autre étude consistait à préparer des formulations à 3,5 % (m/v) de tréhalose en y ajoutant des suspensions de lipoplexes (400 µL, 1,9 µM siRNA) (Busignies et al., 2020). Par la suite, la formulation a été congelée à l'aide de l'azote liquide pendant une durée de 10 minutes afin de produire des cristaux de glace très fins pour limiter la déstructuration des lipoplexes. Trois cycles de lyophilisations ont été réalisés (temps de séchage primaire et secondaire de 20, 24 et 30 heures). Le lyophilisateur a été pré-congelé à -60 °C et la pression de la chambre a été fixée à 0,2 mbar. La dessiccation a été réalisée à température ambiante. Le lyophilisat obtenu était poreux, friable et très soluble, donc adéquat pour une remise en suspension après l'ajout d'eau. Busignies et al. ont démontré qu'après ce cycle de lyophilisation, en présence de tréhalose et après re-suspension du lyophilisat, les lipoplexes avaient la même efficacité que ceux qui n'avaient pas subi de lyophilisation.

Ohuri et al. ont utilisé la BSA (albumine de sérum bovin) comme protéine modèle pour leur étude. Des formulations contenant 100 mg/ml de tréhalose, 1 mg/ml de BSA et 0,1mg/ml de polysorbate 80 ont été préparées (Ohori et al., 2018). Contrairement aux études précédentes, la congélation des formulations a été réalisée sur les étagères, à partir de la température ambiante jusqu'à -40 °C, à 0,67 °C/minute. La température étagère a été maintenue à cette température pendant 3 heures, puis le vide a été déclenché pour atteindre une pression de 10 Pa (0,1 mbar). Pour la dessiccation primaire, la température a été augmentée jusqu'à 0 °C avec une vitesse de chauffage de 1 °C/minute (chauffage rapide) ou de 0,06 °C/minute (chauffage lent). Cette température a été maintenue pendant 18 heures. Pour le passage à la dessiccation secondaire, la température d'étagère a été augmentée jusqu'à 25 °C à 0,07 °C/minute et maintenue à cette température pendant 18 heures. Il a été démontré une meilleure stabilité de la BSA dans le cas du cycle avec la rampe de chauffage la plus rapide (Ohori et al., 2018).

D'après ces études, plusieurs conclusions peuvent être émises. Premièrement, le tréhalose est un excipient de choix puisqu'il a montré sa capacité à stabiliser les biomolécules pendant le procédé de lyophilisation. De plus, chaque étude utilise des cycles de lyophilisation différents, plus ou moins intenses, ce qui montre que le tréhalose peut être « efficace » même si les conditions du procédé varient. Il est important de conclure que même si un cycle de lyophilisation est relativement intense (rampes de températures élevées, dessiccation primaire et secondaire réalisées à des températures élevées...), il est tout à fait possible de préserver la stabilité des biomolécules ainsi que les critères de qualité d'un lyophilisat (état, apparence, structure, texture et propriétés physicochimiques associées).

Le saccharose :

Le saccharose (α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranoside) est un disaccharide non réducteur constitué d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose liées par une liaison osidique α (1 \leftrightarrow 2) β (**Figure 9**). Tout comme le tréhalose, le saccharose étant un sucre non réducteur, il permet

aussi de s'affranchir de la réaction de Maillard (Mehmood and Farooq, 2015). Sa formule moléculaire est $C_{12}H_{22}O_{11}$ et il possède une masse moléculaire de 342,31 g/mol. Le saccharose cristallin possède une température de fusion (T_f) de 190 °C (Beckett et al., 2006).

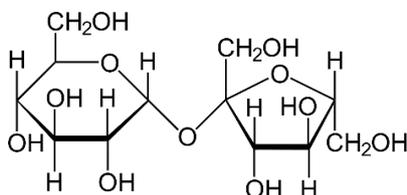


Figure 9 – Structure chimique du saccharose.

Le saccharose est un sucre à la saveur douce. Il est principalement extrait de la canne à sucre et de la betterave sucrière. Le saccharose n'existe généralement que sous une seule forme cristalline (Brown and Levy, 1973). Le diffractogramme représentant les pics caractéristiques du saccharose cristallin est représenté dans la **Figure 10**.

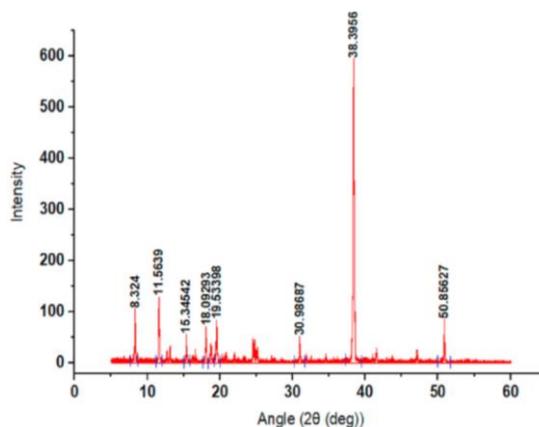


Figure 10 – Diffractogramme rayons X du saccharose cristallin (Kaur et al., 2021).

Comme le tréhalose, le saccharose est d'une grande efficacité durant la lyophilisation. La raison principale est sa capacité, une fois solubilisé en milieu aqueux, à ne pas cristalliser durant la phase de congélation. De ce fait, aucune séparation de phase de la protéine ne risque de se produire (Bjelošević et al., 2020). Au-delà du fait qu'il soit moins cher que le tréhalose, le saccharose est plus avantageux en raison de la prédictivité de son comportement de changement de phase au cours du cycle de lyophilisation (Bjelošević et al., 2020) et du fait qu'il semble mieux préserver la structure tertiaire des protéines (Jovanović et al., 2006).

Le diagramme de phase binaire eau-saccharose est représenté dans la **Figure 11**. D'après ce diagramme, le saccharose a une T_g' d'environ $-33\text{ }^{\circ}\text{C}$ et sa C_g' se situe autour de 80% (m/m). La T_g du saccharose sec est de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Simperler et al., 2006), ce qui est un désavantage par rapport au tréhalose dont la T_g est environ deux fois plus élevée. La T_c du saccharose se situe entre -34 et $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$.

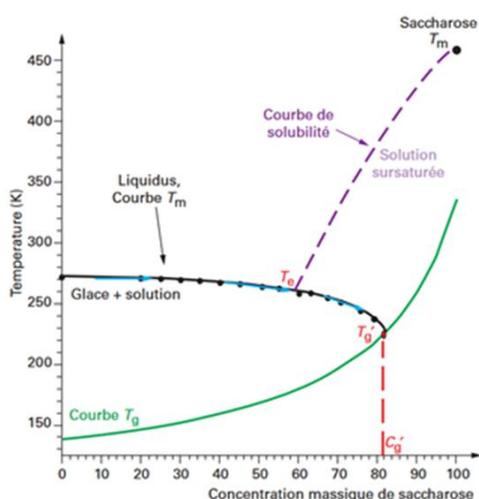


Figure 11 – Diagramme de phase eau-saccharose (Hedoux, 2015).

De nombreuses études décrivent la lyophilisation de biomolécules en présence du saccharose. L'étude de (Kawai and Suzuki, 2007), évoquée dans le paragraphe décrivant le tréhalose, montre des résultats similaires dans le cas de la lyophilisation de la LDH en présence de saccharose. Une perte de 40% de l'activité de la LDH a été constatée.

Les résultats de (Ohori et al., 2018) sur des lyophilisats contenant du saccharose, également discutés dans le paragraphe sur le tréhalose, montrent une différence en terme de stabilité du lyophilisat et de stabilité de la protéine. En effet, concernant la formulation à base de tréhalose, les lyophilisats étaient stables sur plusieurs semaines à des températures de stockage allant de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, alors que les lyophilisats à base de saccharose étaient beaucoup moins stables au cours du stockage (rétrécissement du lyophilisat, virement de la couleur du blanc au marron) (Ohori et al., 2018). Les différences ne sont pas seulement constatées au niveau de la stabilité du lyophilisat, mais également sur la stabilité de la protéine. Pour une même température de stockage (40 ou $50\text{ }^{\circ}\text{C}$), l'étude montre que la BSA reste stable pendant 8 semaines quand la lyophilisation est réalisée avec une rampe de congélation rapide, que ce soit pour les formulations à base de tréhalose ou bien de saccharose (Ohori et al., 2018). Par contre, lorsqu'une rampe de congélation lente est utilisée pendant le cycle de lyophilisation, il y a dégradation des protéines présentes dans les lyophilisats contenant du

saccharose, alors que ceux contenant du tréhalose restent toujours stables pendant huit semaines (Ohuri et al., 2018).

Ces résultats montrent que le saccharose est un disaccharide qui peut avoir des comportements similaires au tréhalose, et qu'il permet d'obtenir des lyophilisats ayant de bonnes tenues mécaniques et pouvant stabiliser les protéines. Malgré tout, dans certains cas, le tréhalose pourrait être plus efficace pour stabiliser des protéines pendant le stockage et surtout à des températures élevées car il possède une T_g beaucoup plus élevée que celle du saccharose.

Les agents de masse :

Cette famille d'excipients a pour rôle de conférer une structure appropriée aux lyophilisats et elle peut influencer l'efficacité du procédé de lyophilisation. Les agents de masse sont des produits qui cristallisent pendant la congélation (comportement eutectique). Ces agents de masse peuvent être utilisés en mélange avec des cryoprotectants.

Comme n'importe quel autre excipient, la concentration d'agent de masse à rajouter dans la formulation ne peut pas être aléatoire. Il est décrit dans la littérature qu'un ratio minimal de 1:2 entre l'agent stabilisateur et l'agent de masse est nécessaire pour observer une cristallisation de l'agent de masse (L Remmele et al., 2012). En cristallisant, l'agent de masse confère au lyophilisat une rigidité que le stabilisateur amorphe ne possède pas (au-dessus de sa T_g' , un composé amorphe n'est pas suffisamment résistant pour supporter son propre poids). Ainsi, l'ajout de certains agents de masse peut permettre des cycles de lyophilisation agressifs avec un séchage primaire où la température du produit peut dépasser la T_g' et la T_c caractéristiques de l'agent stabilisateur sans risque d'effondrement du lyophilisat.

Inversement, il est possible que pendant le procédé de lyophilisation, un agent de masse reste amorphe, ce qui pourra causer des problèmes de stabilité de la protéine durant le stockage puisqu'il pourrait recristalliser (Carpenter et al., 2002). L'utilisation d'agents de masse est donc le résultat d'un compromis entre la réduction du temps de dessiccation primaire et la stabilisation de la protéine dans la formulation.

Tout comme les agents stabilisants, il existe plusieurs agents de masse utilisés en lyophilisation pharmaceutique tels que le mannitol et la glycine, qui sont les plus présents dans les produits commercialisés. D'autres sucres tels que le sorbitol, le lactose et le glucose peuvent être utilisés en tant qu'agents de masses (Hedoux, 2015).

Dans le cadre des travaux de cette thèse, seules les propriétés du mannitol et du lactose seront présentées plus en détails.

Le Mannitol :

Aussi connu sous le nom de 1,2,3,4,5,6-hexanhexol, le mannitol est un polyol (sucre-alcool) à six carbones le plus abondant dans la nature. La structure chimique du mannitol est donnée sur la **Figure 12**. Sa formule moléculaire est $C_6H_{14}O_6$ et il possède une masse moléculaire de 182,17 g/mol. Le mannitol présente des propriétés physico-chimiques intéressantes (il n'absorbe pas l'humidité et est d'une grande stabilité), ce qui en fait un composé de choix pour les industries chimiques, agroalimentaires et pharmaceutiques (Dai et al., 2017; Yang et al., 2019). De par ses avantages tels que la non hygroscopie, la bonne compatibilité avec les amines primaires, la grande solubilité et la désagrégation rapide (Vanhoorne et al., 2020), le mannitol joue un rôle très important en tant qu'excipient dans l'industrie pharmaceutique.

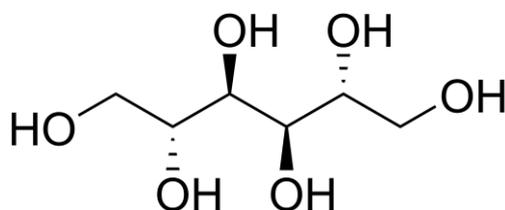


Figure 12 – Structure chimique du D-mannitol.

La littérature décrit bien le mannitol comme étant une molécule qui a 3 polymorphes différents : α , β et δ (Datta and Grant, 2004; Poornachary et al., 2013). Ces 3 polymorphes possèdent des propriétés physico-chimiques différentes.

Ayant des structures cristallines différentes, il en est de même pour leurs températures de fusion. Yu et al. ont cité que les polymorphes α et β ont des T_f respectivement de 166 et 166,5 °C alors que le polymorphe δ a une T_f de 155 °C (Yu et al., 2005). Les trois polymorphes du mannitol ont des stabilités thermodynamiques différentes ($\beta > \alpha > \delta$) (Su et al., 2020). C'est pour cela que le polymorphe le plus commercialisé est le polymorphe β . La diffraction des rayons X est la technique la plus importante qui permet d'identifier les différents polymorphes du mannitol. La **Figure 13** représentant les diffractogrammes des trois polymorphes du mannitol α , β et δ permet d'identifier les pics caractéristiques de chacun des trois composés ($2\theta = 10,4^\circ$, $14,56^\circ$ et $16,74^\circ$ pour la forme α ; $2\theta = 13,64^\circ$ et $17,18^\circ$ pour la forme β et $2\theta = 9,7^\circ$ pour la forme δ) (Kaialy et al., 2014; Yan-Ying Lee et al., 2011).

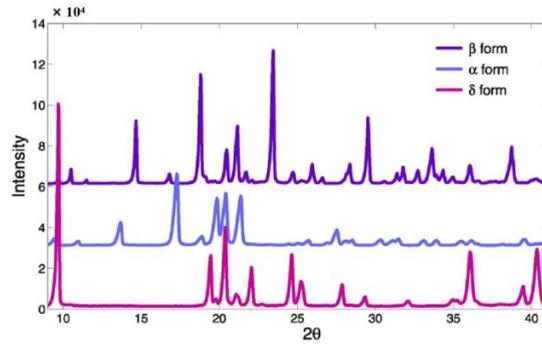


Figure 13 – Diffractogramme des rayons X des polymorphes du D-mannitol (Cares-Pacheco et al., 2014).

Le diagramme de phase du système eau-mannitol est donné sur la **Figure 14**. Le mannitol possède une T_{eu} très élevée (-1,4 °C). La cristallisation du mannitol est très complexe, même dans un système binaire simple eau-mannitol, avec au moins 3 polymorphes anhydres (α , β et δ) et un héli-hydrate qui sont observés dans les états congelés et lyophilisés. Il n'y a aucune façon de prédire la forme qui va apparaitre selon les différentes conditions opératoires (Rodrigues et al., 2021). La T_g' du mannitol se situe entre -32 et -27 °C (Her and Nail, 1994). Le mannitol étant très résistant à l'effondrement, la littérature ne donne pas de T_c pour cet excipient.

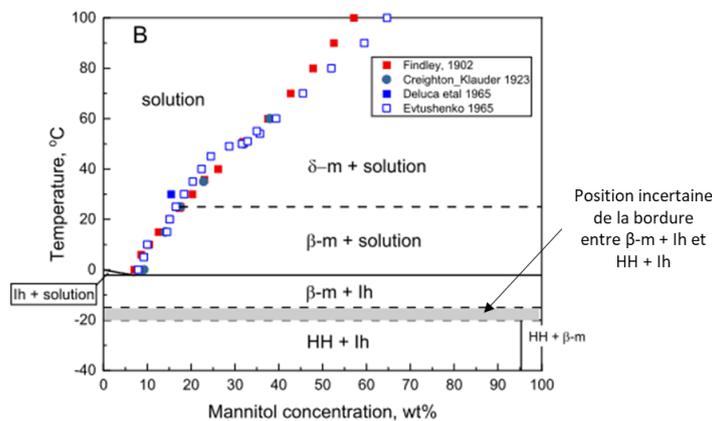


Figure 14 – Diagramme de phase eau-mannitol (Rodrigues et al., 2021). HH (mannitol héli-hydraté) ; β -m et δ -m (β -mannitol et δ -mannitol) ; lh (glace).

Quand le mannitol est présent dans des formulations contenant des protéines ou des peptides, il représente généralement la majorité des excipients présents dans le flacon. Des études ont montré que la cristallisation des agents de masse au cours de la lyophilisation peut, dans certains cas, influencer la stabilité de la molécule d'intérêt (Bedu-Addo, 2004). Il a ainsi été démontré qu'avec trois

agents de masse différents (mannitol, glycine et alanine), l'interleukine 1 (protéine recombinante humaine) concentrée à 10 mg/ml, pouvait avoir une stabilité différente, et qu'elle était mieux stabilisée en présence de glycine (Byeong S. Chang, Gail Reeder & John F Carpenter, 1996).

Izutsu et Kojima ont travaillé sur la cristallinité des excipients et leur effet stabilisateur sur les protéines (Izutsu and Kojima, 2002). Leur formulation se composait de solutions aqueuses de 200 µL contenant une combinaison de protéines (2,5 mg/ml de LDH et 10 mg/ml d'autres protéines (l'albumine sérum bovin, l'ovalbumine et la β-lactoglobuline). Les excipients utilisés étaient le mannitol ou le saccharose à une concentration de 50 mg/ml. La congélation durant la lyophilisation s'est faite par immersion à l'azote liquide. Le séchage primaire a été réalisé sur des étagères préalablement refroidies à -40 °C, pendant 12 heures, sous une pression de 6 Pa. Par la suite, la température a été augmentée jusqu'à 20 °C avec une rampe de 0,5 °C/min. L'analyse de l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation en présence de mannitol seulement, mais en absence de tampon phosphate de potassium, montre une perte quasi-totale de l'activité de la LDH en raison de la cristallisation totale du mannitol. En restant dans les mêmes conditions, mais en rajoutant du tampon phosphate de potassium à des concentrations allant de 20 mM jusqu'à 100 mM, l'activité de la LDH après lyophilisation est conservée à 50 % par rapport à la solution non lyophilisée en présence de tampon à 20 mM et à 80 % en présence de tampon à 100 mM (Izutsu and Kojima, 2002). En effet, en présence de tampon phosphate, les résultats DRX ont montré une réduction de la cristallinité du mannitol. La cristallisation d'un excipient induit la suppression des interactions intermoléculaires (liaison hydrogènes) avec les protéines, qui sont nécessaires au maintien de la structure de la protéine pendant le séchage (Crowe et al., 1996; Izutsu and Kojima, 2002). En plus les résultats montrent que la lyophilisation en présence de saccharose a permis la préservation de la totalité de l'activité enzymatique de la LDH. En effet, le saccharose est complètement amorphe après lyophilisation ce qui explique la préservation l'activité enzymatique de la LDH (Izutsu and Kojima, 2002).

Une autre étude, réalisée sur la lyophilisation de la LDH en présence de mannitol seul ou de mannitol avec du saccharose (Al-Hussein and Gieseler, 2012), a utilisé un autre cycle de lyophilisation avec une congélation réalisée directement sur l'étagère. Dans cette étude, des formulations de 2 ml contenant 2 µg/ml de LDH et 50 mg/ml d'excipient (mannitol seul, mannitol + saccharose et saccharose seul) et du tampon phosphate 10 mM ont été préparées. La congélation a été réalisée en diminuant la température des étagères de la température ambiante jusqu'à -40 °C avec une rampe de température de -1 °C/minute. Cette température a été maintenue pendant 1 heure avant le démarrage de la dessiccation primaire. La dessiccation primaire a été réalisée à -35 °C pendant 25 heures et sous une pression de 80 mTorr (106,6 mbar). Pour la dessiccation secondaire, la température a été augmentée jusqu'à 40 °C à la vitesse de +0,1 °C/minute et a été maintenue pendant 4 heures. Les résultats d'analyse de l'activité enzymatique après lyophilisation montrent qu'en présence de mannitol pur (complètement cristallin), il y a 50 % de perte d'activité. Par contre les

formulations contenant un mélange de mannitol et de saccharose à différents pourcentages (pourcentage mannitol/saccharose : 70/30, 50/50, 30/70 et 10/90) ont préservé plus de 80% de l'activité enzymatique de la LDH. En effet, à mesure que la concentration de saccharose augmentait dans le mélange, le degré de cristallinité des lyophilisats diminuait. L'ajout du saccharose dans la formulation semble pouvoir préserver l'activité enzymatique de la LDH par l'intermédiaire de la formation de liaisons hydrogènes qui stabilisent cette dernière, même si le mélange est complètement ou partiellement cristallin après lyophilisation (Al-Hussein and Gieseler, 2012).

Ces études montrent qu'il est possible de lyophiliser des formulations de protéines avec du mannitol en utilisant différentes conditions lors de la lyophilisation (conditions plus ou moins agressives). En plus, les résultats convergent dans le même sens. Le mannitol lyophilisé seul en présence de protéines semble altérer significativement son activité. Cela est probablement due à l'étape de congélation, où la formation de cristaux de mannitol induit une instabilité de la biomolécule. En revanche, l'augmentation de la concentration du tampon permet de diminuer le degré de cristallinité du mannitol et l'ajout d'une faible quantité d'agent stabilisant à la formulation comme le saccharose (lyo et cryoprotectant) permet d'augmenter considérablement l'activité enzymatique de la protéine en question même si le mélange saccharose/mannitol est cristallin ou partiellement cristallin après lyophilisation.

Même si le mannitol permet de réaliser des cycles de lyophilisation agressifs tout en s'affranchissant du problème de l'effondrement, il est quand même important de prendre en compte que sa cristallisation durant le procédé (qui ne se fait pas à volume constant et génère un stress mécanique qui se surajoute à la cristallisation de l'eau) pourrait influencer la stabilité des protéines. Il faut donc faire un compromis et l'utiliser en présence d'autres excipients qui pourraient aider à s'affranchir de ce problème.

Le Lactose :

Le lactose aussi connu sous le nom de β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)D-glucopyranose, est un disaccharide composé d'une molécule de β -D-galactose et d'une molécule de α/β -D-glucose reliées par une liaison osidique $\beta(1\rightarrow4)$ (**Figure 15**). C'est le sucre principal du lait de la plupart des mammifères. Le lactose est un sucre réducteur du fait de la présence d'une fonction hémiacétal (groupe fonctionnel formé par réaction d'un aldéhyde et d'un alcool). Il peut donc subir la réaction de Maillard (McSweeney and Fox, 2009). La formule moléculaire du lactose est $C_{12}H_{22}O_{11}$ et sa masse molaire est de 342 g/mol.

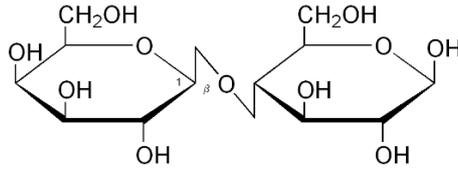


Figure 15 – Structure chimique du lactose.

Le lactose possède des propriétés similaires aux sucres réducteurs et quelques-unes de ses caractéristiques les plus importantes sont citées dans la liste qui suit (McSweeney and Fox, 2009) :

- Le lactose possède deux anomères (structures cycliques identiques qui ne diffèrent que par la position du OH anomérique qui est porté par un carbone asymétrique, appelé carbone anomérique), lactose α et lactose β .
- Les anomères α et β ont des solubilités différentes (respectivement 70 et 500 g/L).
- L'anomère α est la forme qui cristallise à une température inférieure à 93,5 °C et qui est la forme de lactose la plus commercialisée. Le lactose β est un produit qui peut être préparé par cristallisation à une température supérieure à 93,5 °C.
- Le lactose α est un produit cristallin monohydraté de couleur blanche, alors que le lactose β est un produit cristallin anhydre.
- Le lactose cristallin est un produit très faiblement hygroscopique.

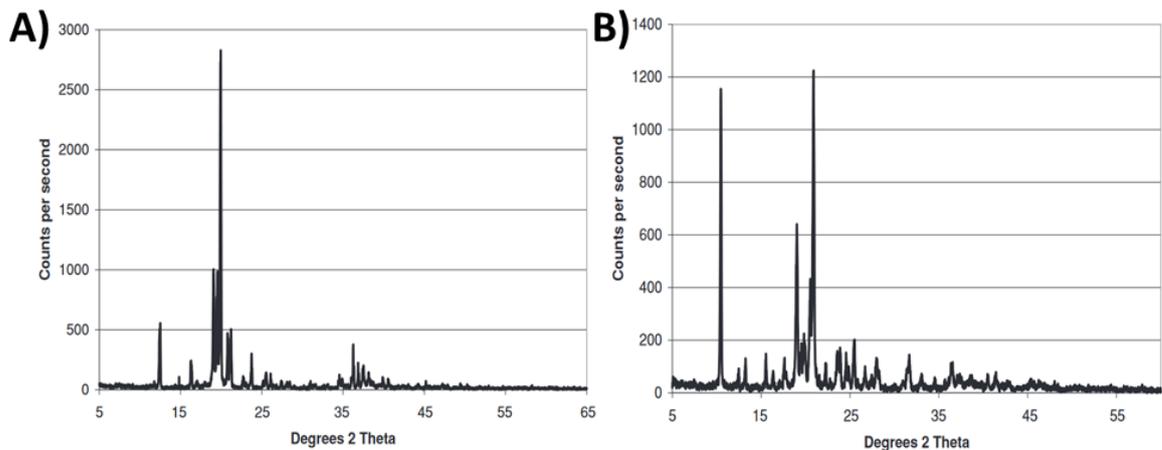


Figure 16 – Diffractogrammes des rayons X du lactose α monohydrate (A) et du lactose β anhydre (B) (Thomas et al., 2009).

Les diffractogrammes du lactose α (**Figure 16 A**) et du lactose β (**Figure 16 B**) montrent qu'il est possible de reconnaître ces produits par l'intermédiaire des pics caractéristiques de chacun d'eux.

La température de fusion du lactose α est de 214 °C et celle du lactose β s'élève à 225 °C (Drapier-Beche et al., 1999). Le lactose amorphe possède une T_g de 101 °C (Roos, 1993) et une T_c de -31,-32 °C (Mehmood and Farooq, 2015). Le diagramme de phase binaire lactose/eau (**Figure 17**) permet de déterminer sa T_g' (-31 °C) et sa C'_g (\approx 80 % m/m).

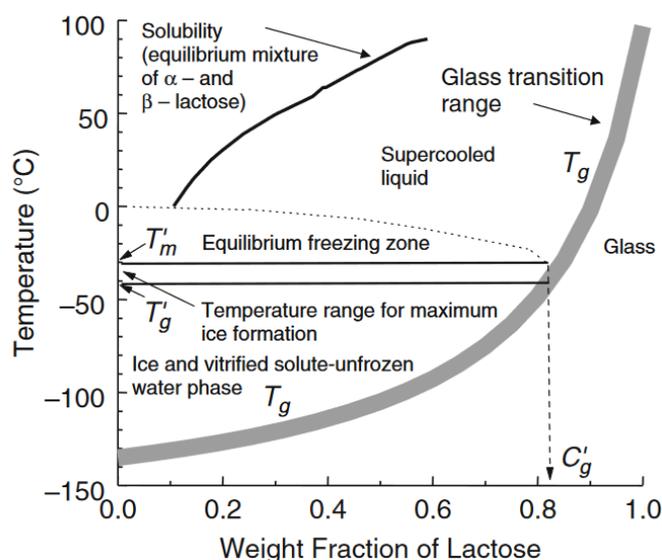


Figure 17 – Diagramme de phase eau-lactose (McSweeney and Fox, 2009).

Le lactose est un bon agent de masse, mais puisque c'est un sucre réducteur et qu'il peut réagir avec les protéines (réaction de Maillard), il peut induire des instabilités après lyophilisation. Pourtant, de nombreuses études impliquent la lyophilisation de protéines en présence de lactose.

Kawai et Suzuki ont comparé dans les mêmes conditions de lyophilisation l'effet de différents sucres (tréhalose, saccharose, lactose et maltose) sur l'activité enzymatique de la LDH (Kawai and Suzuki, 2007). Les résultats montrent que quel que soit le disaccharide utilisé, qu'il soit réducteur ou non, il y a une perte de l'activité enzymatique de la LDH de 40 % (Kawai and Suzuki, 2007).

Une autre étude décrit avoir préparé des formulations contenant 2 mg/ml de LDH ou de PFK (phosphofructokinase) et du lactose ou du mannitol 10 mM (Steven J Prestrelski et al., 1993a). La congélation a été réalisée sur des étagères pré-refroidies à -45 °C. La dessiccation primaire a elle aussi été réalisée à -45 °C sur 24 heures en diminuant la pression jusqu'à 30 mTorr. Finalement, la dessiccation secondaire a été réalisée en deux étapes de 24 heures avec des températures d'étagères de -10 °C puis de 20 °C. L'analyse de l'activité enzymatique de la LDH montre une perte de 55 à 60 % en présence de lactose ou de mannitol par rapport à la protéine non lyophilisée et une perte de 95 %

% de l'activité de la PFK en présence de mannitol ou même de lactose (Steven J Prestrelski et al., 1993a). En revanche, après l'ajout de 1 % de PEG aux formulations, la LDH a retrouvé 100 % de son activité après lyophilisation en présence de lactose et 80 % en présence de mannitol. Il en est de même pour la PFK, qui, en présence de lactose et de PEG, a retrouvé 100 % de son activité alors que les formulations contenant du PEG et du mannitol conservent une activité de 30% après lyophilisation.

La conservation de l'activité de la protéine après lyophilisation en présence de lactose dépend de plusieurs facteurs. Premièrement, le lactose, à lui seul, ne permet pas de conserver 100% de l'activité de la protéine (dans les deux études citées ci-dessus, il y a une perte de 40 % de l'activité de la LDH après lyophilisation). Par contre, l'ajout d'un autre excipient en très faibles quantités comme le PEG, pourrait améliorer la conservation des protéines en présence du lactose. En effet, les analyses infra-rouges dans l'étude de Prestrelski et al. ont montré qu'en présence de PEG, la structure de la protéine est maintenue durant l'étape de congélation et de séchage, ce qui explique la hausse de l'activité enzymatique après ajout de PEG (Steven J Prestrelski et al., 1993a).

Un autre facteur à prendre en compte est la protéine. Deux protéines différentes lyophilisées dans les mêmes conditions peuvent avoir des variations d'activités enzymatiques différentes après le procédé. En effet, les protéines peuvent être multimériques, avoir différentes conformations et donc peuvent avoir des stabilités différentes. Une Concentration plus élevée de protéines dans une formulation peut entraîner un certain degré de stabilisation (Steven J Prestrelski et al., 1993a). Cela était vrai pour la LDH dans l'étude de Prestrelski et al., qui en absence d'additif, a présenté une activité enzymatique plus élevée que la PFK. En effet, la PFK est extrêmement labile, et même à une concentration de 2 mg/ml, aucune activité n'est récupérée en absence d'additifs (Steven J Prestrelski et al., 1993a).

Les excipients lyophilisés dans le cadre de notre étude :

Dans le cadre de cette thèse, les excipients qui ont été étudiés en lyophilisation étaient le tréhalose, le saccharose, le lactose et le mannitol. Le **Tableau 1** regroupe les caractéristiques physico-chimiques essentielles de ces quatre excipients.

Tableau 1 – Les différentes propriétés du tréhalose, saccharose, lactose et mannitol.

	Tréhalose	Saccharose	Lactose	Mannitol
Nom chimique	α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside	α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranoside	β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)D-glucopyranose	1,2,3,4,5,6-hexanhexol
Type de sucre	Disaccharide non réducteur (deux molécules de glucose)	Disaccharide non réducteur (une molécule de glucose et une molécule de fructose)	Disaccharide réducteur (une molécule de galactose et une molécule de glucose)	Polyol (sucré-alcool)
Formule moléculaire	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	C ₆ H ₁₄ O ₆
Masse moléculaire	342,31 g/mol	342,31 g/mol	342,31 g/mol	182,17 g/mol
Polymorphisme	α, α ; α, β ; β, β	-	α ; β	α ; β ; δ
Polymorphe courant	α, α di hydraté	-	α monohydrate	β
Famille d'excipient	Agent stabilisant	Agent stabilisant	Agent de masse/stabilisant	Agent de masse
T_f (°C)	α, α di-hydraté : 97	190	α : 214 β : 225	α : 166, β : 166,5 δ : 155
T_g (°C)	107	60	101	-
T_g' (°C)	-30	-33	-41	-32, -27
T_c (°C)	-29	-34, -32	-32, -31	-
C'_g (% m/m)	80	80	80	-

Les agents tampon :

Le rôle essentiel des agents tampon est de maintenir pendant le cycle de lyophilisation le pH de la solution le plus proche possible du pH où la protéine est la plus stable. Puisque les protéines sont soumises à différents types de stress durant la lyophilisation, durant le stockage et après la reconstitution des lyophilisats, il est important de bien choisir le tampon à utiliser. Le pH tampon visé pour les protéines thérapeutiques se situe dans l'intervalle 4,6 – 8,2, et les solutions tampons les plus couramment utilisées sont des tampons non amino-acide comme le phosphate de sodium, l'acétate de sodium, le citrate de sodium et le succinate de sodium (Gervasi et al., 2018).

Les agents tensioactifs :

Ils sont présents dans de nombreuses formulations contenant des protéines qui ont une tendance à se dénaturer ou bien à s'agréger à des interfaces comme la glace par exemple. Ils augmentent l'énergie libre nécessaire à la dénaturation des protéines et réduisent la tension superficielle des interfaces formées lors de la lyophilisation (Rayaprolu et al., 2018). De plus, ils peuvent favoriser la reconstitution des lyophilisats et leur mouillage. Il est important d'ajouter des quantités modérées d'agents tensioactifs car ils ont des T_g assez basses. Les tensioactifs non ioniques comme le polysorbate 80 et 20 sont ceux qui sont les plus couramment utilisés.

Les agents modificateurs de température d'effondrement :

Il existe en plus d'autres familles d'excipients comme les agents modificateurs de température d'effondrement qui se caractérisent par une valeur de T_g plus élevée que celles des autres excipients utilisés dans la formulation.

Les agents antioxydants et antimicrobiens :

Finalement, des agents antioxydants et antimicrobiens peuvent être ajoutés à la formulation pour éviter les réactions d'oxydation des protéines ou bien la croissance microbienne.

1.1.4 La surface spécifique des excipients lyophilisés

La surface spécifique d'un matériau lyophilisé est en relation avec sa porosité totale et la définition du réseau poreux (taille et distribution de tailles de ses pores), et est exprimée en m^2/g . En imaginant avoir un solide composé de (n) pores de rayon (r) et de longueur (L), la surface spécifique (SSA) des pores est donnée par l'**équation 10** (Rambhatla et al., 2004):

$$SSA = \frac{n \cdot 2\pi r L}{\rho_s V_s} \quad \text{Équation 10}$$

Avec (ρ_s) la masse volumique du solide et (V_s) le volume du solide. En exprimant (V_s) en termes de volume total ($2\pi R^2 L$) et de volume de la fraction de vide ($\varepsilon = \frac{V_{vide}}{V_{total}} = \frac{nr^2}{R^2}$), l'équation de la surface spécifique peut être donnée par l'**équation 11** :

$$\frac{2\varepsilon}{\rho_s(1-\varepsilon)} \times \frac{1}{r} \quad \text{Équation 11}$$

La surface spécifique des excipients après lyophilisation est bien décrite dans la littérature. En prenant le mannitol et le saccharose par exemple, il a été démontré qu'après lyophilisation, des formulations composées de 5% (m/v) de mannitol ou de saccharose, ont une surface spécifique différente. La SSA évolue en fonction de la température de nucléation et il a été démontré que la surface spécifique du mannitol qui est cristallin, est beaucoup plus élevée que celle du saccharose amorphe (Rambhatla et al., 2004). Le **Tableau 2** – Surface spécifique du saccharose et du mannitol lyophilisés en fonction de la température de nucléation montre l'évolution de la surface spécifique de lyophilisats de mannitol et de saccharose en fonction de la température de nucléation (Rambhatla et al., 2004).

Tableau 2 – Surface spécifique du saccharose et du mannitol lyophilisés en fonction de la température de nucléation.

Excipient	T_n (°C)	SSA (m₂/g)
Saccharose	-1,0	0,32 ± 0,03
	-6,0	0,42 ± 0,03
	-11,0	0,61 ± 0,03
Mannitol	-1,5	3,64 ± 0,24
	-6,5	3,94 ± 0,45
	-10	4,45 ± 0,43

D'autres études ont déterminé la SSA de lyophilisats de tréhalose et de lactose. Des formulations contenant 10 % (m/v) de tréhalose ont été réalisées et lyophilisées. La surface spécifique mesurée du tréhalose lyophilisé était de 0,48 ± 0,12 m²/g (Surana et al., 2004). Finalement, des formulations contenant 15 % (m/m) de lactose ont été lyophilisées par deux méthodes différentes (dans la première méthode, la congélation a été réalisée par immersion à l'azote liquide et dans la deuxième méthode, la congélation a été réalisée directement sur les étagères du lyophilisateur) (Vollenbroek et al., 2010). La surface spécifique des lyophilisats a été déterminée après les deux cycles de lyophilisation. Pour le premier et le deuxième cycle de lyophilisation, les SSA mesurées étaient respectivement de 0,9 et 0,2 m²/g (Vollenbroek et al., 2010).

Tous ces résultats démontrent que la SSA peut être impactée à la fois par la structure cristalline du composé, par sa structure chimique et par les paramètres du cycle de lyophilisation utilisés (surtout la congélation).

1.1.5 Les critères de qualité pour un lyophilisat

Au cours du procédé de lyophilisation, il est possible que certains paramètres du procédé influent sur l'apparence physique du lyophilisat. Une étude a résumé les différents aspects physiques qu'un lyophilisat peut prendre et les différentes conséquences qu'ils peuvent engendrer (Patel et al., 2017). Le **Tableau 3** ainsi que la **Figure 18** montrent quelques considérations à prendre en compte concernant l'apparence des poudres de produits lyophilisés (Patel et al., 2017).

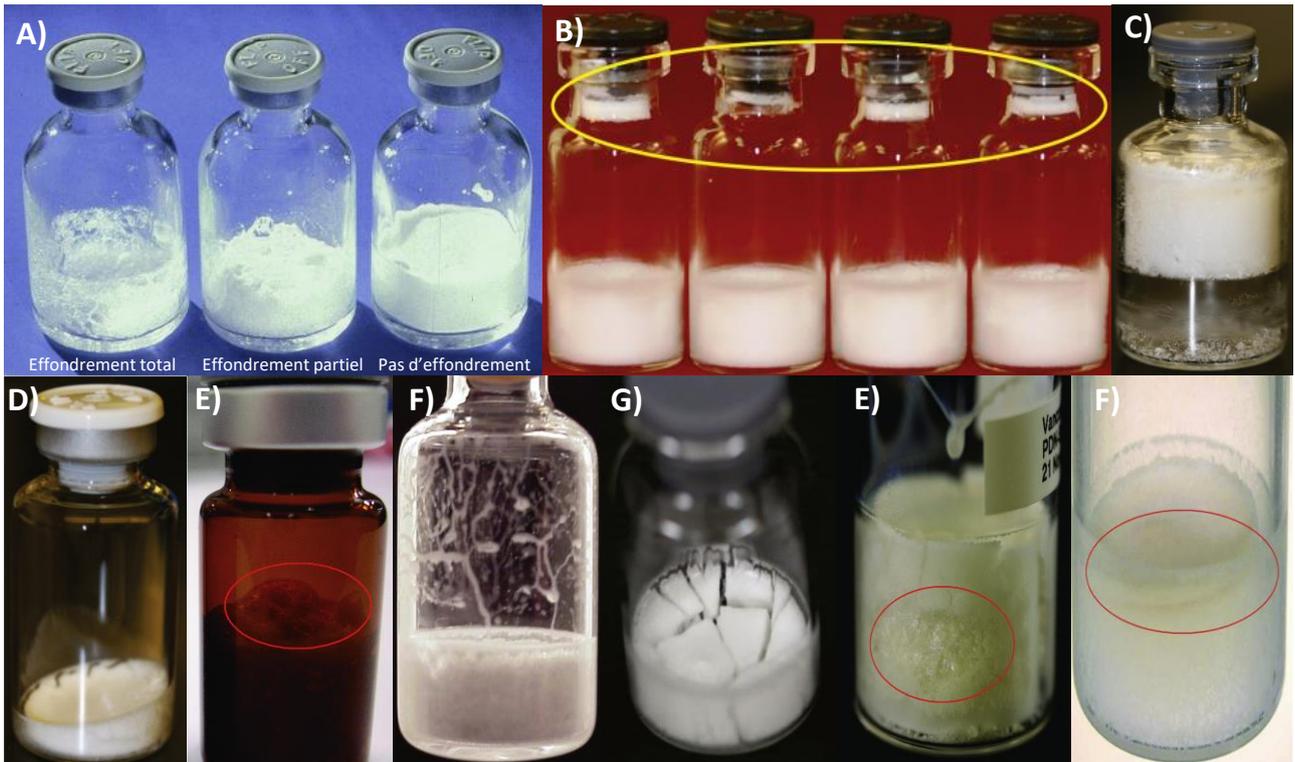


Figure 18 – Apparences physiques des lyophilisats suite au procédé de lyophilisation. La correspondance des lettres figurant sur la figure est donnée dans le tableau 3 (Patel et al., 2017).

Tableau 3 – Quelques critères de qualité pour un lyophilisats (tableau adapté de (Patel et al., 2017)).

Apparence du lyophilisat	Figure	Cause potentielle	Impact sur la qualité du produit ?	Acceptable ?	Notes
Effondrement total	17 A	Séchage à $T_{\text{produit}} > T_c$	Oui – impact sur le temps de reconstitution, l'humidité résiduelle et la stabilité	Non acceptable	-
Entraînement du produit sec dans la région du bouchon du flacon	17 B	Formulation (poudre non cohésive) Procédé (écoulement du gaz rapide pendant le séchage)	Oui – Impact sur la dose et le temps de reconstitution	Non acceptable	Optimisation de la formulation ou des paramètres du procédé
Lyophilisat soulevé	17 C	Rétrécissement du lyophilisat, faible quantité de solide dissous	Oui – impact sur le temps de reconstitution si le lyophilisat demeure soulevé	Non acceptable	Si le lyophilisat reste soulevé près du bouchon, il sera difficile de reconstituer l'échantillon en ajoutant la solution de reconstitution
Lyophilisat incliné	17 D	Mauvais chargement des flacons sur l'étagère	Oui – peut avoir une humidité résiduelle plus élevée et un historique anormal de la T_p	Non acceptable	Un lyophilisat doit avoir un volume et une forme bien définis
Gonflement du lyophilisat	17 E	Haut niveau de gaz dissous, fusion eutectique, protocole de congélation	Oui – Peut impacter la stabilité des protéines sensibles aux interfaces	Non acceptable	Acceptable si le phénomène est observé dans tous les flacons d'un même lot sans impact sur les attributs de qualités critiques
Eclaboussures importantes sur les bords du flacon	17 F	Remplissage manuel	Oui – impact sur le temps de reconstitution	Non acceptable	Optimisation des paramètres de remplissage des flacons
Lyophilisat fissuré	17 G	Formulation, rampe de chauffage du séchage secondaire très rapide	Non	Oui	
Texture du lyophilisat non uniforme	17 E	Paramètre du procédé (étape de congélation)	Non	Oui	Si la surface spécifique est impactée, cela peut influencer le temps de reconstitution et le pourcentage d'humidité résiduelle
Couleur du lyophilisat : non uniforme ou changement de couleur	17 F	Formulation Procédé	Non	Peut-être	Pour l'acceptation, il faut démontrer que les caractéristiques du lyophilisat et la qualité des biomolécules ne sont pas impactées

En résumé, un lyophilisat doit répondre aux critères cités ci-dessous pour s'assurer que le procédé de lyophilisation et la composition de la formulation sont bien adaptés :

- Résistance suffisante du lyophilisat pour éviter les fissures et l'effondrement.
- Consistance et couleur uniformes.
- Pourcentage d'humidité suffisant pour assurer une stabilité des molécules thérapeutiques.
- Porosité et surface spécifique suffisantes pour permettre une reconstitution rapide.
- Chimiquement stable.
- Stabilité sur le long terme.
- Bonne apparence physique du lyophilisat.

1.1.6 Les avantages et les inconvénients de la lyophilisation pharmaceutique

Comme tout procédé industriel, la lyophilisation possède aussi bien des avantages que des inconvénients.

Les avantages de la lyophilisation sont :

- Produits séchés sans élévation de la température (possibilité de s'affranchir de l'instabilité des produits thermosensibles).
- La congélation provoque moins de dégâts que d'autres techniques de séchage utilisant des températures élevées.
- Stockage sous vide ou sous azote possible (pour les molécules sensibles à l'air, à l'oxygène ou à l'humidité)
- Après lyophilisation, le produit est très poreux, ce qui conduit à un temps de reconstitution rapide (quasi instantané).
- Le stockage d'un produit sec est moins coûteux qu'un produit liquide (un produit liquide doit être stocké à des températures très basses, d'où une grande consommation d'énergie). Même si le procédé de lyophilisation peut être long et coûteux, il peut permettre un stockage des lyophilisats à température ambiante.
- La préservation des lyophilisats sous vides dans des flacons scellés permet de s'affranchir des problèmes de réabsorption de l'humidité et inhiber l'action de micro-organismes ou d'enzymes qui peuvent les dégrader.
- La lyophilisation permet d'allonger la durée de vie de certains produits pharmaceutiques pour plusieurs années.

Parmi les désavantages de la lyophilisation, on peut compter :

- Un produit d'intérêt très volatil qui peut être entraîné par le vide.

- Problèmes de stabilité pour certaines biomolécules.
- Le procédé de lyophilisation est sensible, complexe et coûteux.
- Un lyophilisateur est une machine industrielle chère.
- Les biomolécules à haut poids moléculaire (protéines, anticorps, ARNm) sont très fragiles et sensibles à la congélation, au séchage et au pourcentage d'humidité résiduelle dans les lyophilisats.
- Nécessité de maîtriser parfaitement les étapes de nucléation et de cristallisation qui peuvent entraîner une dénaturation de la protéine.
- Une humidité résiduelle très basse dans le produit final peut déstabiliser les biomolécules. Un pourcentage optimal d'eau doit être déterminé et doit être corrélé avec la stabilité du produit sur le long terme.

1.2 Le séchage par atomisation

Le séchage par atomisation (ou par atomisation, spray drying en anglais, SD), est un procédé de séchage très répandu, et utilisé pour le séchage des solutions aqueuses ou organiques, des suspensions et des émulsions dans les industries agroalimentaires, chimiques, électroniques, pharmaceutiques et biopharmaceutiques. Dans l'industrie pharmaceutique, l'atomisation peut être utilisée pour produire des poudres solides contenant des protéines et des peptides. En effet, le SD est un procédé de séchage très intéressant pour l'industrie pharmaceutique, car c'est un processus en une seule étape qui permet la formation et le séchage des poudres. Le séchage par atomisation implique la pulvérisation d'une formulation liquide (solutions, suspensions, émulsions) dans un milieu de séchage chaud (air, azote). Les gouttelettes formées par le processus d'atomisation sont séchées par évaporation du solvant pour former des particules, généralement sphériques, qui sont collectées sous forme de poudre sèche. C'est une technique qui est beaucoup plus rapide, qui est moins coûteuse et qui peut être considérée comme un procédé continu à l'inverse du FD. Cependant, il existe quelques désavantages par rapport au FD, un rendement moins important, un pourcentage d'humidité résiduelle plus élevé et une exposition des biomolécules à des températures élevées.

1.2.1 Description du procédé d'atomisation

Un atomiseur a pour rôle de sécher par pulvérisation une formulation liquide (solution ou suspension) par l'intermédiaire d'air ou d'azote chaud. C'est un procédé unique qui permet à la fois la formation de particules et leur séchage. Durant le processus, le liquide est poussé à travers une buse pour former des gouttelettes qui sont rapidement séchées par évaporation du solvant. Les particules sont par la suite récupérées sous forme de poudre sèche.

Un atomiseur de laboratoire est formé de quatre composants essentiels (**Figure 19**) :

- La chambre de séchage.
- La buse ou atomiseur dont le rôle est de produire les gouttelettes avec la taille désirée.
- Un système d'aspiration.
- Le cyclone qui sert à collecter les particules.

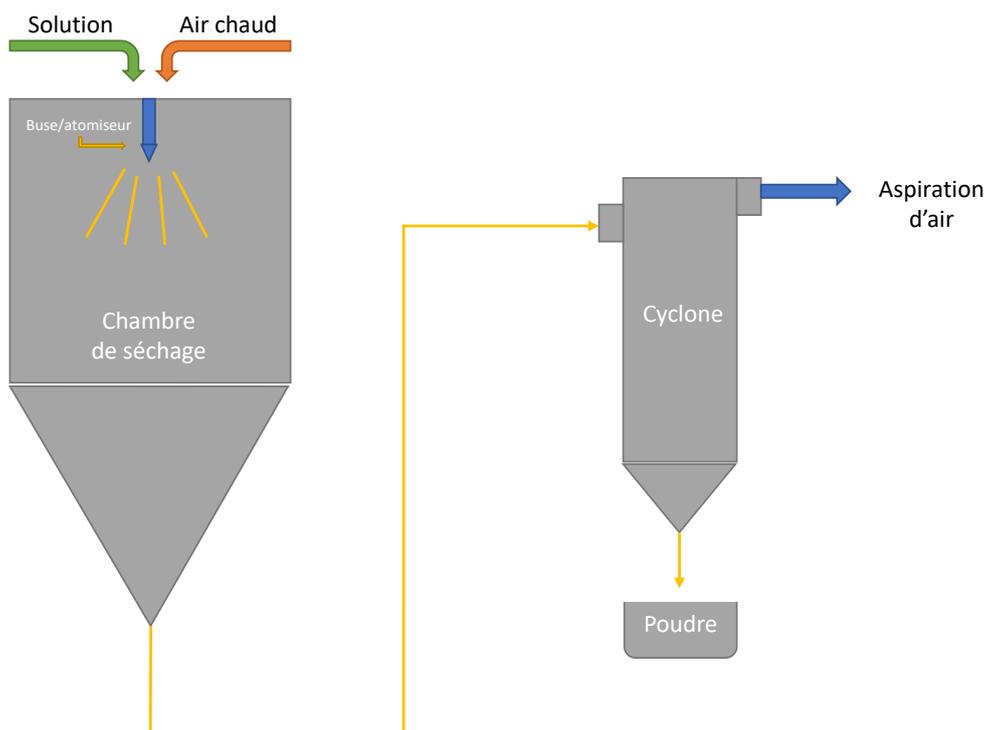


Figure 19 – Schéma d'un atomiseur de laboratoire avec ces quatre composants principaux.

Le procédé d'atomisation peut être résumé en trois étapes :

La pulvérisation : La solution est forcée par une pompe péristaltique au travers de l'orifice calibré de la buse bi-fluide pour être atomisée et transformée en gouttelettes.

Le séchage et la formation des particules : l'air ou l'azote chaud, introduit selon un certain débit, est mis en contact avec la solution pulvérisée, ce qui initie l'évaporation. Le liquide s'évapore rapidement de la surface des gouttelettes puis du cœur. Une particule solide de forme sphérique se forme et suit le flux d'air jusqu'au bas de la chambre de séchage.

La récolte de la poudre : la poudre est entraînée par l'aspiration d'air vers le cyclone et est récupérée dans un récipient dédié.

Il y a plusieurs paramètres qui permettent de programmer un cycle d'atomisation :

- Les températures d'entrée ($T_{\text{entrée}}$) et de sortie (T_{sortie}) du gaz de séchage exprimées en ($^{\circ}\text{C}$).
- Le débit d'alimentation de la formulation (v_{al}) donnée en (mL/min).
- Le débit volumétrique d'air de pulvérisation (v_{ap}) donné en (L/h).
- Le débit volumétrique de l'air de séchage (v_{as}), donné en pourcentage de l'aspiration totale. Il peut être converti en (m^3/h).

1.2.2 Les différents systèmes d'atomiseurs

Il existe trois types d'atomiseur : l'atomiseur à cycle ouvert, l'atomiseur à cycle fermé et l'atomiseur à cycle semi-fermé.

L'atomiseur à cycle ouvert (Figure 20) : il est utilisé pour la pulvérisation de solutions aqueuses. L'air destiné au séchage est prélevé de l'air ambiante, et l'air aspiré en sortie de cyclone est rejeté dans l'atmosphère ambiante (Masters, 2004). Avant son rejet, l'air en sortie de cyclone passe par un filtre équipé de précipitateurs électrostatiques pour être filtré.

L'atomiseur à cycle fermé (Figure 21) : il est utilisé pour la manipulation des solvants inflammables, des produits toxiques ou des produits sensibles à l'oxygène pour éviter toute contamination. Ce système réutilise le gaz (l'azote généralement) injecté au début du séchage. A la sortie de la chambre de séchage se trouve un cyclone qui sert à la récupération de la poudre, puis un filtre et finalement un condenseur de vapeur et de solvant qui sert à refroidir le mélange gaz-solvant et à récupérer le solvant sous forme liquide. Le gaz de séchage refroidi et dé-solvaté est renvoyé vers le chauffage pour être de nouveau chauffé (Masters, 2004).

L'atomiseur à cycle semi fermé : le principe est le même que pour l'atomiseur fermé sauf que le recyclage de l'air de sortie se fait partiellement (seul un certain pourcentage de l'air de sortie, souvent de l'ordre de 60 %, est réutilisé comme air d'entrée pour le chauffage).

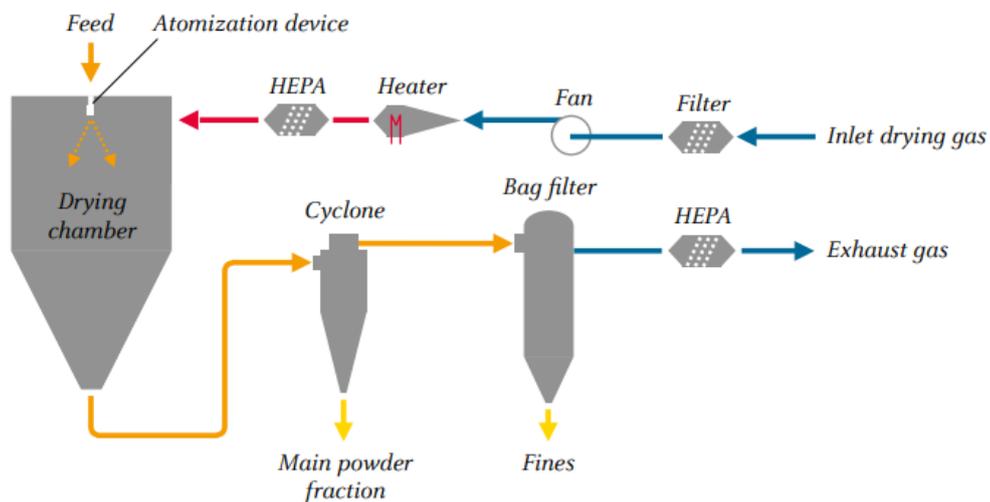


Figure 20 – Représentation schématique d'un atomiseur à cycle ouvert (www.gea.com).

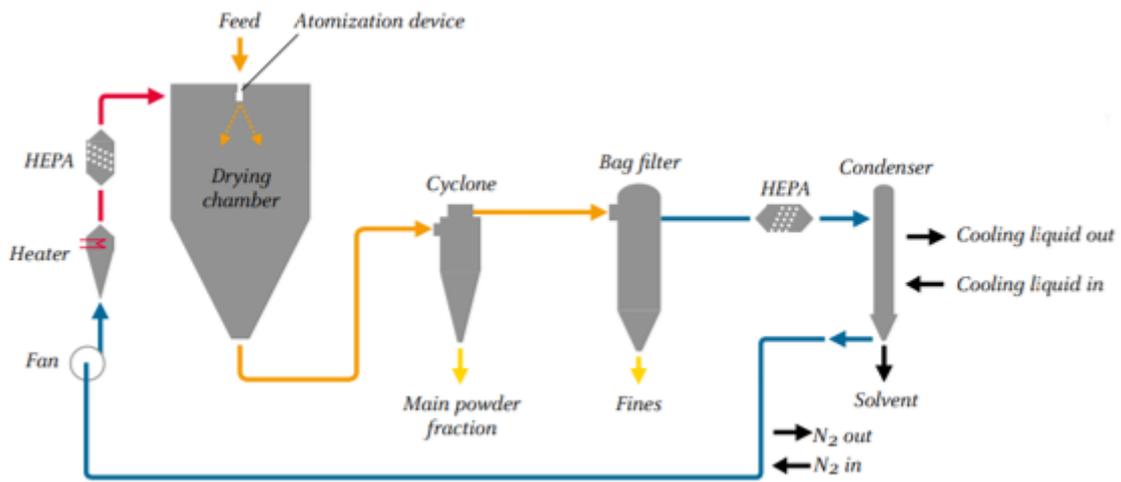


Figure 21 – Représentation schématique d'un atomiseur à cycle fermé (www.gea.com).

1.2.3 Les différents types de buses

Il existe trois types de buses qui diffèrent par la source d'énergie utilisée pendant le procédé de formation des gouttelettes (**Tableau 4**) (Masters, 2004).

Tableau 4 – Différents types d'atomiseurs/buses.

Type de buse	Taille médiane des gouttelettes (μm)	Type d'énergie utilisée
Atomiseur/buse rotatif	10-200	Energie centrifuge
Buse pneumatique (entrée de 2/3 fluides)	5-100	Energie cinétique
Buse de pression	30-350	Energie de pression

La buse rotative est un disque tournant, et le liquide y est injecté par le centre. La buse pneumatique, quant à elle, utilise l'air pour créer de grandes forces de frictions sur la surface du liquide, ce qui causera sa désintégration en gouttelettes. Finalement, dans le cas de la buse de pression, l'alimentation de la solution se fait sous pression. Le liquide est donc forcé de faire un mouvement en rotation dans la buse, ce qui entraîne une sortie du liquide de la buse en forme de cône.

1.2.4 Modes de contact pulvérisation-air de séchage

Il existe trois modes de contact des particules pulvérisées avec l'air.

Le flux à co-courant : la formulation est pulvérisée à travers la chambre de séchage dans la même direction que le flux d'air chaud (**Figure 22 A**). Quand les gouttelettes rentrent en contact avec l'air chaud, il en résulte une évaporation optimale du solvant. Cette technique est efficace pour des formulations contenant des molécules sensibles à la chaleur (biomolécules telles que les protéines ou les peptides).

Le flux à contre-courant : la formulation est pulvérisée à travers la chambre de séchage dans le sens (descendant) opposé au flux d'air chaud (ascendant) (**Figure 22 B**). Ce type de contact est efficace pour un traitement thermique des poudres, pour agglomérer les particules, pour l'obtention de poudres plus fluides. Il est généralement utilisé dans le cas où les formulations ne contiennent pas de molécules sensibles à la chaleur.

Combinaison co et contre-courant : la formulation est pulvérisée à travers la chambre de séchage dans laquelle l'atomiseur est disposé comme une fontaine (**Figure 22 C**). Au début de la pulvérisation, les gouttelettes ont une direction opposée à celle du courant d'air chaud et par la suite elles sont entraînées avec. Ce type de contact est réalisable dans des chambres de séchage de dimensions relativement petites et les poudres sont sujettes à des températures plus élevées. L'évaporation commence instantanément après le contact des gouttelettes avec l'air chaud et continue jusqu'à ce que la quantité de solvant devienne très faible. Cette technique est utilisée pour des suspensions plutôt que pour des solutions.

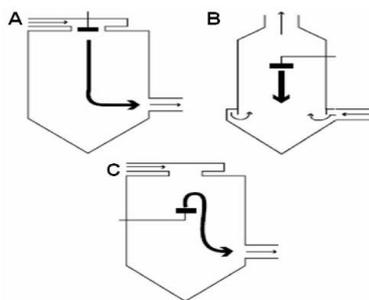


Figure 22 – Schéma des différents modes de contact pulvérisation-air (A : flux à co-courant, B : flux à contre-courant, C : flux combiné de co et contre-courant) (www.buchi.com).

1.2.5 Effets des paramètres du procédé et des formulations

De nombreux paramètres peuvent influencer les caractéristiques des poudres en sortie du procédé d'atomisation. Il est possible de diviser ces paramètres en deux parties, les paramètres liés au procédé et les paramètres liés à la formulation.

Parmi les paramètres qui ont une grande influence sur le procédé d'atomisation il est possible de citer le taux d'aspiration, la concentration de la formulation en matière sèche, la viscosité de la formulation, le taux d'humidité du gaz de séchage, le flux d'alimentation de la formulation, le flux du gaz de séchage, la température d'entrée du gaz et la nature de solvant. Pour un appareillage et une taille de buse donné, l'effet de ces paramètres sur le procédé et sur le produit final est décrit dans la littérature de la façon suivante (Patel et al., 2015) :

Un taux d'aspiration élevé peut augmenter la température de sortie du gaz de séchage, diminuer l'humidité résiduelle du produit final et séparer plus uniformément les particules dans le cyclone.

Si la formulation est visqueuse ou très concentrée en produits, il y a moins de liquide à évaporer et une augmentation de la température de sortie du gaz de séchage est observée (la phase de séchage adiabatique est donc relativement courte). Les gouttelettes atomisées contiennent plus de solide et la taille des particules en fin de séchage est donc plus importante, ce qui permet une facilité de séparation et aboutit à un rendement plus élevé. Le produit final est moins humide.

Si le taux d'humidité du gaz de séchage est important, le temps de séchage est plus long et les particules humides peuvent adhérer aux parois de l'atomiseur, ce qui diminue le rendement final de la poudre et augmente son humidité.

Un flux d'alimentation très élevé diminue la température de sortie, augmente la taille des gouttelettes et donc la taille des particules. Le taux d'humidité dans le produit final est plus important.

Un flux de gaz de séchage élevé diminue la température de sortie et produit des gouttelettes de taille moins importante en sortie de la buse, ce qui induit une taille de particules plus faible.

Une température d'entrée du gaz de séchage élevée augmente proportionnellement la température de sortie, augmente le rendement et amène à la production d'un produit moins collant.

L'utilisation d'un solvant organique amène à la formation de particules de tailles plus petites en raison d'une tension de surface moins importante.

Ces paramètres peuvent être résumés dans le **Tableau 5** qui peut aider à optimiser un cycle d'atomisation. Ce tableau permet de mettre en évidence l'influence que chacun de ces paramètres peut avoir sur la température de sortie, la taille des particules, l'humidité résiduelle de la poudre, le rendement durant un cycle d'atomisation et donc permet de définir les paramètres optimaux suivant les propriétés attendues pour le produit final.

Tableau 5 – Effets des paramètres du procédé et de la formulation sur les caractéristiques finales du produit atomisé (adapté de (Patel et al., 2015)).

Paramètres	Aspiration	Humidité du gaz de séchage	Température d'entrée	Flux du gaz de séchage	Flux d'alimentation solution	Viscosité de la formulation	Solvant organique à la place de H ₂ O
Dépendance	+	+	+	+	+	+	+
Température de sortie	++	+	+++	-	--	++	+++
Taille des particules	X	X	X	---	+	+++	-
Humidité résiduelle	--	++	--	X	++	-	---
% de rendement	++	-	+	X	-+	+	++
+++ : grande influence – augmentation			--- : grande influence – diminution			X : pas d'influence	
++ : influence modéré – augmentation			-- : influence modéré – diminution				
+ : Influence mineur – augmentation			- : Influence mineur – diminution				

1.2.6 Atomisation des différents excipients

Les formulations contenant des biomolécules telles que des protéines, des peptides, des anticorps montrent une instabilité à l'état liquide à température ambiante. La lyophilisation est la technique de séchage la plus utilisée pour la production de poudres pharmaceutiques, mais avec le développement de nouvelles voies d'administration telles que les poudres pour administration transdermique ou l'administrées par inhalation (Chen et al., 2002; Maa et al., 1999), la lyophilisation ne peut pas toujours être utilisée pour l'obtention d'un produit ayant les propriétés requises. L'atomisation est une technique de séchage durant laquelle il est possible de contrôler les propriétés des poudres. C'est un procédé facile et qui peut être industrialisé. C'est pour cela qu'il peut être une réelle alternative à la lyophilisation. Cependant, même si le procédé d'atomisation permet de s'affranchir de certaines contraintes liées à la lyophilisation (formation d'interfaces glace-eau, variations de pH...), les formulations atomisées sont exposées à des températures relativement élevées, ce qui peut être une contrainte pour les produits sensibles à la température.

Il existe de nombreuses études dans la littérature qui décrivent l'atomisation de molécules biologiques en présence de différents excipients (Adler and Lee, 1999; Chen et al., 2021; Haque and Roos, 2006; Hulse et al., 2009a, 2009b; Maury et al., 2005). Il a été démontré que la stabilité des molécules biologiques lors de l'atomisation dépend à la fois du type de protéine et du choix des excipients (Wilson et al., 2020, 2019). La littérature montre que dans la plupart des cas, l'atomisation de formulations pures de protéine (sans l'ajout d'adjuvants) entraîne une agrégation ou une inactivation de cette dernière (Mumenthaler et al., 1994), et que l'ajout d'agents stabilisants tels que des sucres ou des acides aminés est nécessaire au maintien de l'activité biologique.

Dans le cadre des travaux de cette thèse, trois excipients (le tréhalose, le lactose et le mannitol) ont été atomisés, puis caractérisés à l'état de poudre et de comprimés.

Le tréhalose :

Il a par exemple été démontré que l'ajout de tréhalose, d'arginine ou de saccharose diminuait la perte d'activité de la β -galactosidase (Broadhead et al., 1994). Le saccharose et le tréhalose sont certes de bons stabilisateurs, mais il a été démontré qu'il était extrêmement difficile de les atomiser. Le saccharose atomisé est extrêmement hygroscopique alors que le tréhalose atomisé forme des agrégats fusionnés et collants à une température d'entrée supérieure à 90 °C (Maa et al., 1997).

Une étude a essayé de montrer l'évolution de la stabilité de la LDH atomisée en présence de tréhalose (Adler and Lee, 1999). La formulation se composait de 10 % (m/m) de tréhalose, de LDH et de polysorbate 80 et l'atomisation a été réalisée dans les mêmes conditions (flux d'alimentation = 4mL / minute, flux d'air de séchage = 0,7 m³/ heure, pression d'aspiration = 38 mbar) en modifiant uniquement la température d'entrée d'air de séchage ($T_{\text{entrée}1} = 90 \text{ °C}$, $T_{\text{entrée}2} = 110 \text{ °C}$, $T_{\text{entrée}3} = 130 \text{ °C}$ $T_{\text{entrée}4} = 150 \text{ °C}$) (Adler and Lee, 1999). Cette étude montre un effet marqué de ce paramètre sur la structure physique des poudres obtenues, le rendement, le pourcentage d'humidité résiduelle et la T_g . Pour toutes les températures utilisées, les diffractogrammes montrent que le tréhalose atomisé est complètement amorphe. Plus la température d'entrée d'air est élevée, plus le rendement est élevé et le pourcentage d'humidité résiduelle diminue. Cela a pour effet d'augmenter la T_g (par exemple la T_g du tréhalose atomisé à des $T_{\text{entrée}}$ de 110 ou 130 °C est respectivement de 72 °C et de 86 °C) et donc d'améliorer la stabilité de la LDH pendant le stockage (Adler and Lee, 1999). Cependant, les molécules biologiques étant dans la majorité des cas sensibles à la chaleur, même si les propriétés des poudres sont meilleures quand la T_g est élevée, il est important de voir l'impact de la température sur la stabilité des biomolécules en sortie de l'atomiseur. La même étude a démontré que plus la température d'entrée lors de l'atomisation est basse, plus l'activité de la LDH est élevée juste après le procédé. Cependant, après stockage, il a été démontré que plus la température d'entrée est élevée (T_g plus élevée), plus la LDH conservait son activité au cours du temps, alors qu'une baisse rapide de l'activité est observée quand la température d'entrée était faible (T_g est plus faible) (Adler and Lee, 1999). Cela met en évidence l'importance d'avoir la T_g la plus élevée possible pendant le stockage.

Le lactose :

Dans le cadre des travaux de cette thèse, le lactose a été atomisé dans le but de comparer ses propriétés physico-chimiques avec d'autres excipients atomisés dans un premier temps, puis ses propriétés mécaniques pendant et après compression. Dans cette partie, seules les propriétés

physico-chimiques du lactose atomisé seront exposées et ses propriétés en compression seront décrites plus en détails dans la partie dédiée à la compression des poudres pharmaceutiques.

Le lactose atomisé est de loin l'excipient atomisé le plus répandu. Quand le lactose en suspension est atomisé, la poudre atomisée est généralement composée d'un mélange de petits agglomérats sphériques de cristaux de lactose α -monohydrate liés ensemble par une petite quantité de produit amorphe (Gohel and Jogani, 2005). Le caractère cristallin est connu pour l'amélioration des propriétés d'écoulement alors que le caractère amorphe, lui est connu pour améliorer la comprimabilité du produit. La comparaison de la poudre atomisée au lactose α -monohydrate montre qu'elle s'écoule plus facilement, que l'atomisé possède des propriétés supérieures en terme de compression et qu'il présente de meilleures propriétés de cohésion (Gohel and Jogani, 2005). Le lactose amorphe est métastable, très hygroscopique et il adsorbe donc l'humidité très rapidement (Roos and Drusch, 2015).

Quand le lactose en solution aqueuse est atomisé, il est bien décrit qu'il forme une poudre essentiellement amorphe (Haque and Roos, 2005). Mais, le lactose atomisé, amorphe après atomisation, cristallise pendant le stockage (Haque and Roos, 2005). En effet, il a été démontré que le lactose amorphe produit par lyophilisation ou par atomisation cristallisait à des vitesses différentes suivant le taux d'humidité relative auquel il est stocké. Le lactose atomisé absorbe moins d'humidité que le lactose lyophilisé et cristallise plus rapidement (Haque and Roos, 2005). En effet, le diffractogramme du lactose atomisé a montré qu'il est majoritairement amorphe et minoritairement cristallin (présence de pics de cristallisation). Par contre, le lactose lyophilisé était complètement amorphe. Ces cristaux présents dans le lactose atomisé peuvent être la cause principale de sa cristallisation plus rapide que le lactose lyophilisé (Haque and Roos, 2005).

Concernant l'influence des paramètres du procédé, une autre étude montre qu'il y a une relation entre la température d'entrée et le degré de cristallisation du lactose (Chiou et al., 2008). Dans cette étude, des formulations contenant 15 % (m/m) de lactose ont été préparées et atomisées selon les paramètres suivants : aspiration à 100 % (0,0149 kg/s), débit du gaz de séchage à 19,9 L/min, débit d'alimentation de la solution à 23 % (0,000106 kg/s). Selon la température d'entrée que les auteurs ont fait varier entre 134 °C et 210 °C, le degré de cristallinité du lactose atomisé se situe entre 55 % et 76 % (Chiou et al., 2008). Ce résultat montre que le degré de cristallinité peut être contrôlé en ajustant les paramètres du procédé.

Le mannitol :

Le mannitol atomisé est disponible commercialement comme excipient pour compression directe. L'utilisation du mannitol atomisé permet un contrôle de la taille de ses particules. Durant le procédé d'atomisation, il est possible de produire différents polymorphes cristallins (Hulse et al., 2009b). De

plus, les formes métastables du mannitol peuvent évoluer durant le stockage et se transformer en d'autres polymorphes non souhaités. En modifiant certains paramètres de la formulation ou du procédé, il est donc possible de produire différents polymorphes du mannitol.

L'atomisation du mannitol en présence de PVP (polyvinylpyrrolidone) permet de produire le polymorphe δ du mannitol qui peut être stable pendant 6 mois de stockage et peut être utilisé pour améliorer la comprimabilité de certains médicaments (Vanhoorne et al., 2016).

Une autre étude a montré qu'après une augmentation de la concentration de la solution atomisée de 2 % à 8 ou 15 %, le pourcentage du polymorphe β augmente de 70 % à 100 %, alors qu'il y a une baisse du pourcentage de la forme α (Lu et al., 2022).

Il a également été montré qu'en modifiant les paramètres du procédé, telle que la température de sortie, les polymorphes formés peuvent être différents (Littringer et al., 2012). Pour une T_{sortie} de 67 °C, le seul polymorphe formé était le mannitol β , et après une augmentation de T_{sortie} jusqu'à 84 °C ou 102 °C, il y a eu formation d'une petite quantité du polymorphe α en plus du β (Littringer et al., 2012).

Il a aussi été démontré qu'une température d'entrée programmée entre 60 et 110 °C amenait à la formation du polymorphe β mais une plus grande élévation de cette température a conduit à la formation de plus en plus importante du polymorphe α (à $T_{\text{entrée}} = 140$ °C, la poudre atomisée contenait 16 % du polymorphe α) (Maas et al., 2011). Le mannitol est donc un produit très sensible aux paramètres du procédé d'atomisation et aux paramètres de la formulation.

Hulse et al. ont quant à eux travaillé sur l'effet sur les formes polymorphiques du mannitol de l'incorporation de différents types de protéines dans les formulations atomisées (Hulse et al., 2009a). Il a été démontré que suivant la protéine modèle utilisée (trypsine ou lysozyme), le mannitol atomisé dans les mêmes conditions pouvait être complètement cristallin ou complètement amorphe (Hulse et al., 2009a). De plus, après stockage à des températures et humidités élevées, il y a eu évolution du mannitol en polymorphes différents (β ou δ) suivant la protéine avec laquelle il a été atomisé (Hulse et al., 2009a).

Finalement, en termes de stabilisation de l'activité des protéines, Broadhead et al. ont montré que la variation des paramètres d'atomisation, pouvait influencer sur l'activité résiduelle de la β -galactosidase. Quatre agents stabilisateurs (mannitol, saccharose, tréhalose et arginine hydrochlorique) ont été atomisés avec cette dernière, dans les mêmes conditions et il a été démontré que le mannitol avait un effet stabilisant moins important que le saccharose et l'arginine et le tréhalose (Broadhead et al., 1994).

Ces études permettent de mettre en évidence l'importance du choix de l'excipient et des paramètres du procédé d'atomisation. Il est important de faire le compromis entre les différents choix, afin

d'obtenir une poudre où la biomolécule conserve le maximum de son activité après le procédé, et le plus longtemps possible pendant le stockage. L'atomisation de différents excipients doit donc prendre en compte les propriétés physico-chimiques de ces derniers afin de pouvoir optimiser au mieux les paramètres du procédé et de formulation, et obtenir la poudre aux propriétés souhaitées.

Le choix de l'excipient se base sur l'utilisation de la poudre :

- Si l'atomisation vise à produire une poudre contenant une biomolécule, il est préférable d'utiliser le tréhalose comme excipient car les travaux de la littérature montrent qu'il est un agent stabilisant très prometteur.
- Le lactose et le mannitol peuvent être atomisés pour améliorer les propriétés physicochimiques de la poudre (formation des polymorphes souhaités ou contrôle de la taille des particules et de la distribution granulométrique), ou pour leur conférer de meilleures propriétés en compression pharmaceutique (meilleurs écoulement et cohésion).

1.2.7 Les avantages et les inconvénients du procédé d'atomisation

Le procédé d'atomisation est très répandu dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques en raison des nombreux avantages résumés dans la liste ci-dessous (Haque et al., 2015):

- Le séchage est très rapide et les particules produites sont plus ou moins uniformes et sphériques.
- C'est un procédé facilement industrialisable. Le débit d'alimentation peut varier de quelques kg/heure jusqu'à 100 tonnes/heure.
- L'atomisation est un procédé rapide. L'évaporation se fait en quelques secondes, les produits sont soumis très peu de temps aux hautes températures, ce qui est un avantage pour les produits sensibles aux températures élevées.
- C'est un procédé en continu qui peut être adapté à un contrôle 100 % automatisé.
- Il existe différents types de système d'atomisation qui peuvent être adaptés à des produits spécifiques.
- Les solutions, suspensions, gels et bien d'autres produits peuvent être séchés par atomisation.
- Il est possible de contrôler la taille des particules, la masse volumique apparente et le degré de cristallisation durant le procédé d'atomisation.
- C'est un procédé quatre à sept fois plus économique que la lyophilisation (Chávez and Ledebøer, 2007).

Bien que le séchage par atomisation ait beaucoup d'avantages, il existe quelques inconvénients pour ce procédé :

- Les atomiseurs industriels, spécialement ceux avec une grande capacité, deviennent de plus en plus sophistiqués en termes de structure et de contrôle et donc requièrent un grand investissement initial.
- Un atomiseur industriel demande un certain nombre de personnel technique, bien formé pour une bonne exploitation et une bonne maintenance.
- Dans certains cas, la récupération de la poudre est difficile. Il peut y avoir une perte du produit à cause de l'entraînement par l'aspiration ou bien de son adhésion sur les parois de la chambre de séchage. Cela peut diminuer le rendement de l'opération, surtout dans le cas des produits riches en sucre qui adhèrent fortement aux parois des différentes parties de l'atomiseur.

1.3 Le comprimé et la compression pharmaceutique

1.3.1 La compression pharmaceutique

La pharmacie galénique est la science et l'art de préparer un principe actif, sous différentes formes possibles, et de le rendre administrable au patient. La forme la plus représentée pour une administration par voie orale est la forme comprimée. Le but est donc de produire des comprimés, à partir de poudres provenant de différentes sources tels que :

- Des poudres lyophilisées.
- Des poudres atomisées.
- Des poudres cristallines pour compression directe.
- Des poudres cristallines broyées.

D'après la Pharmacopée Européenne (11^{ème} édition) (European Pharmacopeia, 2022), la monographie traitant des formes pharmaceutiques, plus précisément la section « comprimés », décrit les comprimés pharmaceutiques comme étant des préparations solides contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules ou par un autre procédé de fabrication approprié.

Les comprimés pharmaceutiques sont assez avantageux :

- C'est une forme sèche qui permet une bonne conservation du principe actif.
- Il est possible de contrôler la libération du principe actif par différentes techniques.
- Il est possible de masquer la saveur grâce à l'enrobage.
- Les comprimés peuvent être fabriqués à grande échelle en industrie pharmaceutique, ce qui diminue le prix de fabrication.
- Les comprimés ont un dosage bien précis.
- En général, les comprimés pharmaceutiques ont une résistance mécanique suffisante, ce qui permet un transport et un conditionnement facile.

Les comprimés pharmaceutiques ont aussi quelques inconvénients :

- Une difficulté à avaler si le comprimé est de grande taille.
- La mise au point est délicate.
- Le principe actif ne peut pas être sous forme liquide. Il doit être séché et transformé en poudre, ce qui peut être contraignant pour les produits sensibles aux températures élevées.
- Dans la plupart des cas, il est nécessaire d'utiliser différents excipients pour produire un comprimé. Ces excipients peuvent avoir des effets secondaires (excipients à effet notoire).

Durant le procédé de compression, il est nécessaire d'optimiser à la fois les paramètres du procédé ainsi que ceux de la formulation afin de pouvoir produire des comprimés sans défauts, contenant la

bonne quantité de principe actif et ayant une résistance mécanique suffisante pour pouvoir être transportés et manutentionnés.

1.3.2 Principe de la compression

1.3.2.1 Instrumentation des presses

La force de compression (F_{comp}) se mesure en Newton (N) et elle est en relation directe avec l'effort axial appliqué par les poinçons sur la poudre. Les machines de compression sont généralement équipées de capteurs de déformation (jauges de contraintes) au niveau des poinçons ou des galets qui permettent, après un étalonnage, de mesurer la force appliquée par les poinçons sur les poudres. La force appliquée au cours de la compression par les poinçons se distribue sur la surface du lit de poudre. Cette surface est équivalente à celle du jeu de poinçons utilisés ($S_{poinçon}$). Ramener la force appliquée à la surface d'application permet de déterminer la contrainte axiale ou pression de compression (P_{comp}) exercée sur le lit de poudre. Cette relation est donnée par l'**équation 12** :

$$P_{comp} = \frac{F_{comp}}{S_{poinçon}} \quad \text{Équation 12}$$

La pression de compression (P_{comp}) se calcule en MPa et elle représente la valeur moyenne de la contrainte axiale (σ_{ax}) appliquée à la surface du comprimé (**Figure 23**). Cette contrainte axiale appliquée sur la surface du comprimé génère une contrainte radiale (σ_{rad}) sur les surfaces de la matrice en contact avec le lit de poudre, du fait du confinement du lit de poudre dans celle-ci, la matrice étant considérée comme non déformable (**Figure 23**). Il est possible d'équiper la matrice de capteurs (jauges de contraintes ou capteurs piézoélectriques) qui permettent de mesurer la contrainte radiale (σ_{rad}), et donc d'avoir accès à la distribution de contrainte dans les trois dimensions. L'utilisation de ces capteurs nécessite une calibration préalable des forces mesurées pour différents niveaux de hauteur de compression et donc de surface de matrice.

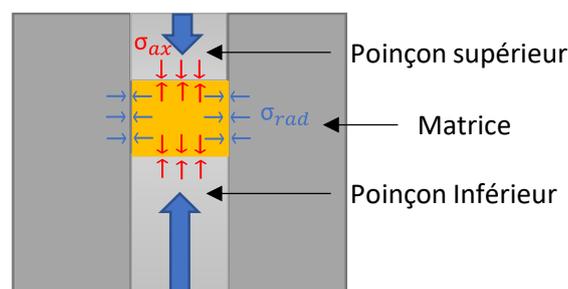


Figure 23 – Contraintes axiale (σ_{ax}) et radiale (σ_{rad}) appliquées sur un comprimé par les poinçons et la matrice.

1.3.2.2 Les étapes du procédé

Avant la description des différentes étapes du procédé de compression, il est important de connaître les trois composants essentiels qui permettent de produire un comprimé : le poinçon supérieur venant au-dessus de la matrice (**Figure 24 A**), le poinçon inférieur venant en dessous de la matrice (**Figure 24 B**) et la matrice (**Figure 24 C**). La compression pharmaceutique se fait en comprimant la poudre dans la matrice par l'intermédiaire des deux poinçons (supérieur et inférieur).



Figure 24 – Outillages de la machine à compression : poinçon supérieur (A), poinçon inférieur (B), matrice (C) (www.directindustry.fr).

La matrice est une pièce métallique percée d'un orifice parfaitement calibré permettant la pénétration de chaque côté des poinçons de façon parfaitement ajustée. La géométrie de l'orifice de la matrice peut prendre différentes formes et peut avoir différents diamètres, ce qui détermine la forme (cylindriques, oblongs, parallélépipédiques, biconvexes, ajout de gravures...) et la taille du comprimé. La matrice est encastrée sur la presse à comprimer entre les deux poinçons positionnés dans l'axe. La matrice est une pièce fixe alors que les poinçons sont mobiles.

Le poinçon inférieur possède une tête plus longue que le poinçon supérieur. Cela permet de régler la hauteur de remplissage dans la matrice, de déterminer le volume de remplissage et donc de déterminer la masse finale du comprimé. La longueur de la tête du poinçon sert aussi à éjecter le comprimé formé en fin de compression. Tout au long du cycle de compression, le poinçon inférieur reste dans la matrice.

Le poinçon supérieur est responsable de la compression de la poudre dans la matrice. Il pénètre dans la matrice, comprime la poudre et ressort de la matrice avant que le poinçon inférieur éjecte le comprimé.

Pendant le procédé de compression, la poudre pharmaceutique passe par quatre étapes successives pour la fabrication d'un comprimé monocouche (un seul mélange de poudre et un seul cycle de

compression). Le schéma des différentes étapes du procédé de compression est représenté sur la **Figure 25**.

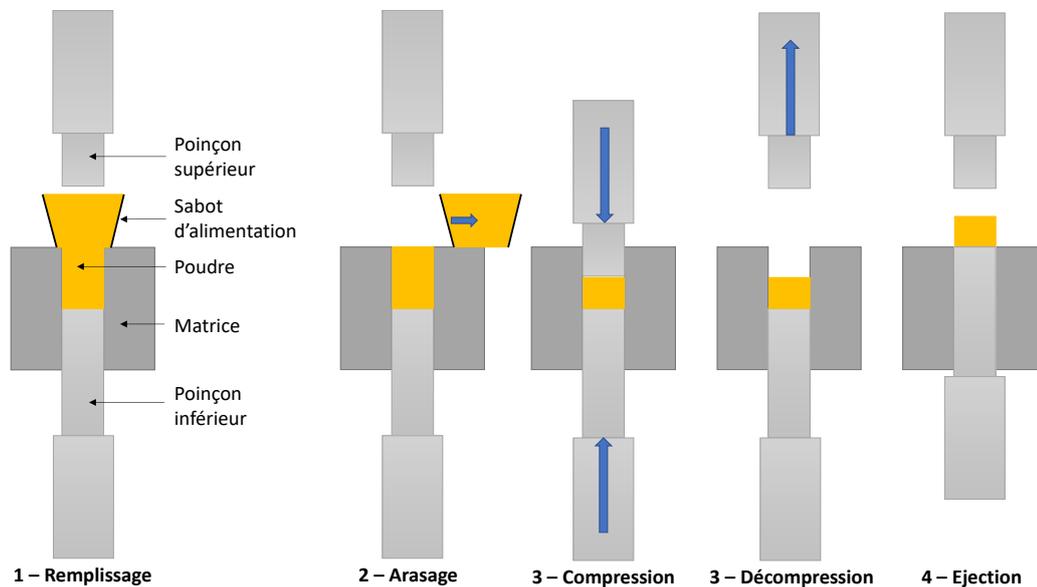


Figure 25 – Schéma des différentes étapes d'un procédé de compression visant à produire un comprimé monocouche à l'aide d'une machine à compression mono-station.

Les étapes du procédé de compression peuvent être décrites de la façon suivante :

- 1) Le remplissage** est la première étape du cycle. Il consiste à remplir la matrice d'un volume de poudre défini par la matrice et la position du poinçon inférieur. Le remplissage de la poudre se fait par l'intermédiaire d'une trémie d'alimentation qui se trouve au-dessus de la matrice. Selon la machine à compression utilisée, c'est la trémie d'alimentation qui peut être mobile au-dessus de la matrice, ou bien la matrice qui est mobile en dessous de la trémie. La poudre remplit la matrice en s'écoulant sous l'effet de la force de gravité (alimentation gravitaire), ou par des pales rotatives qui forcent la poudre à s'écouler dans le cas où la trémie en est équipée (alimentation forcée). Pendant l'étape de remplissage, la hauteur du poinçon inférieur est réglée de façon à définir un volume déterminé de remplissage pour pouvoir produire des comprimés de la masse souhaitée. Le poinçon supérieur est relevé au-dessus de la matrice en attendant la fin du remplissage.
- 2) L'arasage** suit l'étape de remplissage. Elle sert au contrôle de la reproductibilité du volume de remplissage. Le sabot d'alimentation est équipé d'une barrette d'arasage en contact avec la matrice qui permet après un mouvement à l'horizontale d'éliminer le surplus de poudre présent à la surface de la matrice. Une fois que la trémie d'alimentation s'éloigne de la matrice,

la place est cédée au poinçon supérieur pour qu'il puisse descendre et comprimer la poudre. Dans certains cas, avant le début de la compression, il y a recul du poinçon inférieur et abaissement du niveau de la poudre afin de permettre au poinçon supérieur de pénétrer dans la matrice sans risque d'éjection de la poudre à l'extérieur.

- 3) La compression** : pendant cette étape les 2 poinçons se rapprochent de sorte à réduire le volume du lit de poudre présent dans la matrice jusqu'à la formation du comprimé.

La **Figure 26** schématise l'évolution de la pression axiale appliquée à la poudre en fonction de la distance entre les poinçons. Quand les poinçons touchent la poudre au début du cycle, la force mesurée sur les poinçons est très faible. C'est à ce moment que le tassement de la poudre se fait par un réarrangement des grains (**Figure 26 A – B**).

Pendant la compression proprement dite, plus les poinçons se rapprochent, plus la masse volumique de la poudre et donc la pression axiale augmentent jusqu'à la pression maximale. Le rapprochement des poinçons s'arrête quand la pression de compression ou le déplacement des poinçons programmés est atteint (**Figure 26 B – C**). Pendant cette étape, le lit de poudre résiste à la sollicitation axiale en se densifiant, la contrainte augmente dans la matrice et les grains se déforment de manière à la fois réversible (élastique) et irréversible (plastique). La pression appliquée entraîne un contact très intime entre les grains, ce qui va permettre le développement d'interactions sous différentes formes (liaisons de type Van der Waals, ponts solides ...) et la formation d'un comprimé cohésif.

La dernière étape est la décompression. Elle correspond à la chute de la pression axiale sur le comprimé jusqu'à redevenir nulle (**Figure 26 C – E**) en raison de l'éloignement des poinçons (**Figure 26 E – A**) et de la sortie du poinçon supérieur de la matrice. Pendant cette étape, alors que le comprimé est encore dans la matrice, une partie de l'énergie emmagasinée sous forme d'énergie élastique lors du procédé est restituée. Cela provoque une expansion du comprimé dans l'axe de la compression et par ailleurs, bien que la contrainte axiale soit revenue à zéro, une contrainte radiale résiduelle est quant à elle toujours présente sur les parois de la matrice.

Le graphique de la **Figure 26** permet de définir plusieurs paramètres d'énergie :

- 1) L'énergie totale de compression E_{totale} (délimitée par les points A, C et D) et exprimée en (J). $E_{\text{totale}} = E_1 + E_2$.
- 2) E_1 est l'énergie net de compression (délimitée par les points A, C et E).
- 3) E_2 est l'énergie élastique (délimitée par les points E, C et D).

L'étape de compression peut être programmée de sorte à réduire les problèmes classiques qui peuvent survenir pendant la compression (décalottage, laminage, cohésion...). Il est en particulier possible de réaliser une pré-compression pour favoriser l'échappement d'air entre les particules de poudre au cours de leur densification. Cela permet d'éviter, dans certains cas, les problèmes de décalottage. Il est également possible de maintenir le comprimé sous la pression de compression maximale pendant un certain temps (augmentation du temps de séjour dans la matrice ou dwell time en anglais), ce qui permet d'augmenter la cohésion dans le cas de certaines poudres.

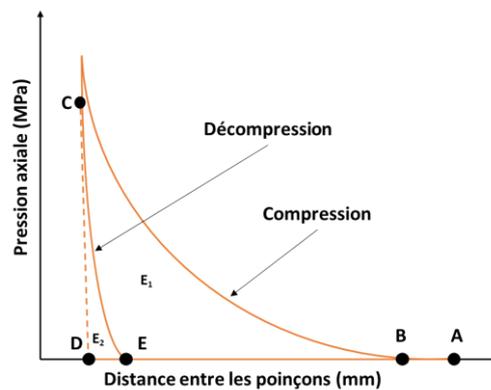


Figure 26 – Evolution de la pression axiale en fonction de la distance entre les poinçons pendant l'étape de compression. E_1 représente l'énergie net de compression, E_2 représente l'énergie élastique. Les points ACD, ACE et ECD délimitent respectivement l'énergie totale de compression, l'énergie net de compression et l'énergie plastique.

- 4) **L'éjection** est l'étape finale du procédé de compression. Elle correspond à la sortie du comprimé formé, poussé par le poinçon inférieur. Pendant cette étape, le poinçon inférieur se déplace le long de la matrice jusqu'à ce que le comprimé formé soit complètement éjecté de cette dernière. Le comprimé peut à ce stade être récupéré manuellement ou bien à l'aide d'un dispositif automatique.

1.3.2.3 L'énergie plastique

L'énergie plastique (E_p) est considérée comme l'énergie totale fournie à une poudre durant un cycle de compression. Cette énergie est propre au comportement en compression d'un matériau donné, et il a été démontré qu'une faible (E_p) peut être en relation avec des problèmes tels que le décalottage (Nakamura et al., 2012). Cette énergie peut être normalisée par le volume de solide comprimé afin de pouvoir comparer des produits ayant des masses volumiques vraies différentes. Après avoir pesé le comprimé et mesuré la masse volumique de la poudre, il est possible de normaliser l'énergie plastique par rapport au volume du comprimé d'après l'équation 13 :

$$E_{pn} = \frac{E_p \times \rho}{m} \times 1000 \quad \text{Équation 13}$$

Où E_{pn} est l'énergie plastique normalisée en (J/cm^3), E_p est l'énergie plastique non normalisée en (J), m est la masse en (mg) et ρ est la masse volumique de la poudre en (g/cm^3).

Ce paramètre a été utilisé dans la caractérisation des différents matériaux élaborés au cours de ce travail de thèse et a permis de montrer qu'il existe une relation entre texture, structure, procédé de production de la poudre et énergie plastique. Cela sera discuté plus en détail dans la partie résultats et discussions.

1.3.3 Les différentes machines à compression

Il existe deux types de machines à compression, les presses rotatives et les presses à station fixe (mono-station).

La presse rotative est constituée d'une tourelle qui comporte plusieurs jeux de poinçons/matrices. Son sabot est fixe et l'ensemble des poinçons et matrices se déplacent horizontalement de façon circulaire. Quand la matrice arrive sous le sabot d'alimentation, elle se remplit pendant que le poinçon supérieur est soulevé et que le poinçon inférieur est positionné dans une position de léger sur remplissage. Le poinçon inférieur remonte ensuite à la bonne hauteur de remplissage. Une fois le remplissage terminé, la poudre est arasée, le poinçon inférieur redescend légèrement en dessous de la position de remplissage et l'ensemble poinçon/matrice remplie continue sa trajectoire horizontale. Le poinçon supérieur est guidé par une came pour pénétrer dans la matrice, puis les deux poinçons vont passer sous les galets de pré-compression et de compression avec relâchement des contraintes entre les deux galets. Une fois la compression terminée, les poinçons sont repris par un jeu de came, le poinçon supérieur sort de la matrice et le poinçon inférieur éjecte progressivement le comprimé formé. Quand le comprimé est produit, il est récupéré par un doigt d'éjection. Les différentes étapes de la compression sur une presse rotative sont présentées sur la **Figure 27**. Le rendement d'une presse rotative est beaucoup plus élevé qu'avec une presse mono-station. Il dépend de la taille de la tourelle, du nombre de jeux poinçons/matrices et de la vitesse de rotation.

Dans le cas des presses rotatives, il est possible de régler plusieurs paramètres afin d'obtenir les comprimés aux caractéristiques voulues. Pour régler la quantité de poudre dans les matrices, il suffit d'ajuster la hauteur du poinçon inférieur dans la matrice au niveau du poste de remplissage qui fait l'objet d'une boucle de régulation descente (**Figure 27**). L'épaisseur des comprimés et donc la pression axiale exercée pour une quantité de poudre définie, peut être programmée en changeant la distance entre les galets de pré-compression et de compression. Il est aussi possible de programmer la vitesse de compression en changeant la vitesse de rotation des tourelles. Connaissant la relation

masse versus force de compression, toute variation de cette force (liée à une variation du remplissage) pour un réglage d'épaisseur donné du comprimé peut être compensée par une boucle d'automatisme qui joue directement sur le poste de remplissage. Les propriétés rhéologiques de la poudre alimentant la machine s'avèrent donc cruciales pour permettre de garantir l'uniformité de la masse des comprimés produits.

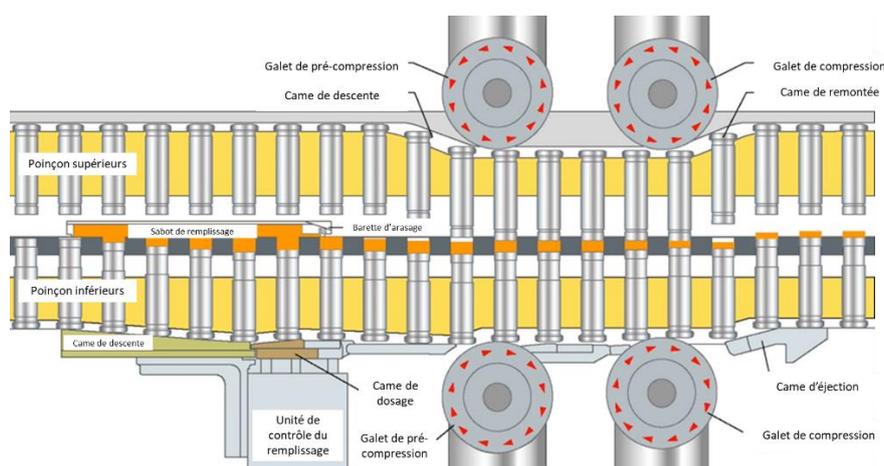


Figure 27 – Schéma du fonctionnement d'une presse rotative ; téléchargé et traduit de (www.romaco.com).

La presse mono-station, à l'inverse de la presse rotative, ne comporte qu'un jeu de poinçons et une seule matrice qui sont en position fixe. C'est le sabot de remplissage contenant la poudre qui est mobile et qui se positionne au-dessus de la matrice afin de la remplir. Il est même possible de réaliser le remplissage manuellement quand les quantités de poudre disponibles sont faibles. Le principe de fonctionnement de cette machine est présenté sur la **Figure 25**.

L'avantage de ce type de machine est qu'elle est capable de reproduire le plus exactement possible la cinématique des presses rotatives utilisée à l'échelle industrielle, d'où son nom de « simulateur de compression » ou, plus exactement, de « simulateur de presse rotative ». Son rendement est moins important que la presse rotative et elle est généralement utilisée dans les phases de développement à des fins de caractérisation dans des laboratoires de recherche et développement, ou pour la fabrication de petits lots destinés par exemple au développement clinique de nouvelles molécules. Parmi les simulateurs de compression, la 'Styl'One' évolution et la 'Styl'Cam' sont deux machines développées par le constructeur Medelpharm. Dans le cadre des travaux de cette thèse, la Styl'One Evolution a été utilisée pour la fabrication de tous les comprimés. Le fonctionnement de cette machine sera décrit plus en détail dans la partie Matériels et Méthodes (cf. **Chapitre 2**).

1.3.4 Avantages et inconvénients de la compression directe

Par définition, la compression pharmaceutique directe consiste à compresser fortement une poudre dans la matrice pour former un comprimé. Cependant, certaines poudres de substances actives ont des propriétés mécaniques et/ou rhéologiques qui rendent difficile la compression directe. C'est pour cette raison que dans de nombreux cas, il est nécessaire d'utiliser des adjuvants appelés excipients de compression directe qui ont pour rôle d'améliorer les propriétés de compression des poudres pharmaceutiques. Dans d'autres cas, cet ajout d'excipient n'est pas suffisant et il est alors nécessaire de procéder à une opération de granulation préalable. Parmi les avantages de la compression directe, il est possible de citer les avantages suivants (Jivraj et al., 2000):

- Procédé rapide qui permet des productions à des cadences élevées.
- Peu de problème de stabilité des principes actifs sensibles à la température et à l'humidité.
- Procédé qui nécessite moins d'opérations unitaires par rapport à la granulation humide (temps de traitement plus court et consommation énergétique réduite).

La compression directe possède également quelques désavantages (Jivraj et al., 2000) :

- Risques de ségrégation pendant le remplissage et le déchargement de la trémie d'alimentation.
- Non adaptée aux poudres s'écoulant mal.
- Non adaptée aux matériaux à faible masse volumique apparente nécessitant de très grands volumes de remplissage.

1.3.5 Les excipients

Un comprimé pharmaceutique issu de la compression directe est formé de deux composants essentiels :

Le principe actif qui est la molécule du médicament ayant le pouvoir thérapeutique.

Les excipients qui sont les composés présents dans le comprimé différents de la substance active et qui sont thérapeutiquement inactives. Les excipients facilitent le procédé de compression et confère au comprimé des propriétés permettant son administration et sa conservation. Un excipient peut être mélangé en grande quantité avec un principe actif sans qu'il y ait une détérioration significative de la qualité du comprimé (Armstrong, 1997). En plus de leurs propriétés en compression, les excipients doivent avoir quelques caractéristiques essentielles :

- Une distribution granulométrique similaire à celle de la substance active pour éviter la ségrégation.
- Une masse volumique apparente élevée et proche de celle de la substance active.

- Une reproductibilité de la qualité d'un lot à l'autre.
- Une stabilité physique et chimique lors d'un contact avec l'air ou lors d'une élévation de la température.
- Une inertie chimique pour éviter l'altération des autres composants du comprimé (substance active ou autres excipients).
- Une compatibilité avec les composants des emballages.
- Une disponibilité mondiale auprès de plusieurs fournisseurs.

Les excipients sont regroupés selon différentes classes, selon leurs fonctions en compression, l'administration du comprimé ou bien toute autre étape de son cycle de vie.

Les diluants occupent généralement la plus grande partie du volume d'un comprimé. Les substances actives peuvent être dosées très faiblement dans un comprimé, ce qui rend difficile leur compression. L'ajout d'un diluant permet alors la production de comprimés de taille acceptable. Ces produits doivent avoir de bonnes propriétés de compression (compressibilité, compactibilité, tablétabilité, écoulement) et doivent être compatibles avec l'ensemble des composants d'une formulation. Parmi les diluants les plus couramment utilisés, il est possible de citer la cellulose microcristalline, le mannitol, le phosphate de calcium ou le lactose.

Les liants sont des composés utilisés pendant l'étape de granulation (afin de permettre la formation de poudres avec des tailles de particules plus grandes pour améliorer leur écoulement) ou ajoutés dans le mélange pour compression directe. Leur rôle est de créer de la cohésion entre les particules. Le PEG (polyéthylène glycol) et l'HPMC (hydroxypropylméthylcellulose) sont des liants couramment utilisés en industrie pharmaceutique.

Les lubrifiants sont des excipients qui permettent de réduire les frictions des particules entre elles, et entre la poudre et l'outillage de compression (matrice et poinçons) lors de la compression. En raison des contraintes axiales et radiales fortes qui s'exercent sur le lit de poudre pendant le procédé de compression, il est nécessaire d'ajouter un lubrifiant à la formulation pour éviter les phénomènes de collage de la poudre sur les poinçons et pour pouvoir éjecter le comprimé de la matrice en limitant les frictions. Le lubrifiant le plus couramment utilisé en compression est le stéarate de magnésium.

Les agents d'écoulement ou glidants ont pour rôle d'améliorer la coulabilité de la poudre. C'est une propriété très importante en compression pharmaceutique. Une poudre qui possède un bon écoulement est nécessaire au bon remplissage de la matrice et permet la production de comprimés de masse reproductible. La silice colloïdale est un agent d'écoulement très couramment utilisé.

Les agents de désagrégation sont des produits qui gonflent au contact de l'eau et qui facilitent le délitement d'un comprimé au contact des fluides biologiques. Un médicament comprimé sous forte pression peut être très cohésif et peut avoir une difficulté à se désagréger. L'ajout d'un désintégrant

permet donc à la fois la production de comprimés très cohésifs et qui se désagrègent rapidement. La croscarmellose sodique et la crospovidone constitue des exemples de désintégrant retrouvés dans les formulations pour compression (Kaur and Mehara, 2016).

Des agents tensioactifs sont parfois ajoutés pour améliorer les propriétés de dissolution du principe actif (Schott et al., 1982). Ils agissent en surface des particules pour améliorer la mouillabilité ou la cinétique de dissolution. Le laurylsulfate de sodium et le polysorbate 20 sont des exemples d'agents tensioactifs utilisés en industrie pharmaceutique.

Les quatre premières classes définies d'excipients sont utilisés pour l'amélioration du procédé de compression. Les deux derniers sont quant à eux responsables de l'amélioration des propriétés de libération de la substance active (aspects biopharmaceutiques). Ces excipients peuvent être cristallins, semi-cristallins ou même amorphes. Les poudres qui possèdent des particules de très faible taille ont un mauvais écoulement qui entraînera des difficultés dans l'alimentation de la machine à comprimer. Dans ce cas, il est possible de réaliser des opérations intermédiaires (granulation ou atomisation), afin d'augmenter la taille des particules pour s'affranchir des problèmes d'écoulement en compression.

1.3.6 Etudes et paramètres permettant la caractérisation des systèmes granulaires en compression

1.3.6.1 La porosité

La fraction solide (S_f) (ou densité relative) est une variable utilisée dans la représentation de la compressibilité. Elle représente la portion du volume occupée par le matériau solide. Elle peut être calculée à partir de la porosité (ε) d'après l'**équation 14** :

$$S_f = \frac{V_{solide}}{V_{total}} = 1 - \varepsilon = \frac{\rho_{comprimé}}{\rho_{vraie}} \quad \text{Équation 14}$$

Où la masse volumique vraie ρ_{vraie} peut être approchée expérimentalement par la masse volumique pycnométrique d'un échantillon de poudre. Après compression, le comprimé est pesé et son diamètre ainsi que son épaisseur sont mesurés. La masse volumique apparente du comprimé $\rho_{comprimé}$ peut ensuite être calculée à l'aide de l'**équation 15** :

$$\rho_{comprimé} = \frac{m}{v} \quad \text{Équation 15}$$

Où m correspond à la masse du comprimé en g et v à son volume en cm^3 .

La porosité est une variable d'état définie comme étant la proportion du volume (de la poudre ou du comprimé) occupé par l'air. Elle est le complément de la fraction solide et peut être calculée en fonction de la masse volumique apparente du comprimé, $\rho_{\text{comprimé}}$ et de la masse volumique vraie, ρ_{vraie} de la poudre utilisée.

La porosité ε peut être calculée à partir de l'**équation 14** ou de l'**équation 16** en considérant les valeurs calculées et mesurées de $\rho_{\text{comprimé}}$ et de ρ_{vraie} :

$$\varepsilon = \frac{V_{\text{pores}}}{V_{\text{total}}} = 1 - \frac{\rho_{\text{comprimé}}}{\rho_{\text{vraie}}} \quad \text{Équation 16}$$

1.3.6.2 La compressibilité

Le terme « compressibilité » est défini comme étant la capacité d'une poudre à réduire son volume sous l'effet de la pression de compression appliquée (Leuenberger and Rohera, 1986). Durant l'opération de compression, la force appliquée au lit de poudre entraîne une augmentation de sa masse volumique par diminution de son épaisseur jusqu'à atteindre la masse volumique du comprimé final. Au fur et à mesure du rapprochement des poinçons, la poudre subit différents mécanismes de densification qui peuvent être énumérés comme suit (**Figure 28**) :

Étape 1 : Quand la pression appliquée est nulle, la poudre est présente dans la matrice à l'état libre. Les particules ne se sont pas encore réarrangées et la cohésion entre elles est très faible (Leuenberger and Rohera, 1986).

Étape 2 : Quand la pression appliquée commence à augmenter, les grains constitutifs de la poudre commencent à se réarranger les uns par rapport aux autres. La distance entre les particules se réduit sans déformation excessive à ce stade, et les pores les plus gros commencent à se renfermer (Leuenberger and Rohera, 1986).

Étape 3 : Pour les systèmes fortement cohésifs, il est possible d'obtenir un comprimé en comprimant à basse pression. Pour ces systèmes, la compression peut se terminer à l'étape 2 où les particules ne se sont pas encore déformées. Cependant, avec les faibles propriétés de cohésion de la majorité des principes actifs et des excipients, il est généralement difficile de produire un comprimé ayant une résistance mécanique suffisante en s'arrêtant à l'étape 2. Il est donc nécessaire de continuer à comprimer avec des pressions plus élevées jusqu'à ce que les particules subissent des déformations plastiques. Ces déformations réduisent l'espace inter et intra-particulaire, et augmentent considérablement la masse volumique du comprimé (Bolhuis and Lerk, 1977; Shotton, 1972; Van Groenou, 1981). C'est à ce moment que les liaisons inter-particulaires peuvent se former pour obtenir un comprimé avec les propriétés mécaniques souhaitées. Il faut noter que pendant toutes ces étapes de densification, une composante de déformation élastique est présente, plus ou moins marquée en

fonction des propriétés mécaniques du système comprimé et de la pression de compression appliquée.

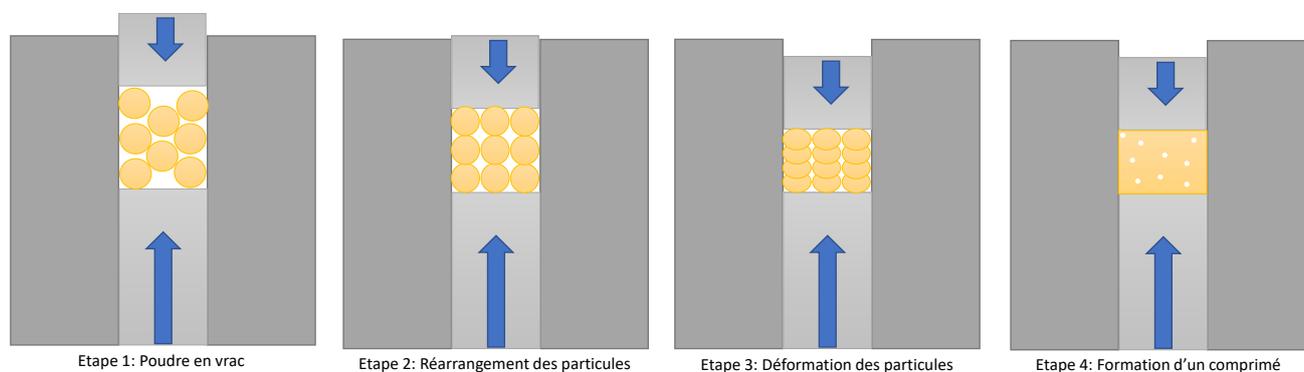


Figure 28 – Représentation schématique de la diminution de la porosité en fonction du rapprochement des poinçons.

Les déformations citées dans l'étape 3 ci-dessus peuvent être définies comme suit :

La déformation élastique est une déformation réversible pour laquelle le matériau reprend ses dimensions initiales après décompression. Une partie de l'énergie élastique peut être dissipée au cours de la compression.

Les déformations plastiques se produisent quand la contrainte appliquée dépasse la limite élastique du matériau. A l'inverse de la déformation élastique, les déformations plastiques sont irréversibles. Ces déformations peuvent correspondre à un comportement ductile (modification des dimensions du matériau en conservant son intégralité) ou bien fragmentaire (modification des dimensions du matériaux en le séparant en plusieurs fragments).

La courbe de compressibilité d'un lit de poudre est la représentation de l'évolution de la fraction solide (ou de la porosité) du matériau en fonction de la pression de compression. La fraction solide (ou la porosité) peut être déterminée à partir de la masse volumique du matériau comprimé qui est mesurable soit dans la matrice (in-die) soit après éjection (out-of-die). L'allure générale de cette courbe est représentée par une augmentation progressive de la fraction de solide en fonction de la pression jusqu'à un plateau aux hautes pressions. La courbe tracée à partir des données « in-die » atteint des plateaux de fraction solide plus élevés que celle qui est tracée à partir des données « out-of-die » du fait de la prise en compte du recouvrement élastique (RE). Différents modèles analytiques de la compressibilité des poudres pharmaceutiques ont été proposés dans la littérature. Ils permettent de comparer les matériaux les uns par rapport aux autres (Heckel, 1961a; Kawakita and Tsutsumi, 1965).

Le profil de compressibilité pour un même excipient peut changer en fonction de sa texture, de sa structure ou bien du procédé par lequel il a été produit. De tels résultats ont été obtenus dans le cadre des travaux de cette thèse et seront particulièrement détaillés dans les **chapitres 3, 4 et 5**.

1.3.6.3 Le recouvrement élastique

Le recouvrement élastique (RE) d'un comprimé peut être évalué par la détermination de la différence entre son volume après éjection (V_{final}) et son volume minimal dans la matrice (V_{min}) au maximum de compression. Ce phénomène concerne les déformations élastiques qui sont réversibles lorsque l'effort de compression s'arrête. Le pourcentage de recouvrement élastique d'un comprimé peut être calculé d'après l'**équation 17** :

$$\%RE = \frac{V_{\text{final}} - V_{\text{min}}}{V_{\text{min}}} \times 100 \quad \text{Équation 17}$$

Le recouvrement élastique est une propriété importante à considérer dans le cadre de la compression des produits pharmaceutiques. En effet, un recouvrement élastique élevé est souvent lié à des phénomènes indésirables comme par exemple le décalottage qui est un terme utilisé pour décrire l'enlèvement partiel ou complet de la couronne supérieure ou inférieure d'un comprimé (Hiestand et al., 1977). En effet, si le recouvrement élastique est plus important que les liaisons inter-particulaires, le phénomène de décalottage se produit (**Figure 29**). Le recouvrement élastique peut également être, pour tout ou partie, responsables des phénomènes de clivage des comprimés pharmaceutiques. Selon le type de poudre utilisé, le recouvrement élastique peut être relativement faible ou peut atteindre des valeurs élevées. Le recouvrement élastique dépend de la pression appliquée à un matériau, de ses propriétés mécaniques, mais peut également différer en fonction de sa structure et de sa texture. C'est un point important qui sera particulièrement étudié dans le cadre des travaux menés au cours de cette thèse.

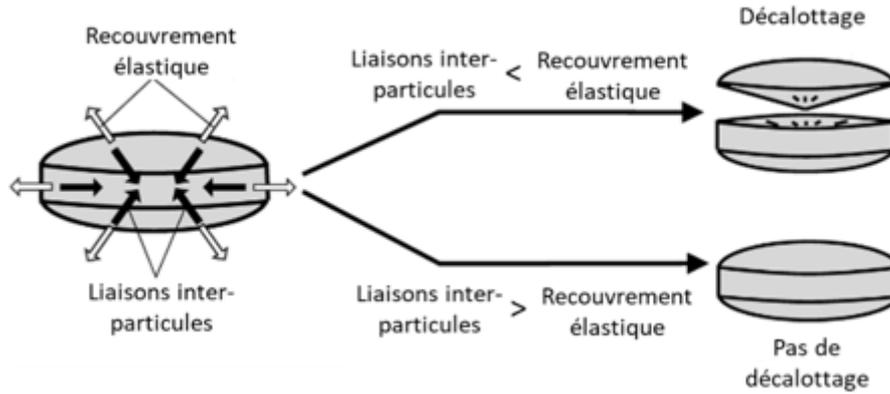


Figure 29 – Schéma du mécanisme de décalottage ; adapté de (Nakamura et al., 2012).

1.3.6.4 Résistance à la traction, compactibilité et tabléabilité

Le mécanisme par lequel les grains de poudre sous pression se lient pour former un comprimé peut être expliqué par la présence de forces d'interactions de différentes natures qui se créent entre les particules qui sont étroitement en contact. Il existe plusieurs mécanismes de liaisons qui jouent un rôle important dans la cohésion d'un comprimé (Turba and Rumpf, 1964; Pietsch, 1967; Rumpf, 1974; Schubert, 1979; Rumpf et al., 1976):

- **Les ponts solides** se forment entre les particules de poudre. Leur cause pourrait être des réactions chimiques, du frittage et/ou des phénomènes de fusion locale.
- **L'attraction entre les particules solides** est due aux faibles distances qui les séparent. Elles sont principalement dues aux forces de Van der Waals (un des plus importants mécanismes dans la compression des poudres pharmaceutiques) ou aux forces électrostatiques ou magnétiques.
- **L'enchevêtrement mécanique** entre les particules se produit sous l'effet des déformations que les particules subissent.

C'est l'ensemble de ces interactions entre les particules à l'échelle microscopique qui engendre une « bonne cohésion » du comprimé à l'échelle macroscopique. Dans le but de quantifier cette cohésion, il est possible de réaliser un test de résistance à la traction. Ce test consiste à appliquer un effort mécanique sur le comprimé par une compression diamétrale (**Figure 30**) pour évaluer à quelle force il se rompt. Ce test devrait idéalement être réalisé sur un échantillon cylindrique de faible épaisseur et la force appliquée doit l'être dans la direction de son diamètre. Sous l'effet d'une telle compression diamétrale, une contrainte de traction se développe au centre du comprimé et provoque sa rupture diamétrale (**Figure 30**).

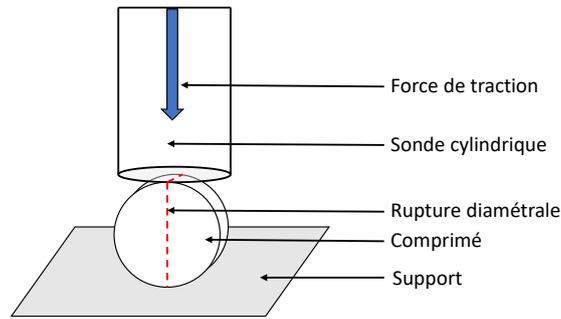


Figure 30 – Schéma de principe de la compression diamétrale.

Pour valider le test, il est nécessaire que le comprimé soit cylindrique, non chanfreiné et plusieurs hypothèses sont à prendre en compte (Fell and Newton, 1970) :

- Le matériau est homogène et a un comportement linéaire élastique jusqu'à sa rupture.
- La rupture est supposée avoir lieu au moment où la contrainte est maximale au centre du comprimé et égale à la résistance à la traction.

A partir de ces hypothèses, il est possible de calculer la résistance à la traction (σ) qui représente la contrainte au centre du comprimé au moment de sa rupture (**équation 18**).

$$\sigma = \frac{2.F}{\pi.D.h} \text{ Équation 18}$$

Où σ est la contrainte de rupture ou résistance mécanique du matériau exprimée en (MPa), F est la force de rupture en (N), D est le diamètre du comprimé en (mm) et h est l'épaisseur du comprimé en (mm).

Il est généralement considéré qu'une contrainte de rupture de l'ordre de 1,5 à 2 MPa est suffisante pour assurer la cohésion du comprimé depuis sa production jusqu'à son administration au patient (Sun et al., 2009).

La force de rupture est une grandeur extensive (qui dépend de la taille du comprimé), alors que la contrainte de rupture est intensive, indépendante des dimensions du comprimé. Pour cela, il est plus judicieux d'utiliser la contrainte de rupture pour pouvoir comparer les comprimés, selon les propriétés des poudres utilisées, de la formulation ou des paramètres du procédé (Adolfsson and Nyström, 1996; He et al., 2007).

Ce test de rupture permet de caractériser les propriétés de cohésion de différentes poudres obtenues par différents procédés au cours de cette thèse et permettra de conclure sur les propriétés mécaniques des comprimés réalisés avec ces dernières.

Grace à l'utilisation de ce test de résistance mécanique, la Pharmacopée Américaine (USP <1062> Tablet compression caractérisation) mentionne qu'il existe plusieurs façons de caractériser les propriétés des comprimés et des relations sont établies entre la fraction solide, la pression de compression et la résistance à la traction en considérant les profils de compactibilité et de tablétabilité.

- **Le profil de compactibilité** est représenté par la courbe de la résistance à la traction en fonction du pourcentage de fraction solide (ou de porosité).
- **Le profil de tablétabilité** est représenté par la courbe de la résistance à la traction en fonction de la pression de compression.

1.3.6.5 Le BFI (*Brittle Fracture Index*)

Le BFI est un paramètre qui est utilisé pour mesurer les comportements mécaniques des comprimés après compression des poudres pharmaceutiques (Eichie and Okor, 2002; Ejiofor et al., 1986; Esezobo and Pilpel, 1987; Hiestand et al., 1977; Onyekweli et al., 2004). Il est en particulier utilisé afin de prédire la tendance qu'un comprimé a à laminer ou décalotter quand il est soumis à un stress diamétral (Eichie et al., 2005; Hiestand et al., 1977; Iwuagwu and Onyekweli, 2003; Mazel and Tchoreloff, 2023). Hiestand et al. ont été parmi les premiers à faire intervenir un certain nombre de concepts issus de la mécanique de la rupture afin d'expliquer la rupture des comprimés pharmaceutiques en partant du principe que les matériaux casseront d'autant plus facilement sous l'effet d'une contrainte concentrée que leur propension à la rupture fragile est importante (Hiestand et al., 1977). La rupture fragile décrit la rupture brutale d'un matériau avec peu ou pas de déformation plastique macroscopique. A l'inverse, la rupture ductile présente une déformation plastique importante en front de fissure, et donc une déformation plastique macroscopique importante avant la rupture. En raison de la formation de la zone plastique, qui absorbe de l'énergie et résiste ainsi à l'avancée de la fissure, la contrainte nécessaire pour créer une fissure dans les matériaux ductiles est inférieure à la contrainte nécessaire pour la propager.

Ainsi, selon Hiestand et al., les matériaux les moins à même de relaxer les contraintes locales devraient rompre plus facilement sous l'effet d'une contrainte concentrée et donc avoir une propension plus grande au clivage. Leur approche est donc basée sur le principe de relaxation des contraintes aux sites de concentration. Afin d'étudier ce principe, ils proposent d'induire une concentration de contraintes au sein du matériau par l'introduction d'un défaut de taille calibrée (un trou calibré percé au centre du comprimé) pour lequel il est possible de calculer le facteur de concentration en contrainte. Il est donc possible de classer les matériaux en fonction de leur propension à relaxer les contraintes sur les sites de concentration de contraintes par la définition d'un

indice de rupture fragile, le BFI (Brittle Fracture Index). Cet indice peut être calculé en utilisant la résistance à la traction de comprimés avec et sans trou.

La capacité d'un matériau à se déformer plastiquement autour de « défauts » est la propriété essentielle estimée en calculant le BFI (Williams and McGinity, 1988). Ce test permet donc de se rendre compte de la « fragilité » d'un comprimé, c'est-à-dire de l'impact qu'un défaut peut avoir sur la propagation des fissures suite au test de traction.

Le BFI est mesuré en comparant la résistance à la traction (σ_T) d'un comprimé percé d'un trou calibré en son centre (considéré comme un défaut majeur dans le matériau) (**Figure 31 A**), à la résistance à la traction (σ) d'un comprimé similaire (obtenu dans les mêmes conditions de pression), mais non troué (**Figure 31 B**). Le comprimé est troué dans le but de créer un défaut qui simule les problèmes qui peuvent surgir lors de la compression. Les défauts dans un comprimé représentent des zones de concentration de contraintes où les fissures se propagent plus facilement quand il est soumis à un stress durant la décompression par exemple (Uhumwangho and Okor, 2004). Ce type de test est favorablement réalisé sur des comprimés présentant un méplat de géométrie bien définie afin de pallier les effets de contact aux points de chargement qui peuvent perturber les conditions de leur rupture (Mazel and Tchoreloff, 2023).

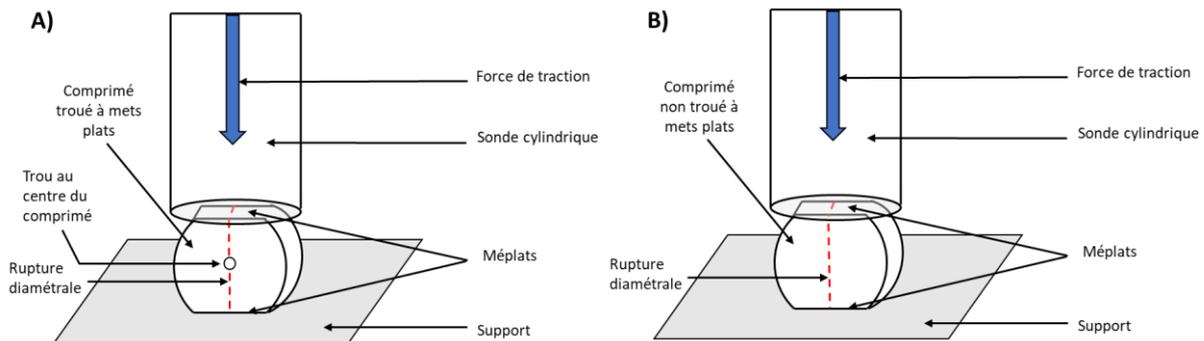


Figure 31 – Schéma représentant le test de BFI ; (A) test de traction sur un comprimé à méplat troué, (B) test de traction sur un comprimé non troué à méplat.

Il est donc possible de classer les matériaux en fonction de leur propension à relaxer les contraintes sur les sites de concentration de contraintes par la définition d'un indice de rupture fragile, le BFI (« Brittle Fracture Index »). Cet indice peut être calculé en utilisant la résistance à la traction de comprimés avec et sans trou en utilisant l'équation 19 :

$$BFI = 0,5 \left(\frac{\sigma}{\sigma_T} - 1 \right) \quad \text{Équation 19}$$

Où σ et σ_T sont respectivement la résistance à la traction du comprimé non troué et troué.

Pour établir cet indice, Hiestand et al partent du principe que le facteur de concentration en contrainte en bord de trou vaut 3, c'est-à-dire que la contrainte maximale en bord de trou est trois fois supérieure à celle dans le comprimé sans trou. Plus récemment, il a été démontré par une approche de simulation numérique et des résultats analytiques que le facteur de concentration en contrainte en bord de trou valait 6 (Croquelois et al., 2017).

Les valeurs de BFI varient entre 0 et 2,5 (Croquelois et al., 2017). Une valeur élevée de BFI implique un caractère fragile du comprimé et donc une forte tendance à la fracture, tandis qu'une faible valeur de BFI (qui tend vers 0) implique un caractère plus ductile. Le BFI a été utilisé au cours de cette thèse afin de pouvoir comparer le comportement à la rupture de comprimés produits à partir d'excipients provenant de procédés différents. Cela sera discuté plus en détail dans la partie « Résultats et discussions » (cf. **Chapitre 2**).

1.3.6.6 La viscoélasticité

La viscoélasticité est une des composantes associées à la sensibilité des matériaux comprimés à la vitesse de déformation. Il est connu par exemple que les produits amorphes possèdent une viscoélasticité plus élevée que celle des composés cristallins (Alcoutlabi and Martinez-Vega, 1999; Deshmukh et al., 2020).

La technique d'excitation impulsionnelle (impulse excitation technique) est utilisée dans différentes industries pour déterminer les propriétés élastiques des matériaux. Cette technique rapide et peu chère, a été utilisée par Mazel et Tchoreloff, qui ont démontré qu'il était possible de détecter au moins trois fréquences de résonances exploitables pour déterminer les constantes d'élasticité des comprimés pharmaceutiques (Mazel and Tchoreloff, 2020). Cette technique d'analyse sera développée dans la partie Matériels et méthodes.

Meynard et al. ont démontré qu'il est possible de caractériser la viscoélasticité d'un comprimé en utilisant la technique d'excitation impulsionnelle, sachant que cette propriété induit un amortissement qui peut être détecté sur le spectre de résonance du comprimé sous forme d'un élargissement du pic de vibration (Meynard et al., 2022a). De plus, il est possible de différencier différents comprimés selon leur viscoélasticité en calculant leurs rapports d'amortissements ζ_i (ou damping ratio) (Meynard et al., 2022a), plus le ζ_i est élevé, plus le matériau est viscoélastique.

Ainsi, la réalisation du test d'impulsion permet de calculer le rapport d'amortissement ζ_i pour un mode 'i' à partir de la courbe de résonance amplitude-fréquence obtenue suivant la méthode de largeur à demi-puissance de la bande de fréquence (Bachmann, 1995). Le rapport d'amortissement est calculé d'après l'**équation 20** :

$$\zeta_i = \frac{\Delta\omega}{2\omega_i} \quad \text{Équation 20}$$

Où $\Delta\omega$ est la largeur de la bande de fréquence liée à l'amplitude à demi-puissance, $\frac{Y_{max}}{\sqrt{2}}$, (Y_{max} étant l'amplitude maximale), et ω_i est la fréquence à l'amplitude maximale. La **Figure 32** illustre, la façon dont il faut procéder pour évaluer le taux d'amortissement à l'aide de la méthode de la largeur de bande à demi-puissance.

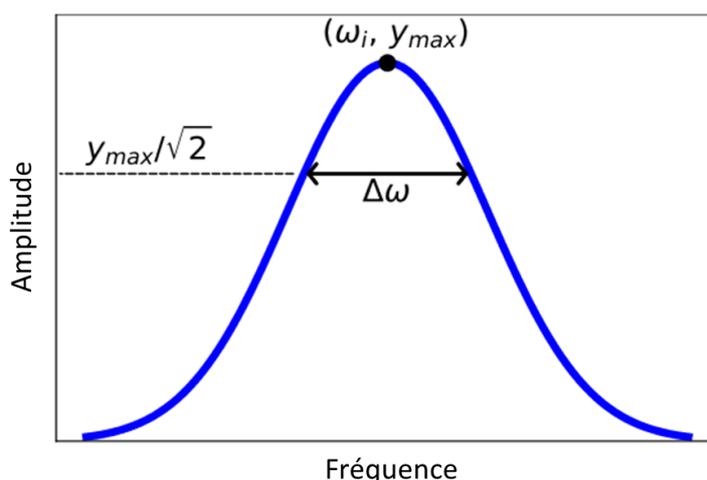


Figure 32 – Schéma d'illustration de la méthode de largeur de bande à demi-puissance adapté de (Meynard et al., 2022a).

1.3.7 Cas des excipients particuliers (le lactose, le mannitol et le saccharose)

Au cours de cette thèse, le travail s'est focalisé sur quatre excipients essentiellement, le tréhalose, le saccharose, le lactose et le mannitol. Les propriétés en compression de ces excipients ont été étudiées sur des poudres commerciales, des poudres commerciales broyées, des poudres obtenues par lyophilisation et des poudres obtenues par atomisation. Dans cette partie, les propriétés en compression de ces excipients cristallins seront discutées plus en détail sauf celui du tréhalose car ses propriétés en compression ne sont pas décrites dans la littérature.

Le lactose :

Les propriétés qui font du lactose un excipient très populaire sont le rapport qualité/prix, sa disponibilité, sa faible hygroscopicité et sa stabilité physique et chimique (Guo, 2004). Parmi les

propriétés en compression du lactose reportées dans la littérature, il est possible de citer les résultats suivants :

- Les profils de compression du lactose dépendent de la vitesse à laquelle la compression est réalisée (Whiteman and Yarwood, 1988).
- Les comprimés contenant du lactose amorphe montrent une augmentation de leur force de rupture avec l'augmentation du pourcentage d'eau dans la poudre (Lerk, 1993).
- Dans le cas des comprimés de lactose, la résistance à la traction augmente quand la taille des particules diminue (Sebhatu and Alderborn, 1999).
- Le lactose cristallin se consolide essentiellement par fragmentation, alors que des déformations plastiques sont prédominantes dans le cas du lactose amorphe.

Comme vu précédemment, il existe plusieurs polymorphes pour le lactose, chacun d'eux a des propriétés différentes, ce qui induit un comportement différent en compression (Paul et al., 2019; Roberts and Rowe, 1985).

Le lactose α monohydrate possède des propriétés de cohésion relativement faibles. Il a été démontré qu'un comprimé de lactose α monohydrate était plus fragile qu'un comprimé de lactose atomisé ou bien de lactose β (Roberts and Rowe, 1985).

Le lactose β anhydre a d'excellentes propriétés en compression et il est peu sensible à la lubrification. De plus, Roberts et Rowe ont montré que les comprimés de lactose β anhydre étaient plus résistants que ceux fabriqués avec le lactose α monohydrate (Roberts and Rowe, 1985). De par sa faible teneur en humidité, le lactose β anhydre est considéré comme un excipient adapté aux substances actives sensibles à l'humidité.

Le lactose commercial atomisé a des tailles de particules importantes et possède de très bonnes propriétés d'écoulement et de cohésion. La poudre est constituée d'un mélange de lactose α monohydrate cristallin et amorphe. La partie amorphe de la poudre lui permet de se déformer plastiquement (Fell and Newton, 1968) et d'avoir de meilleures propriétés de cohésion. Sa compressibilité dépend de la quantité d'humidité résiduelle. Les formulations contenant du lactose atomisé doivent contenir un désintégrant et être lubrifiées (Gohel and Jogani, 2005). Guncel et Lachman ont signalé que le lactose atomisé génère des comprimés résistants, peu friables mais dont la couleur peut évoluer pendant le stockage à hautes températures, à l'inverse du lactose produit conventionnellement (Guncel and Lachman, 1963). L'interprétation de ce phénomène n'a pas été élucidé par les auteurs de cette étude.

Finalement, suivant le grade de lactose utilisé (cristallin ou atomisé), la taille des particules, la forme des particules et la vitesse à laquelle la compression est réalisée, les profils de tablétabilité du lactose peuvent être très différents (Paul et al., 2019).

Le mannitol :

Le mannitol est un produit non hygroscopique, qui possède un goût sucré et qui peut être avantageusement utilisé dans le cas des formulations qui contiennent des substances actives sensibles à l'humidité. Cependant, tout comme le lactose, le mannitol possède plusieurs polymorphes qui ont chacun des propriétés différentes en compression.

Le mannitol δ a été décrit comme ayant de très bonnes propriétés en compression en comparaison avec les polymorphes α et β (Saha and Racine, 2011). Il se déforme plastiquement (Yoshinari, 2003). La compactibilité et la tablétabilité diffèrent selon le polymorphe utilisé (Saha and Racine, 2011):

- Le polymorphe δ possède une meilleure compactibilité et tablétabilité que les polymorphes α et β .
- Les polymorphes α et β montrent des profils de compactibilité et de tablétabilité presque similaires.

Paul et al. ont réalisé une étude comparative des propriétés en compression de différents grades de mannitol et de lactose (cristallin, cristallin granulé et atomisé). Pour tous les grades utilisés, la résistance à la traction était généralement plus élevée à des vitesses de compression faibles (Paul et al., 2019). Une augmentation de la vitesse de compression provoque le laminage pour l'un des grades granulé du mannitol cristallin. Ce même grade se caractérise par une faible tablétabilité (la contrainte de rupture est inférieure à 1 MPa) pour toutes les pressions utilisées (Paul et al., 2019). Le mannitol granulé a une faible tablétabilité qui peut être justifiée par une taille de particules plus grande et donc par le développement d'une plus petite zone de liaison durant la compression (Paul et al., 2019). Les profils de tablétabilité des différents grades de mannitol utilisés par Paul et al. sont représentés dans la **Figure 33**.

Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont mis en évidence une corrélation entre la surface spécifique et la contrainte de rupture à porosité nulle. En effet, la contrainte de rupture à porosité nulle augmente linéairement avec l'augmentation de la surface spécifique pour tous les grades de mannitol et pour la majorité de ceux du lactose (Paul et al., 2019).

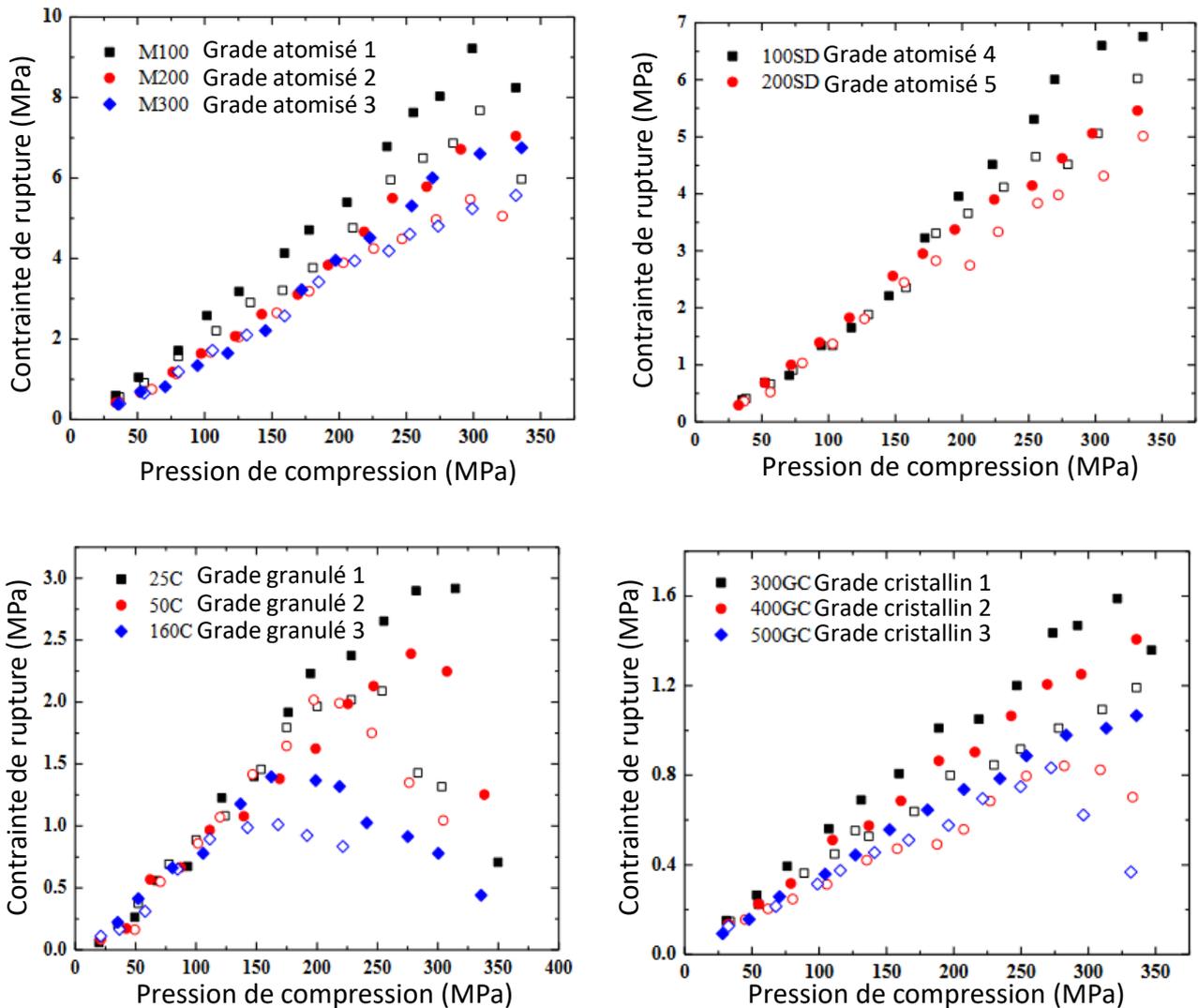


Figure 33 – Profils de tabléabilité de différents grades de mannitol adaptés de (Paul et al., 2019). Les caractéristiques particulières de chacun des grades de mannitol sont présentées dans l'étude (Paul et al., 2018) (Symboles pleins, vitesse de compression lente soit un dwell time de 100 ms ; Symboles ouverts, vitesse de compression rapide soit un dwell time de 10 ms).

Paul et al. ont étudié la compressibilité des différents grades en caractérisant leur plasticité d'après l'analyse de Karl et Leuenberger (Kuentz and Leuenberger, 1999) qui est une analyse plus performante que l'analyse de Heckel (Paul et al., 2019). En effet, l'analyse de Karl et Leuenberger vise à calculer le paramètre de plasticité ($1/C$) qui est obtenu par une régression non linéaire des données de pressions-porosité. Plus le paramètre de plasticité $1/C$ est faible, plus la plasticité est importante, ce qui signifie une meilleure cohésion de la poudre. Paul et al. ont comparé la plasticité des différents grades de mannitol et de lactose. La plasticité des différents systèmes étudiés à une vitesse de compression rapide (soit un dwell time de 10 ms) peut être classée comme suit (Paul et al., 2019) :

- Pour le mannitol, mannitol cristallin traité (c'est une fraction cristalline broyé obtenue à partir du mannose après purification) > mannitol atomisé > mannitol cristallin > mannitol cristallin granulé
- Pour le lactose, lactose α monohydrate cristallin granulé > lactose cristallin α monohydrate \approx lactose atomisé

De plus, le mannitol atomisé présente une plasticité plus élevée que le lactose atomisé. Les particules du mannitol cristallin granulé sont plus larges que celles du lactose cristallin granulé, ce qui amène à une plus grande plasticité de ce dernier. De plus, les grades cristallins de mannitol et de lactose ont des tailles de particules comparables et des plasticités similaires. Ils sont les moins plastiques de tous les grades évalués (Paul et al., 2019).

Le saccharose :

Le saccharose est couramment utilisé comme diluant dans la fabrication des comprimés à croquer ou bien comme liant dans la granulation humide. Le Di-Pac[®] est le produit commercial (Domino, Yonkers, Etats Unis) qui a été comprimé au cours de ces travaux de thèse. Il est formé de 97 % de saccharose et de 3 % de maltodextrine. C'est un excipient qui possède un bon écoulement et qui est utilisable en compression directe. Le Di-Pac est formé de particules de saccharose agglomérées et liées par la maltodextrine. Sa masse volumique apparente à l'état vrac est de 0,66 g/cm³ (Bagster and Crooks, 1977). Quand son humidité résiduelle augmente, il commence à perdre de sa fluidité (Gohel and Jogani, 2005). Pendant le stockage à des humidités allant de 20 à 35 % (Bagster and Crooks, 1977), la coloration des comprimés de Di-Pac est stable. Cependant, l'humidité a un effet négatif sur la compactibilité et les comprimés tendent à durcir s'ils sont stockés à des humidités relatives élevées puis transférés dans un environnement à faible humidité relative (Carlin, 2008).

Une étude a démontré que le Di-Pac avait un comportement intermédiaire entre la déformation plastique et la fragmentation complète, et que le phénomène de fragmentation était prédominant sur la déformation plastique pendant la compression (Zhang et al., 2003). En le comparant dans cette même étude à d'autres excipients tels que la cellulose microcristalline, l'amidon, le lactose cristallin atomisé et le phosphate de calcium, il s'est avéré que le Di-Pac présentait une dureté intermédiaire par rapport à ces derniers pour un même niveau de pression de compression appliqué.

Dans la littérature, les résultats sur les propriétés mécaniques en compression de différents excipients peuvent parfois être contradictoires. Il est donc important de noter que ces résultats sont très dépendants de la texture, de la structure et du grade de l'excipient étudié.

1.3.8 Influence de la compression pharmaceutique sur les propriétés biologiques des molécules thérapeutiques

Un lyophilisat est généralement destiné à être reconstitué pour être injecté par voie parentérale. La production de comprimés à partir des lyophilisats contenant des biomolécules thérapeutiques pourrait être un réel avantage de par sa facilité d'administration et sa stabilité durant le temps pendant le stockage. En effet, le développement galénique de ce type de produit permet d'envisager de nouvelles voies d'administration telles que l'administration par voie buccale, orale ou intra vaginale pour la délivrance des molécules thérapeutiques. Cependant, le procédé de compression vient rajouter un stress supplémentaire sur les biomolécules lyophilisées ou atomisées de par l'application de fortes contraintes mécaniques nécessaires à l'obtention d'une bonne cohésion et de propriétés mécaniques suffisantes. Les molécules thérapeutiques à haut poids moléculaire telles que les protéines sont très fragiles structurellement, de ce fait, leur activité biologique peut être altérée suite à un procédé de séchage et de compression.

Wei et al, ont étudié l'impact de la compression directe sur les propriétés structurales et enzymatiques de deux protéines modèles commerciales lyophilisée, l'albumine de sérum bovine (haut poids moléculaire, 66 kDa) et le lysozyme (faible poids moléculaire, 14,3 kDa) après remplissage manuel dans la matrice de compression (Wei et al., 2019). Suite à la compression à de hautes pressions (200 à 300 MPa), aucune modification au niveau de la structure secondaire des deux protéines n'a été détectée. Le test d'activité enzymatique réalisé sur le lysozyme a montré une conservation de l'intégrité de son activité enzymatique à des pressions allant jusqu'à 300 MPa même quand elle est exposée à des humidités élevées. Cela montre donc la grande stabilité de cette dernière (Wei et al., 2019). En plus il a été démontré qu'en analysant les formulations contenant l'albumine, les résultats de chromatographie d'exclusion stérique montrent qu'il y a agrégation de la protéine à l'état solide, même aux faibles pressions (25 MPa). Des pressions de compression plus élevées sur la BSA ont induit à la formation d'agrégats irréversibles après dissolution. Le degré d'agrégation dépend de la pression et de la taille des grains de poudre lyophilisée. L'agrégation était favorisée quand la taille des grains est inférieure à 250 μm (Wei et al., 2019). En plus il a été démontré que les deux protéines étaient fortement hygroscopiques, avaient une tablétabilité acceptable et que leur mise en forme en compression était dépendante de leur teneur en eau. En effet, ces différences de comportement entre la lysozyme et la BSA suggèrent que la stabilité d'une protéine durant la compression est fortement dépendante de sa stabilité intrinsèque, de sa taille moléculaire et de son degrés d'hydrophobicité (Wei et al., 2019).

Klukkert et al. ont montré que le procédé de compression de biomolécules peut induire une altération de leur structure à l'état solide (Klukkert et al., 2015). L'étude a porté sur la compression d'une formulation lyophilisée contenant la trypsine. L'étude de l'influence de la compression à différentes

pressions (40 à 383 MPa) sur l'activité enzymatique de la trypsine a montré un effet délétère. En effet, à une pression de compression de 40 MPa, la trypsine conserve 100% de son activité enzymatique. Quand elle est comprimée à 120 MPa, 4,5% de perte d'activité enzymatique ont été constatées. Finalement, à partir d'une pression de compression de 190 MPa jusqu'à 383 MPa, la perte d'activité enzymatique de la trypsine s'est élevée jusqu'à 7%. Ces résultats montrent que la perte d'activité enzymatique de la trypsine est pression de compression dépendante. De plus, il a été démontré une corrélation entre les changements conformationnels qui se créent durant la compression et l'activité enzymatique de la trypsine (Klukkert et al., 2015). Les analyses infra-rouges réalisées sur la trypsine brute et la trypsine comprimée, montrent qu'il y a une légère différence entre les deux spectres. Il est donc possible que des changements conformationnels mineurs suite à la compression ont eu lieu et qu'ils sont responsables la chute d'activité enzymatique de la trypsine (Klukkert et al., 2015).

Dans une autre étude, la phosphatase alcaline a été lyophilisée sans ou avec l'ajout de tréhalose ou d'inuline et son activité enzymatique a été déterminée tout de suite après lyophilisation, puis après compression (Eriksson et al., 2002). La proportion de la phosphatase alcaline/sucre dans la formulation était de 1/19. Les résultats montrent que sans l'ajout d'excipient, seulement 5 % de l'activité de la phosphatase alcaline est préservée après lyophilisation et aucune activité n'est observée après compression. En revanche, en ajoutant de l'inuline ou du tréhalose (10% m/v), la phosphatase alcaline conserve toute son activité après lyophilisation et tout de suite après compression (tous les comprimés ont été produits à une pression de 110 MPa) (Eriksson et al., 2002). Par contre, la phosphatase alcaline comprimée en présence de tréhalose a perdu toute son activité enzymatique après huit jours de stockage à 60 °C alors que la poudre lyophilisée non comprimée a conservé 80 % de son activité pendant plus de 100 jours à une température de 60 °C (Eriksson et al., 2002). Par contre, ces mêmes comprimés stockés à 20 °C conservent l'intégralité de l'activité enzymatique pendant plus de 100 jours. Ces résultats montrent que le tréhalose est un bon agent stabilisant quand les comprimés sont stockés dans des conditions douces.

L'étude de l'influence de la compression sur la stabilité des immunoglobulines (membres d'une famille de protéines présentes dans le plasma et ayant des fonctions d'anticorps) a été investiguée par Lu et al. Des lyophilisats qui contiennent un mélange d'anticorps polyclonaux ont été comprimés à des pressions allant de 50 à 350 MPa afin d'étudier l'influence de la compression sur l'intégrité de ces derniers (Lu et al., 2021). L'influence de l'humidité relative pendant le stockage des comprimés a également été étudiée. Les résultats montrent que la compression, même à haute pression n'a pas d'impact sur l'agrégation des anticorps. Par contre, une perte de la structure secondaire a été mise en évidence par dichroïsme circulaire, après re dissolution des comprimés produits à une pression de 300 MPa. Ce phénomène n'a pas été détecté pour des pressions de compression inférieures à 300 MPa (Lu et al., 2021). Finalement, l'analyse de l'activité biologique de ces anticorps par ELISA, a montré que leur capacité à se lier à leur cible antigénique était significativement (entre 7 et 43%)

altérée après compression, et cela sur une gamme de pression allant de 50 à 350 MPa. Il est important de noter que la perte d'activité biologique était pression indépendante, et que les résultats présentés dans cette étude montrent que la perte d'activité biologique peut être plus ou moins importante quand la pression augmente entre 50 et 350 MPa.

Maurer et al. ont travaillé sur le développement d'une nouvelle formulation d'Infliximab (anticorps qui se fixe au facteur de nécrose tumorale α humain) sous forme de comprimés (Maurer et al., 2016). Dans ces travaux, les auteurs ont fabriqué des comprimés à partir d'une poudre sèche d'Infliximab obtenue après séchage par lyophilisation d'une solution d'inuline contenant la spécialité biologique Remicade®. Bien que l'objectif de cette étude n'eût pas pour but d'évaluer l'impact des paramètres de compression sur l'intégrité biologique de l'anticorps, les résultats ont démontré qu'il n'y avait pas d'effet délétère du procédé de compression (conditions opératoires non spécifiées) sur les fonctions biologiques de l'anticorps. Par ailleurs, la compression n'a induit aucune altération dans ses structures secondaires et tertiaires (Maurer et al., 2016).

Toutes les études déjà mentionnées examinent l'influence du procédé de compression sur l'activité biologique et la structure moléculaire des protéines. Toutefois, il est également crucial de considérer l'importance de l'optimisation de la formulation pour augmenter la biodisponibilité, particulièrement lorsqu'une action thérapeutique systémique est recherchée. En effet, les biomolécules rencontrent plusieurs obstacles lors de leur administration par voie orale, tels que leur sensibilité aux pH gastrique et aux enzymes protéases du tractus gastro-intestinal, ainsi que leur faible perméation à travers l'épithélium intestinal en raison de leur haut poids moléculaire. Pour ces raisons, les biomolécules thérapeutiques sont actuellement majoritairement administrées par voie parentérale. Pour pallier ces obstacles, différentes approches ont été et continuent d'être étudiées, telles que l'utilisation des promoteurs d'absorption, d'inhibiteurs enzymatiques, la modification chimique de la molécule, l'utilisation de nanoparticules à surface hydrophobe et la conception de formulations sensibles au pH, ainsi que diverses formes d'administration (gélules, comprimés...) (Haddadzadegan et al., 2022). Suite à ces travaux, le nombre de protéines ou de peptides administrables par voie orale, actuellement en essais cliniques ou déjà approuvés, est en pleine croissance (Haddadzadegan et al., 2022), entraînant une augmentation des recherches et développements dans le domaine de l'administration orale des protéines thérapeutiques.

Par exemple, la plécanatide en comprimé développée par Synergy Pharmaceuticals, la sémaglutide en comprimé développée par Novo Nordisk, et la desmopressine en comprimé développée par Ferring Pharmaceuticals ont déjà été approuvées (Haddadzadegan et al., 2022). En outre, d'autres biomolécules formulées sous forme de comprimés ou de capsules sont actuellement en phase II ou III des essais cliniques (Haddadzadegan et al., 2022).

Dans le cadre de cette thèse, les travaux de recherche se sont concentrés sur la conception et l'optimisation des procédés de séchage et de compression en vue de produire des comprimés contenant des biomolécules. Ces travaux ont été accompagnés par une caractérisation physico-chimique, une étude du comportement en compression, et une analyse de l'activité enzymatique d'une biomolécule modèle après ces procédés afin de garantir le maintien de son activité. Les aspects liés à l'amélioration de la biodisponibilité n'ont pas été abordés à ce stade de l'étude et pourront faire l'objet de recherches futures.

1.4 Conclusion

Dans cette partie, nous avons vu les bases de plusieurs procédés de séchage pharmaceutiques tel que la lyophilisation et le spray-drying ainsi que les bases de la compression pharmaceutique. Nous avons aussi décrit différents excipients pharmaceutiques utilisables durant les procédés de séchage et de compression. Finalement, nous avons évoqué la question du séchage de biomolécules, de leur compression et de l'impact de ces procédés sur leurs propriétés biologiques.

L'étude de la compression et des propriétés mécaniques de poudres issues de la lyophilisation n'a pas fait l'objet d'études exhaustives dans la littérature. De plus, la compression de lyophilisats contenant des biomolécules a fait l'objet de peu d'études. En effet, le développement d'un procédé combinant lyophilisation et compression de biomolécules en présence de différents excipients pourrait être une solution très avantageuse économiquement qui permettrait de stocker les comprimés à température ambiante afin de s'affranchir du stockage aux très faibles températures.

Le but de notre étude sera donc dans un premier temps d'étudier les propriétés mécaniques et physico-chimiques après la lyophilisation et la compression du tréhalose, un excipient couramment utilisé comme lyo et cryoprotectant de biomolécule en lyophilisation en les comparant avec les propriétés d'autres excipients couramment utilisés en compression pharmaceutique. Par la suite, cette étude sera plus approfondie en comparant ces propriétés avec celles d'autres excipients (lactose et mannitol) lyophilisés, atomisés, broyés ou cristallins afin de comprendre les paramètres essentiels qui influencent ce comportement. Dans la troisième partie, les paramètres de la formulation seront modulés afin de visualiser l'effet sur l'écoulement de la poudre pour anticiper les aspects d'alimentation machine lors d'une production à grande échelle. Finalement, l'ajout d'une protéine modèle (la lactate déshydrogénase) dans la formulation, permettra d'évaluer l'impact des procédés de lyophilisation et de compression sur l'activité enzymatique de cette dernière immédiatement après la mise en œuvre de ces procédés puis au cours d'une étude préliminaire de stabilité dans différentes conditions de températures.

Chapitre 2. Matériels et méthodes

SOMMAIRE

2.1 Matériels	99
2.2 Méthodes	100
2.2.1 Les procédés pharmaceutiques.....	100
2.2.1.1 La lyophilisation	100
2.2.1.2 L'atomisation (spray-drying)	103
2.2.1.3 Le broyage.....	104
2.2.1.4 La compression pharmaceutique (presse à comprimer)	105
2.2.2 Les caractérisations physico-chimiques des poudres	106
2.2.2.1 Mesure de la masse volumique des poudres par pycnométrie à hélium.....	106
2.2.2.2 Evaluation des distributions granulométriques par diffraction laser	106
2.2.2.3 Mesure de la surface spécifique par la méthode BET (Brunauer, Emmett et Teller)	107
2.2.2.4 Analyse de l'humidité par titration de Karl Fischer	107
2.2.2.5 Analyse de la température de transition vitreuse T_g par calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	107
2.2.2.6 Etude de la structure par diffraction des rayons X (DRX)	108
2.2.2.7 Visualisation de la morphologie par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	108
2.2.3 Les caractérisations mécaniques des comprimés.....	108
2.2.3.1 Porosité et recouvrement élastique	108
2.2.3.2 Paramètre de Heckel	109
2.2.3.3 Etude des propriétés mécaniques des comprimés	109
2.2.3.4 Mesure de la viscoélasticité	110
2.2.4 Evaluation de l'activité enzymatique de la LDH	110
2.2.5 Etude de la stabilité de la LDH dans les différentes formes galéniques	111

2.1 Matériels

Les excipients : Différents excipients de lyophilisation tels que des cryo et lyoprotecteurs (tréhalose, saccharose et lactose) et un agent de masse (mannitol) ont été utilisés en plus d'autres excipients de compression directe comme le phosphate de calcium anhydre, le lactose granulé anhydre et la cellulose microcristalline. Le stéarate de magnésium a été utilisé comme lubrifiant. Les références de ces différents excipients sont données dans le **Tableau 6**:

Tableau 6 – Excipients utilisés dans les procédés de lyophilisation et de compression.

Nom de l'excipient	Nom commercial	Fournisseur	Pays
Tréhalose di-hydrate	Biohale®	DFE Pharma	Coch, Allemagne
Tréhalose di-hydrate	-	Nagaze	Kyoto, Japon
Saccharose	Di-Pac®	Domino	Yonkers, Etats-Unis
Phosphate de calcium anhydre (ACP)	Anhydrous Encompress®	JRS Pharma	Rosenberg, Allemagne
Lactose granulé monohydrate (GLac)	Tablettose® 80	Meggle	Wasserburg, Allemagne
Cellulose microcristalline (MCC)	Vivapur® 12	JRS Pharma	Rosenberg, Allemagne
Lactose	Supertab® 30 Gr	BFE Pharma	Coch, Allemagne
Mannitol	-	Cooper	Melun, France
Stéarate de Magnésium	Ligamed® MR-2-V	Peter Greven	Bad Münstereifel, Nordrhein-Westfalen, Allemagne

Protéine modèle et kit de dosage : La lactate déshydrogénase (LDH) (Lactate dehydrogenase, Porcine Heart, EMD millipore corporation, Temecula, Californie, Etats-Unis) a été utilisée comme protéine modèle. Le dosage de la LDH a été réalisé à l'aide du kit de dosage CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega corporation, Madison, WI, Etats-Unis).

2.2 Méthodes

2.2.1 Les procédés pharmaceutiques

2.2.1.1 La lyophilisation

La lyophilisation a été réalisée en utilisant un lyophilisateur pilote Compact (Cryotec®, Montpellier, France) (**Figure 34**). Ce lyophilisateur est doté de 6 étagères d'une surface de 0,1 m² chacune et d'un piège d'une capacité de 15 Kg à -85 °C. Chaque étagère est réglée en température (de -60 °C à +60 °C) au moyen d'un fluide caloporteur. Les étagères sont mobiles pour permettre la fermeture des flacons sous-vide à la fin de la lyophilisation grâce à l'action d'un vérin hydraulique. Le lyophilisateur est également équipé d'un dispositif de régulation de la pression de sublimation et de 6 sondes produits qui permettent de suivre l'évolution de la température des échantillons pendant tout le cycle de lyophilisation. La mesure de pression est assurée par une sonde **Pirani** couplée à une sonde **Capacitive** pour une plus grande précision sur la plage de pression de 0 à 1,33 mbar. La sonde Pirani est un capteur de pression dont le principe repose sur la modification de la conductivité thermique d'un gaz en fonction de la pression. La pression apparente mesurée par la sonde dépend donc de la composition de gaz et diminue avec la vapeur d'eau présente dans la chambre. La sonde capacitive, au contraire, indique la valeur de vide « absolu » et n'est pas affectée par la vapeur d'eau présente dans le système. A la fin de la sublimation, le transfert de gaz diminue progressivement, ce qui diminue la valeur de la pression indiquée par la sonde Pirani, qui converge vers la valeur indiquée par la sonde capacitive. Cette convergence des valeurs des deux sondes de pression indique la fin de la sublimation primaire. Le lyophilisateur est piloté par un logiciel développé par CRYOTEC qui permet le monitoring du procédé pendant le cycle de lyophilisation. Il est ainsi possible de définir les températures d'étagères, leurs vitesses de refroidissement et de chauffe, la pression et la durée de chacune des étapes du cycle de lyophilisation. Le logiciel permet également le suivi en direct du procédé grâce à une visualisation en temps réel de l'évolution des températures des produits, des étagères, du piège et de la pression de la chambre de séchage.

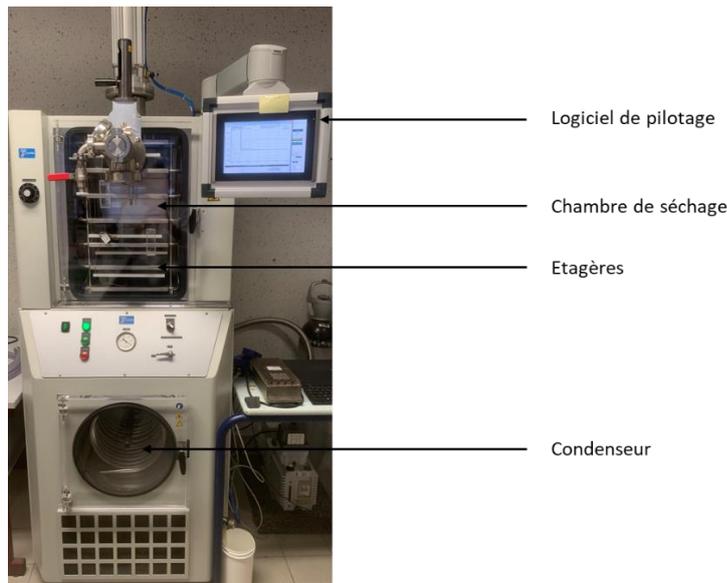


Figure 34 – Photographie annotée du lyophilisateur pilote Cryotec.

Deux cycles de lyophilisation ont été utilisés dans ce travail, un cycle appelé cycle 'conservateur' pour lequel la température des étagères au cours de la dessiccation primaire a été maintenue à -20 °C et un cycle appelé cycle « agressif » correspondant à une température des étagères de +25 °C pendant l'étape de dessiccation primaire. Ces deux types de cycles ont fait l'objet d'un développement préalable au sein du laboratoire.

Cycle « conservateur » :

Congélation : les échantillons sont chargés dans la chambre à température ambiante puis les étagères sont refroidies à une température de 5 °C à une vitesse de -1 °C/min. La température est ensuite maintenue à 5 °C pendant 30 minutes. Les étagères sont par la suite refroidies jusqu'à -5 °C avec la même vitesse de congélation et maintenues à -5 °C pendant 30 minutes. Pour finir, une dernière rampe de refroidissement à -1 °C/min permet d'atteindre une température d'étagère de -50 °C. Cette consigne est maintenue pour une durée de 2 heures afin de s'assurer que tous les échantillons sur le plateau aient bien atteints une température inférieure à -45 °C.

Dessiccation primaire : pendant cette étape la température des étagères est augmentée jusqu'à -20 °C (à +1 °C/min) et la pression de la chambre est fixée à 0,1 mbar. Cette température est maintenue jusqu'à ce que les valeurs de pressions des sondes Pirani et Capacitive se rejoignent, ce qui marque la fin de la dessiccation primaire.

Dessiccation secondaire : à la fin de la dessiccation primaire, la température des étagères est augmentée jusqu'à +25 °C à une vitesse de +0,1 °C/min et est maintenue pendant une durée de 12 heures avec une pression de chambre de 0,06 mbar.

A la fin du cycle, les flacons contenant la poudre lyophilisée sont bouchés dans le lyophilisateur sous vide avant le déchargement.

Cycle « agressif » :

Congélation : les étagères, après chargement, sont refroidies avec une rampe de -1 °C/min de 25 °C jusqu'à -50 °C en une seule étape. La température des étagères est ensuite maintenue à -50 °C pendant 1 heure 30 minutes.

Dessiccation primaire : à la fin de la congélation, la température des étagères est augmentée jusqu'à 25 °C (à $+1\text{ °C/min}$) et la pression de la chambre est diminuée jusqu'à $0,1\text{ mbar}$. La fin de cette étape est aussi déterminée par la convergence des valeurs de pressions des sondes Pirani et Capacitive.

Dessiccation secondaire : la température des étagères et la pression sont maintenues respectivement à 25 °C et $0,1\text{ mbar}$ pendant 3 à 4 heures. A la fin du cycle, les échantillons sont bouchés sous vide avant le déchargement.

Il est important de noter que la durée des cycles est très variable selon le cycle utilisé, la quantité d'échantillons chargés et le volume de remplissage des flacons. Dans le cas de deux expériences similaires en terme du nombre d'échantillons et de volume de remplissage des flacons, le cycle « agressif » est beaucoup plus rapide que le cycle « conservateur ».

Les enregistrements en fonction du temps de la variation des températures d'étagère, de produit et de pression dans la chambre pour les cycles « conservateur » et « agressif » sont donnés sur la

Figure 35.

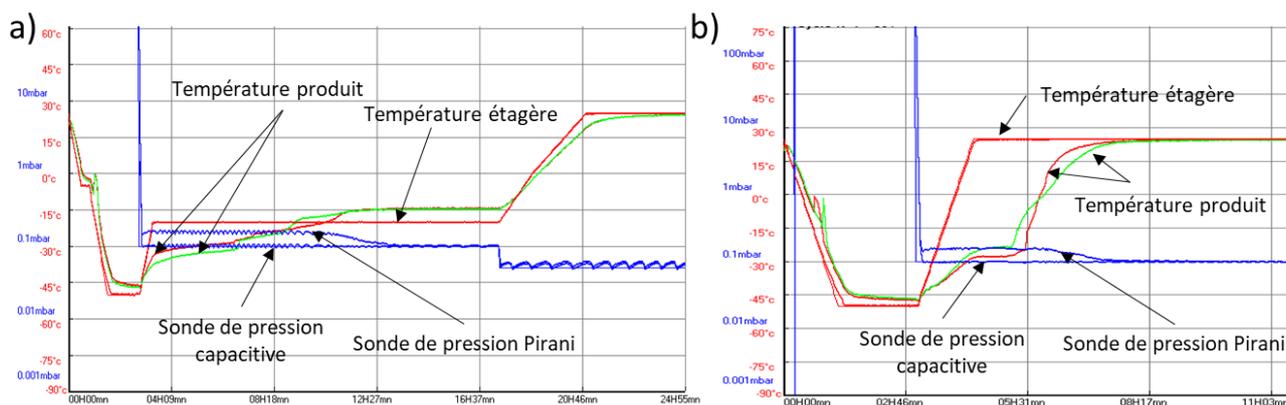


Figure 35 – Enregistrements des cycles de lyophilisation « conservateur » (a) et « agressif » (b).

2.2.1.2 L'atomisation (spray-drying)

Des solutions aqueuses de tréhalose, lactose et mannitol (10% m/v) ont été pulvérisées à l'aide d'un atomiseur de laboratoire (Büchi Mini Spray Dryer B-191, Buchegg, Switzerland) (**Figure 36**). L'objectif final de nos travaux étant de pouvoir sécher des formulations contenant des biomolécules tout en préservant leur activité, le choix des paramètres d'atomisation a été orienté par les travaux d'Adler et Lee (Adler and Lee, 1999) où des solutions de tréhalose contenant de la LDH ont été atomisées. Ces paramètres, et plus précisément la valeur de la température d'entrée ont été choisis car selon l'étude de Adler et Lee, ce sont ceux qui permettaient la meilleure conservation de l'activité enzymatique de la LDH (Adler and Lee, 1999). Ces paramètres sont présentés dans le **Tableau 7** :

Tableau 7 – Paramètres utilisés lors du procédé de spray-drying.

Paramètres	Valeurs
Débit d'alimentation en solution	8,2 ml/min
Débit d'air d'atomisation	0,7 m ³ /h
Aspiration sous vide	40 mbar
Température d'entrée (T _{entrée})	110 °C
Température de sortie (T _{sortie})	60 °C

Durant le procédé, la température de sortie ne pouvait pas être contrôlée mais seulement mesurée. Pour les trois excipients atomisés à une T_{entrée} de 110 °C, la T_{sortie} se situait toujours autour de 60 °C. Le rendement de matière sèche obtenue est montré dépendant de l'excipient utilisé (la poudre restante sur les parois du cyclone n'a pas été comptabilisée dans le calcul du rendement), et s'élevait à 50% pour le tréhalose et le lactose et à 85% pour le mannitol.

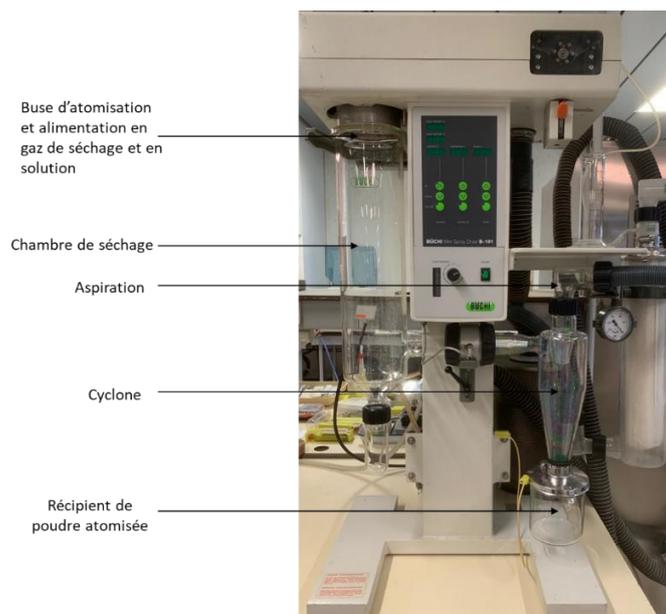


Figure 36 – Photographie annotée du Büchi Mini spray dryer B-191.

2.2.1.3 Le broyage

Le tréhalose, le lactose et le mannitol cristallins ont été broyés à sec en utilisant un broyeur à vibration (Restsch vibration mill MM 2000, Düsseldorf, Allemagne) (**Figure 37**). 6 grammes de poudre commerciale native (poudres cristallines dans tous les cas) ont été introduits dans un cylindre en acier (volume 25 ml) muni d'une bille en acier de 20 mm de diamètre. Le temps de broyage a été fixé à 8 minutes et la fréquence de vibration à 26,6 Hz (1600 RPM). Dans la suite de ce manuscrit, ces poudres seront dénommées « poudres cristallines broyées ».

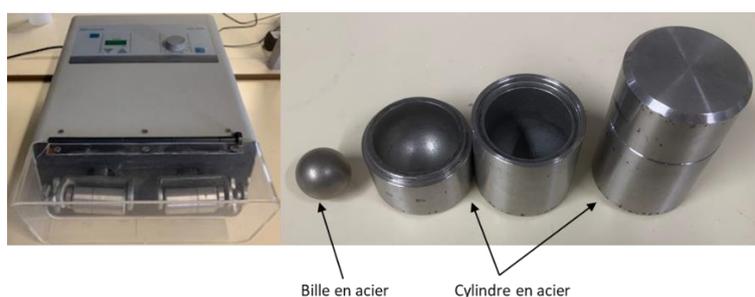


Figure 37 – Photographie annotée du broyeur à bille Restsch vibration mill MM 2000, du cylindre et de la bille de broyage.

2.2.1.4 La compression pharmaceutique (presse à comprimer)

Tous les comprimés réalisés au cours de cette étude ont été fabriqués sur une machine à comprimer mono-station de type Styl'One Evolution (Medelpharm, Beynost, France) (**Figure 38**). La Styl'One est une machine à comprimer utilisée en recherche et développement qui permet d'acquérir du signal pendant le cycle de compression et de reproduire les cycles de compression des machines industrielles. Le logiciel « Analis » est utilisé pour piloter cette machine.

Elle est équipée de capteurs de force (jauges de contraintes, précision 10N) et de déplacement (capteurs incrémentaux, précision de l'ordre du μm) associés aux poinçons inférieur et supérieur. Le pilotage de la machine peut se faire de différentes façons, soit en contrôlant le déplacement des poinçons au cours du cycle, soit en contrôlant les niveaux de forces appliquées. L'instrumentation de la machine permet de recueillir un grand nombre de données à l'aide du logiciel « Analis », telles que les forces appliquées, les déplacements des poinçons, la distance entre les poinçons (c'est-à-dire l'épaisseur du comprimé en fin de compression), la force d'éjection et la vitesse du cycle de compression. L'alimentation de la matrice peut se faire manuellement (cette option est particulièrement adaptée dans le cas de faibles quantités de poudre) ou par l'intermédiaire d'un sabot d'alimentation. Un système de lubrification externe permet la lubrification des poinçons et de la matrice avant le remplissage de la matrice (**Figure 38**). Ce système de lubrification externe peut être utilisé indépendamment du sabot d'alimentation, ce qui permet de réaliser une lubrification externe dans le cas d'un remplissage manuel.

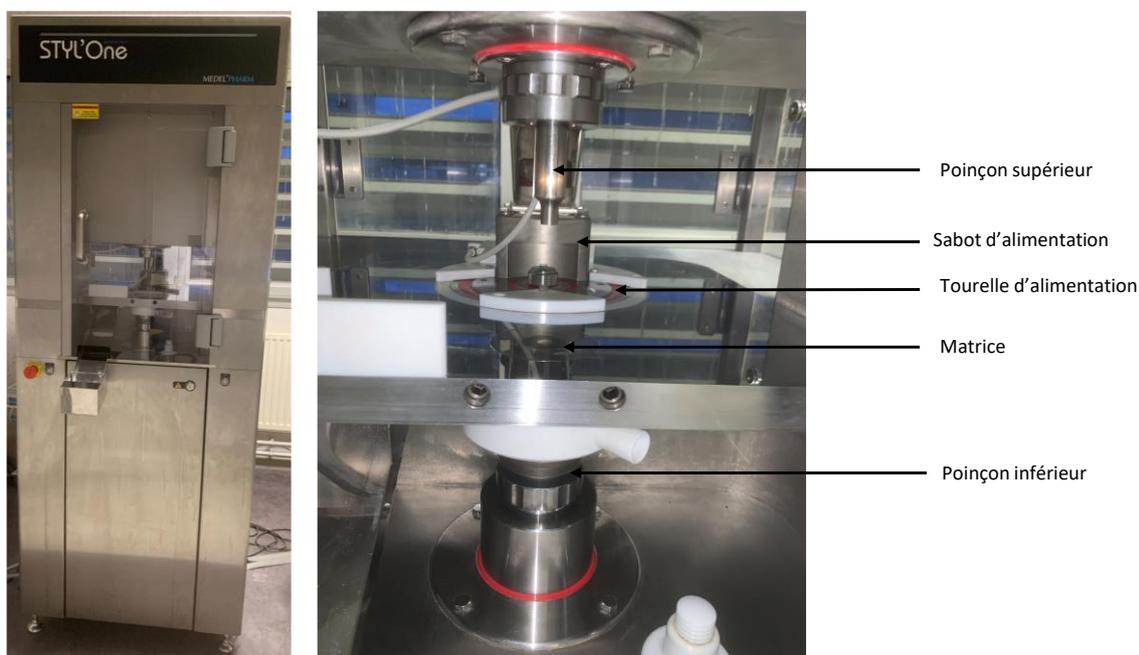
Dans le cadre de ce travail, l'humidité relative et la température dans la salle de compression sont maintenues respectivement entre 30 et 40% HR et entre 23 et 25 °C.

Afin d'alimenter la machine, les lyophilisats sont rapidement broyés manuellement juste avant l'étape de compression dans un mortier en porcelaine. Les poudres atomisées, cristallines et cristallines broyées sont mise en œuvre sans préparation préalable. Toutes les poudres (lyophilisées, atomisées, cristallines et cristallines broyées) sont introduites manuellement dans la matrice de compression.

La vitesse de compression a été fixée par défaut à la vitesse minimale de la machine, ce qui correspond à un temps total de cycle de 2 secondes. Le système de lubrification externe a été utilisé pour la lubrification externe des poinçons et de la matrice par du stéarate de magnésium.

Plusieurs types de poinçons ont été utilisés selon les expériences à réaliser (euro B 6 mm ronds plats, 10 mm ronds plats et 11 mm à méplats). Les poinçons de 6 mm ont été utilisés uniquement pour la compression des poudres contenant la LDH. Les poinçons de 11 mm à méplats ont été utilisés pour la détermination du BFI (brittle fracture index), et les poinçons de 10 mm ronds plats ont été utilisés pour toutes les autres caractérisations. Les pressions utilisées pour les expériences réalisées se situaient entre 12,5 MPa et 250 MPa (normalisation des forces en fonction des types de poinçons utilisés (surfaces variables) pour obtenir le niveau de pression désiré). La pression minimale utilisée

a été variable en fonction des échantillons. Elle a été définie comme la pression la plus faible permettant l'obtention d'un comprimé présentant une cohésion suffisante pour être manipulé. Les comprimés obtenus ont été caractérisés directement ou stockés dans des flacons fermés dans une enceinte à humidité faible et contrôlée (7-10% HR) pour une caractérisation ultérieure.



2.2.2 Les caractérisations physico-chimiques des poudres

2.2.2.1 Mesure de la masse volumique des poudres par pycnométrie à hélium

La masse volumique pycnométrique (ρ_{pycno}) de toutes les poudres a été mesurée en triplicat en utilisant un pycnomètre à hélium (AccuPyc II 1340, Micromeritics, Norcross, GA, Etats-Unis). Une cellule de 1 cm^3 a été utilisée pour toutes les mesures et pour chaque échantillon, 10 purges suivis de 10 mesures ont été réalisées.

2.2.2.2 Evaluation des distributions granulométriques par diffraction laser

Les distributions granulométriques des poudres atomisées, cristallines et cristallines broyées ont été obtenues au moyen d'un granulomètre à diffraction laser (Mastersizer 3000, Malvern Panalytical, Royaume unis). La pression d'air injecté a été ajustée entre 2 et 3 bars selon la poudre à analyser.

2.2.2.3 *Mesure de la surface spécifique par la méthode BET (Brunauer, Emmett et Teller)*

La surface spécifique des différentes poudres étudiées a été obtenue par la technique d'adsorption gazeuse à l'aide d'un analyseur de surface et de porosité (ASAP 2020, Micromeritics, Norcross, Etats-Unis). Le gaz de mesure étant l'azote, la masse d'échantillon nécessaire à la mesure était variable selon la nature des échantillons et a été ajustée pour avoir une surface totale développée dans la cellule de mesure égale ou supérieure à 1 m². Pour les lyophilisats, plusieurs flacons ont donc dû être combinés (6 à 8 flacons par essai). Tous les échantillons ont été rapidement introduits dans la cellule de mesure dans une salle à faible humidité relative (30% HR) puis dégazés à 60 °C sous une pression de 10⁻³ mm Hg. Les mesures ont été réalisées en triplicat à la température de l'azote liquide (-196 °C). La quantité de gaz adsorbée est mesurée pour des valeurs de pressions relatives d'azote (P/P₀) de 0,05 à 0,2 (5 valeurs de P/P₀). Pour toutes les mesures, R² a été contrôlé de sorte à ce que l'ajustement linéaire du modèle BET soit toujours supérieur à 0,999. La surface spécifique est calculée par la suite à l'aide de l'équation de BET.

2.2.2.4 *Analyse de l'humidité par titration de Karl Fischer*

Le pourcentage d'humidité résiduelle des échantillons a été évalué en utilisant la méthode de titration Karl Fischer par un titreux compact 20S (Mettler Toledo, Greifensee, Suisse). Le méthanol anhydre (extra dry methanol, 99%, Acroseal®) a été utilisé pour dissoudre les échantillons (poudre ou comprimés) avant l'ajout de la solution dans le milieu réactionnel de Karl Fischer (CombiCoulomat fritless, Merck, Allemagne). Avant l'analyse, une mesure de blanc sur 1 ml de méthanol a été réalisée.

Les lyophilisats ont été directement solubilisés dans 6 ml de méthanol dans les flacons bouchés sous vide. 1 ml de la solution obtenue a été prélevé puis ajouté dans la cuve de réaction. La masse d'eau contenue dans le blanc est retranchée à la valeur de la solution testée puis multipliée par 6 pour obtenir la masse d'eau contenue dans le lyophilisat.

Concernant les poudres issues du spray-drying, des échantillons de 10-20 mg ont été pesés, et directement ajoutés dans la cuve de réaction. La mesure est réalisée après dissolution complète de l'échantillon dans la cuve.

La masse d'eau de l'échantillon est ensuite normalisée par la masse de l'échantillon et exprimée en % m/m. Chaque expérience a été réalisée en triplicat.

2.2.2.5 *Analyse de la température de transition vitreuse T_g par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)*

Des mesures en DSC ont été réalisées sur toutes les poudres (lyophilisées, atomisées, cristallines et cristallines broyées) et sur les comprimés en utilisant une DSC3 (Mettler Toledo, Suisse) équipée

d'un système de refroidissement (RCS). Environ 10 mg de poudre, exactement mesurés, ont été introduits dans une capsule en aluminium de 100 μ L. La capsule a ensuite été scellée hermétiquement dans une enceinte à humidité contrôlée (humidité relative 7-10%, température 25 °C). Les échantillons ont par la suite été chauffés de 10 °C à 230 °C à une vitesse de chauffe de 10 °C/min. La capsule de référence utilisée durant toutes les mesures était une cuve en aluminium vide, identique à celle contenant l'échantillon.

2.2.2.6 Etude de la structure par diffraction des rayons X (DRX)

Les diffractogrammes de tous les échantillons ont été obtenus sur un diffractomètre à rayons X (MiniFlex2, Rigaku, Japon) avec des radiations Cu K α (30kV, 15 mA). Chaque analyse a été réalisée entre $2\theta = 0^\circ$ et 60° avec un pas de $0,1^\circ$ et une vitesse de $5^\circ/\text{minute}$.

2.2.2.7 Visualisation de la morphologie par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La morphologie de toutes les poudres (lyophilisées, atomisées, cristallines et cristallins broyées) et des comprimés à faibles et hautes pressions a été visualisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Hitachi TM3000, Japon). Une lame de scalpel a été utilisée pour couper de fines tranches à partir des lyophilisats. Les lyophilisats coupés, les comprimés intacts, les comprimés cassés diamétralement et toutes les autres poudres ont été fixés sur le support en aluminium avec des rubans adhésifs double face en carbone afin de visualiser leurs morphologies.

2.2.3 Les caractérisations mécaniques des comprimés

2.2.3.1 Porosité et recouvrement élastique

Les porosités « in-die » (dans la matrice) et « out-of die » (en dehors de la matrice) ont été calculées d'après l'**équation 21** :

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{\text{apparent}}}{\rho_{\text{pycno}}} \quad \text{Équation 21}$$

Où ρ_{apparent} est la masse volumique apparente du comprimé calculé en utilisant le volume du comprimé sous pression « in-die » ou à l'éjection « out-of-die » et ρ_{pycno} est la masse volumique mesurée par pycnométrie à hélium.

Pour la porosité « in-die », ρ_{apparent} est calculée en utilisant V_{min} , le volume minimal au pic de compression. Concernant la porosité « out-of die », ρ_{apparent} est calculée en utilisant V_f , le volume final

du comprimé obtenu par la mesure du diamètre et de l'épaisseur immédiatement à la sortie de la matrice.

Le recouvrement élastique est calculé d'après l'**équation 22** avec V_{min} le volume du comprimé au pic de compression et V_{final} le volume du comprimé immédiatement à la sortie de la matrice ou 24 heures après compression.

$$\% E_r = \frac{V_{final} - V_{min}}{V_{min}} \times 100 \quad \text{Équation 22}$$

2.2.3.2 Paramètre de Heckel

Les données de porosité « in-die » ont été utilisées pour ajuster le modèle de Heckel qui relie le logarithme de l'inverse de la porosité « in-die » en fonction de la pression de compression ($\ln \left(\frac{1}{\varepsilon} \right) = Kp + A$ où Kp est la pente de la section linéaire de la courbe et A est l'ordonnée à l'origine) (Heckel, 1961b; Hersey and Rees, 1970).

A partir du tracé graphique du modèle, les bornes de pression du domaine linéaire ont été définies de telle sorte que le coefficient de régression linéaire R^2 soit toujours supérieur à 0,99. L'inverse de la pente de la partie linéaire a été utilisé pour déterminer le P_y (MPa) défini par Heckel comme une caractéristique du mode de déformation des poudres sous l'effet de la pression de compression. Par la suite les valeurs de P_y obtenues pour chaque poudre testée sous deux vitesses différentes de compression ont été utilisées pour calculer le SRS (Strain-Rate Sensitivity ou sensibilité à la vitesse de déformation) qui caractérise l'influence de la vitesse de compression sur la déformation de la poudre (Roberts and Rowe, 1985). Le SRS est donné par l'**équation 23** :

$$SRS = \frac{P_{y2} - P_{y1}}{P_{y2}} \times 100 \quad \text{Équation 23}$$

Où P_{y1} et P_{y2} sont respectivement les paramètres de Heckel des cycles de compression réalisés à la plus faible vitesse de compression (temps de cycle = 2000 ms) et à la vitesse de compression maximale (temps de cycle = 70 ms).

2.2.3.3 Etude des propriétés mécaniques des comprimés

- Afin d'accéder aux profils de tablétabilité des matériaux étudiés, qui représentent l'évolution de la cohésion des comprimés en fonction de la pression axiale de compression appliquée, des tests de

rupture diamétrale ont été réalisés sur des comprimés de 10 mm de diamètre au moyen d'un analyseur de texture équipé d'un détecteur de force de $500 \text{ N} \pm 0,1$ (TA. HD, Stable Micro Systems, Surrey, Royaume-Uni). La vitesse et la fréquence d'acquisition étaient respectivement de $0,1 \text{ mm.s}^{-1}$ et 500 Hz. Chaque mesure a été effectuée en triplicat. La force de rupture F (N) mesurée permet de calculer la contrainte de rupture à l'aide de l'**équation 18** (cf. paragraphe **1.3.6.4**).

- Le BFI (Brittle Fracture Index) est utilisé pour évaluer la sensibilité aux concentrations de stress ainsi que la fragilité des comprimés (Hiestand et al., 1977; Mazel and Tchoreloff, 2023). Sa détermination requiert deux types de comprimés, avec et sans trou centré. Les comprimés testés ont été produits à l'aide des poinçons à méplats de 11 mm de diamètre puis ont été perforés pour former des trous de 1 mm de diamètre tel que décrit par Croquelois et al (Croquelois et al., 2017). Un test de rupture diamétrale a ensuite été réalisé sur les différents types d'échantillons. Chaque essai a été reproduit trois fois. Le BFI a par la suite été calculé en utilisant l'**équation 19** (cf. paragraphe **1.3.6.5**).

2.2.3.4 *Mesure de la viscoélasticité*

Afin de caractériser la viscoélasticité des comprimés, la technique d'excitation impulsionnelle a été utilisée en suivant la méthodologie présentée par Mazel et Tchoreloff (Mazel and Tchoreloff, 2020). L'excitation impulsionnelle a été obtenue en laissant chuter les comprimés d'une hauteur normalisée de 1 cm sur une surface dure. Les fréquences de vibration induites par l'impact sur la surface ont été enregistrées par un microphone MM310 (Microtech Gefell GmbH, Gefell, Allemagne) couplé à un système d'acquisition de données DEWE-43 (Dewsoft, Trbovlje, Slovénie). L'interprétation de ces données brutes a été réalisée selon la méthodologie développée par Mazel and Tchoreloff (Mazel and Tchoreloff, 2020) et explicitée au paragraphe **1.3.6.6**. Pour chaque condition, la mesure a été répétée trois fois. Au moins deux fréquences naturelles de vibrations ont pu être caractérisées pour calculer le rapport d'amortissement (damping ratio ζ_A) qui permet de caractériser la viscoélasticité.

2.2.4 **Evaluation de l'activité enzymatique de la LDH**

La lactate déshydrogénase est fournie sous la forme d'une poudre lyophilisée contenant 35% m/m de LDH. D'après le fournisseur, l'activité enzymatique de 1 mg de lyophilisat est de 240 U/mg de lyophilisat et l'activité enzymatique de 1 mg de LDH pure est de 685 U/mg de protéine (Lactate dehydrogenase, Porcine Heart, EMD millipore corporation, Temecula, Californie, Etats-Unis).

Afin d'évaluer l'effet de la lyophilisation et de la compression sur l'activité enzymatique de la LDH, des formulations contenant 5% (m/v) d'excipients (tréhalose, lactose ou mannitol) ont été préparées en présence de différentes concentrations de LDH (35, 350 ou 1000 μg de LDH /ml). Ces formulations

ont été lyophilisées suivant un cycle conservateur ou agressif et les lyophilisats obtenus ont ensuite été comprimés à différentes pressions (25, 50, 100, 200, 250 MPa).

L'activité enzymatique de la LDH dans les lyophilisats et les comprimés a été dosée à l'aide d'un kit de dosage spécifique (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega corporation, Madison, WI, Etats-Unis). Ce kit de dosage est un kit de dosage colorimétrique dont le principe est représenté sur la **Figure 39**:

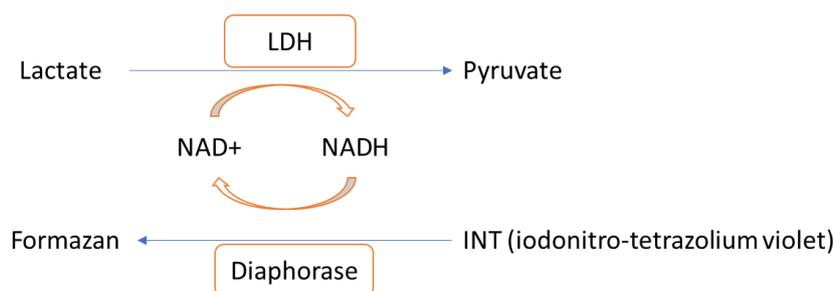


Figure 39 – Schéma des réactions chimiques générales du kit de dosage CytoTox 96®.

En présence de NAD^+ , la LDH transforme le lactate en pyruvate. Le NADH formé au cours de cette réaction enzymatique est ensuite utilisé par la Diaphorase pour transformer l'INT en formazan qui est un composé de couleur rouge. L'intensité de la coloration rouge obtenue est donc proportionnelle à la quantité de LDH ayant réagi. L'absorbance de la solution de formazan est mesurée dans un lecteur de plaque (VarioskanLux) à une longueur d'onde λ de 490 nm.

Après lyophilisation et compression, tous les échantillons sont dissouts dans du PBS, et les solutions obtenues sont diluées pour atteindre la zone de détection linéaire du kit de dosage. En parallèle, une gamme d'étalonnage est préparée à l'aide d'aliquots de LDH. Chaque échantillon est dosé en triplicat selon le protocole expérimental prescrit par le fournisseur du kit de dosage.

2.2.5 Etude de la stabilité de la LDH dans les différentes formes galéniques

Les conditions de l'étude de stabilité ont été définies en s'inspirant de l'ICH guideline (ICH guide lines, 2010). Le but de cette étude est d'évaluer l'influence des conditions de stockage sur l'activité enzymatique de la LDH contenue dans les différentes formes galéniques étudiées dans ce travail. Les poudres lyophilisées et les comprimés obtenus à partir de lyophilisats étant des produits très sensibles à l'humidité, il a été décidé pour cette étude de conserver tous les échantillons lyophilisés sous vide et de conditionner les comprimés (réalisés sous une pression de compression de 50 MPa) dans des flacons en verre dans une enceinte à humidité contrôlée (7-10%). L'ensemble des flacons

a ensuite été placé dans des enceintes pour respecter les conditions de conservation reportées dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 – Paramètres de l'étude de stabilité.

Températures de stockage	+4 °C, +25 °C, +30 °C, +40 °C
Temps analyses	Jour 1, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 180
Pourcentage et excipients utilisés	5% (m/v), tréhalose ou lactose
Concentration théorique de la LDH	35 µg/ml

Les échantillons sont extraits des enceintes aux différents temps et l'activité enzymatique de la LDH dans les échantillons a été dosée selon le protocole défini dans le paragraphe précédent. Pour chaque condition, le dosage a été répété trois fois.

Chapitre 3. Propriétés en compression du tréhalose et du saccharose lyophilisés : caractérisations physico-chimiques et mécaniques

SOMMAIRE

3.1	Introduction.....	114
3.2	Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 3	116
3.3	Résultats et discussions	117
3.3.1	Les propriétés physico-chimiques du tréhalose lyophilisé (FD tréhalose)	117
3.3.1.1	Imagerie en microscopie électronique à balayage.....	117
3.3.1.2	Détermination du taux d'humidité des lyophilisats	118
3.3.1.3	Analyses thermiques par DSC et diffraction des rayons X (DRX)	119
3.3.1.4	Détermination de la masse volumique pycnométrique	119
3.3.1.5	Isothermes de sorption de l'eau par DVS	120
3.3.2	Propriétés physico-chimiques des comprimés de tréhalose lyophilisés	122
3.3.3	Le comportement en compression du tréhalose lyophilisé	123
3.3.3.1	La compressibilité	123
3.3.3.2	L'énergie plastique	128
3.3.3.3	La tablétabilité.....	128
3.3.3.4	Le BFI (Brittle Fracture Index)	132
3.3.3.5	Le recouvrement élastique	133
3.3.3.6	La viscoélasticité.....	134
3.3.4	Problèmes liés à la caractérisation du saccharose lyophilisé (FD saccharose).....	135
3.4	Conclusion	138

3.1 Introduction

Comme décrit dans le **Chapitre 1**, les biomolécules telles que les protéines thérapeutiques, les anticorps ou les ARN_m, sont généralement préparées sous forme de formulations liquides et sont destinées à une administration par voie parentérale (Haddadzadegan et al., 2022). Cependant, un des inconvénients de ces formulations est le risque d'instabilité des biomolécules en milieu aqueux (hydrolyse, agrégation, dégradation...). L'obtention de ces mêmes formulations à l'état solide pourrait donc être une solution qui permettrait de s'affranchir de ces problèmes (Pikal, 1990). Une des techniques de choix pour sécher des formulations liquides de biomolécules tout en conservant leur activité biologique, est la lyophilisation. Il est reconnu que cette technique permet d'améliorer la stabilité et les conditions de conservation des biomolécules (Pikal, 1990). L'étude de l'influence de la lyophilisation (paramètres de formulation et de procédé) pour des préparations pharmaceutiques contenant des biomolécules a été et reste abondamment décrite dans la littérature (Al-Hussein and Gieseler, 2012; Bedu-Addo, 2004; Busignies et al., 2020;; Kawai and Suzuki, 2007; Ohori et al., 2018; S.J. Prestrelski et al., 1993b). Néanmoins, les lyophilisats contenant des biomolécules sont, dans la plupart des cas, destinés à être dissout au moment de l'administration par voie parentérale. L'obtention d'une poudre lyophilisée n'est jamais envisagée comme une étape intermédiaire avant la mise en œuvre d'autres procédés tels que la compression ou la mise en gélule. Pourtant, la formulation de ces poudres lyophilisées sous la forme de gélules ou de comprimés pourrait permettre de s'affranchir d'une administration par voie parentérale. En effet, une administration par voie orale des biomolécules, sous la forme de comprimés notamment, représente une réelle opportunité en raison de la facilité d'administration et de la meilleure acceptation du traitement par le patient.

Un frein important à envisager pour ce type d'administration reste bien sûr le problème de l'absorption de ces biomolécules du fait en particulier de leur poids moléculaire important, mais une administration par voie orale ouvre la possibilité d'une action locale et ciblée dans le traitement de pathologies du tube gastro-intestinal comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique. Il en est de même pour une administration locale (voie buccale ou vaginale par exemple) à des fins de traitement de certaines pathologies par voie muqueuse. Des travaux sont en cours de réalisation au sein de notre laboratoire et font l'objet de dépôts de brevets. Des preuves de concept ont été réalisées pour montrer la faisabilité de ce type de mise en forme et d'administration de molécules biologiques fragiles, mais une étude fondamentale des propriétés des systèmes obtenus après lyophilisation puis comprimés nécessitait d'être réalisée à des fins d'optimisation. C'est dans ce contexte que les études présentées dans ce chapitre de thèse ont été réalisées.

La compression de poudres obtenues par lyophilisation étant très peu décrite dans la littérature, il est donc nécessaire, dans un premier temps, de comprendre les propriétés en compression de ces

systèmes granulaires lyophilisés et l'influence des paramètres du procédé pour pouvoir, par la suite, développer, sur une base scientifique éprouvée, des comprimés contenant différentes biomolécules.

Parmi les nombreux excipients utilisés dans les formulations de lyophilisats, le tréhalose et le saccharose, qui sont des sucres non réducteurs, sont les plus utilisés pour leurs propriétés cryo et lyoprotectrices tel que reporté dans la littérature ainsi que dans les descriptions techniques de produits commercialisés (Bjelošević et al., 2020). L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier les propriétés en compression de ces deux excipients lyophilisés indépendamment de la présence d'une biomolécule. Les essais de compression de lyophilisats contenant une molécule modèle font l'objet de la dernière partie de ce manuscrit (cf. **Chapitre 6**).

L'étude du tréhalose lyophilisé réalisée dans des essais préliminaires au sein de notre laboratoire et au cours de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence des caractéristiques singulières et intéressantes en termes de propriétés physico-chimiques et de comportement en compression. Afin de mieux comprendre ce comportement singulier, le comportement et les propriétés du tréhalose lyophilisé ont été comparés à ceux du tréhalose cristallin et d'excipients couramment utilisés en compression directe. Le saccharose lyophilisé a montré des propriétés différentes de celles du tréhalose lyophilisé. Ces propriétés seront exposées dans la partie résultats et discussions.

Cette partie expérimentale se divise en trois parties :

- a) Etude des propriétés physico-chimiques des excipients lyophilisés : analyse morphologique en MEB, détermination de la teneur en eau par titrage Karl Fischer, analyse de la structure physique par DRX, détermination de la T_g par DSC, mesure de la masse volumique vraie par pycnomètre à hélium et obtention des isothermes de sorption par DVS.
- b) Etude des propriétés des comprimés obtenus avec notamment l'étude de la structure physique, la mesure de la T_g et la détermination du teneur en eau des systèmes lyophilisés après compression.
- c) Etude du comportement en compression des excipients lyophilisés avec l'évaluation de leurs propriétés de compressibilité et de la tablétabilité, la mesure de l'énergie plastique associée au cycle de compression, la détermination du recouvrement élastique et de la viscoélasticité, et la détermination du BFI des compacts obtenus.

Les résultats exposés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans the International Journal of Pharmaceutics sous le titre « Tableting properties of freeze-dried trehalose : Physico-chemical and mechanical investigation » (Hsein et al., 2023) (cf. **annexes**).

3.2 Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 3

Les différents excipients utilisés dans cette partie ont donc été : le tréhalose cristallin (Nagaze, Kyoto, Japon), le tréhalose lyophilisé (FD tréhalose), le saccharose lyophilisé (FD saccharose), le phosphate de calcium anhydre (ACP) (JRS Pharma, Rosenberg, Allemagne), le lactose granulé monohydrate (Lac) (Meggle, Wasserburg, Allemagne) et la cellulose microcristalline (MCC) (JRS Pharma, Rosenberg, Allemagne).

Les poudres lyophilisées (tréhalose et saccharose) ont été obtenues selon des conditions de lyophilisation « conservatrices » décrites dans le **Chapitre 2** (cf. paragraphe **2.2.1.1**). Les essais de compression nécessitant des quantités importantes de poudres, 6 ml de solution de tréhalose ou de saccharose à 5% (m/v) ont été introduits dans des flacons de verre de 20 ml partiellement bouchés par des bouchons en caoutchouc crénelés. Après lyophilisation, chaque flacon de lyophilisats contenait environ 270 mg de tréhalose ou 300 mg de saccharose qui ont ensuite été utilisés pour produire un seul comprimé de produit pur de 250 mg. Toutes les poudres (lyophilisées ou non) ont été comprimées après un remplissage manuel de la matrice et une lubrification externe de la matrice et des poinçons par du stéarate de magnésium (Peter Greven, Bad Münstereifel, Nordrhein-Westfalen, Allemagne). Des poinçons Euro B, ronds plats, de 10 mm de diamètre ont été utilisés sauf pour les comprimés nécessaires à l'étude du BFI. Dans ce cas particulier, des poinçons avec méplat de 11 mm de diamètre ont été choisis (Croquelois et al., 2017).

3.3 Résultats et discussions

3.3.1 Les propriétés physico-chimiques du tréhalose lyophilisé (FD tréhalose)

Dans cette étude, un cycle de lyophilisation « conservateur » a été utilisé avec une température d'étagère fixée à -20 °C au moment de la sublimation. La température d'étagère doit être programmée de sorte à maintenir la température du produit (T_p) en dessous de la température critique (T_c) de la formulation pendant la sublimation afin d'éviter l'effondrement du lyophilisat. Il est couramment admis que la T_c se situe 2 à 3 °C en dessous de la T_g' (Tang and Pikal, 2004). La mesure expérimentale de T_g' de la formulation de tréhalose utilisée dans ce travail a été mesurée par DSC à une valeur de -29 °C , ce qui est en concordance avec les données trouvées dans la littérature (Bjelošević et al., 2020; Wang, 2000). En prenant en compte les conditions fixées pour le cycle de lyophilisation utilisé (température d'étagère de -20 °C et pression de la chambre égale à 0,1 mbar), la température du produit mesurée pendant la dessiccation primaire était égale à -30 °C . Cette température était inférieure à la T_g' de notre formulation et des lyophilisats élégants, sans aucun signe d'effondrement macroscopique, avec un léger rétrécissement aux bords ont été obtenus (**Figure 40**).



*Figure 40 – Aspect macroscopique d'un lyophilisat de tréhalose (lyophilisation de 6 ml de solution de tréhalose 5% m/v dans les conditions « conservatrices » décrites dans le **Chapitre 2**).*

3.3.1.1 Imagerie en microscopie électronique à balayage

La morphologie des lyophilisats a été observée par MEB pour visualiser plus en détail la structure interne. Les images montrent une structure interne en nids d'abeille (**Figure 41 A**). Après broyage léger de l'échantillon, les pores disparaissent et une structure en feuillets est observée (**Figure 41 B**). La variabilité de la taille des pores est directement liée à l'hétérogénéité de taille des cristaux de glaces formées lors de l'étape de congélation (cf. paragraphe **1.1.2.1**). En effet, la cinétique de

congélation utilisée lors de ce cycle de lyophilisation ne permet pas une nucléation contrôlée des cristaux de glace, ce qui amène à la formation de cristaux de taille hétérogène. La structure poreuse qui en résulte est représentative du trajet parcouru par la vapeur d'eau au moment de la sublimation (Liu, 2006). La **Figure 41 A** montre la présence de petits trous, de 5 à 10 μm de diamètre, sur les différentes surfaces formant les pores. Ces mêmes observations ont été constatées par Parker et al. sur des formulations de saccharose contenant des protéines dans le cas de cycles de lyophilisation « agressifs » et « conservateurs » (Parker et al., 2010). Ces ouvertures sont liées à l'élimination des molécules d'eau au cours de la sublimation, quand les cristaux de glace qui subliment sont enfermés dans une phase continue de gangue interstitielle de soluté. Quand l'épaisseur de cette gangue, et donc sa résistance mécanique, est faible celle-ci va céder sous les effets de pression lors de la sublimation créant ainsi ces orifices qui vont permettre de réduire la résistance au flux de vapeur d'eau à travers le lyophilisat pendant l'étape de sublimation (Searles et al., 2001).

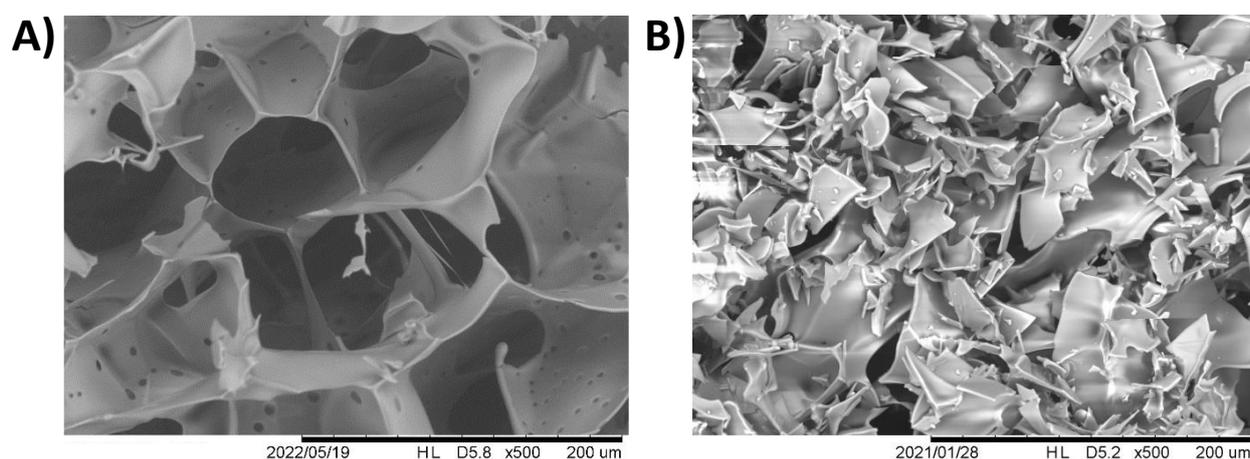


Figure 41 – Images de la structure interne du tréhalose lyophilisé obtenues en MEB (A) préparation de l'échantillon permettant la conservation de la structure en nids d'abeille, (B) après broyage léger du lyophilisat. (Grossissement x500)

3.3.1.2 Détermination du taux d'humidité des lyophilisats

Après lyophilisation, une teneur en eau de $0,52 \pm 0,06$ % a été déterminée sur le FD tréhalose par la technique Karl Fischer. Cette valeur est acceptable pour une application à la lyophilisation de biomolécules, puisqu'une teneur en eau de moins de 1% est souvent recherchée (Schneid et al., 2011) pour limiter les diverses réactions de dégradation causées par des teneurs en eau plus élevées. Par contre, un compromis doit être recherché car un séchage excessif peut déstabiliser les protéines. Pour cela, les paramètres du cycle de lyophilisation doivent être optimisés en prenant en compte la

teneur en eau optimale qui garantira la stabilité de la biomolécule (Hsein et al., 2022; Schneid et al., 2011).

3.3.1.3 Analyses thermiques par DSC et diffraction des rayons X (DRX)

La DSC et la DRX ont été utilisées dans le but d'étudier la structure physique du lyophilisat en comparaison avec le tréhalose cristallin. Les résultats de la DRX ont montré que le FD tréhalose est sous forme totalement amorphe (**Figure 42 B**), en comparaison avec le tréhalose cristallin (**Figure 42 A**). L'amorphisation du tréhalose après lyophilisation est bien en concordance avec la littérature et est la raison principale de son utilisation en tant que stabilisateur en présence de biomolécules (Crowe et al., 1996; Sundaramurthi and Suryanarayanan, 2010). Ces résultats ont été consolidés par ceux obtenus à l'aide de la DSC. L'analyse du FD tréhalose a montré la présence d'une température de transition vitreuse ($T_g = 103 \pm 3 \text{ °C}$) caractéristique d'un matériau amorphe. Cette caractéristique est très importante à prendre en considération puisqu'elle est en relation directe avec la stabilité physique d'un matériau amorphe et est déterminante pour le choix de sa température de stockage. En dessous de la T_g , une biomolécule devrait être stable en raison d'une faible mobilité moléculaire due à la haute viscosité du milieu. Au-dessus de la T_g , la mobilité moléculaire augmente, ce qui pourrait compromettre la stabilité durant le stockage. Il est couramment suggéré qu'un produit amorphe doit être conservé à une température de stockage dont la valeur est 50 °C en dessous de la valeur de la T_g (Duddu et al., 1997; Liu, 2006). Cette limite est appelée la température de Kauzmann. En dessous de cette valeur, la mobilité moléculaire est totalement inhibée et pour une formulation donnée, une biomolécule intégrée dans la formulation serait vitrifiée et stabilisée de manière optimale. Par contre, l'eau agissant comme un plastifiant, la valeur de la T_g diminue lorsque la teneur en eau du solide augmente. Pour éviter toute variation de la teneur en eau des lyophilisats au cours de leur conservation, les flacons ont donc été fermés sous vide avant leur sortie du lyophilisateur, et ouverts juste avant les essais de caractérisation et de compression.

3.3.1.4 Détermination de la masse volumique pycnométrique

Dans les conditions de lyophilisation choisies, la masse volumique pycnométrique du tréhalose lyophilisé a été déterminée à une valeur $1,496 \pm 0,009 \text{ g.cm}^{-3}$. Cette valeur est inférieure à celle du tréhalose cristallin qui a été mesurée à $1,513 \pm 0,005 \text{ g.cm}^{-3}$. Cette diminution de la masse volumique après amorphisation est un résultat attendu, du fait de l'absence d'organisation à l'échelle moléculaire dans les systèmes amorphes (Bookwala et al., 2020). Un tel résultat a également été observé par Bourduche et al. pour le maltitol (Bourduche et al., 2020), par Stange et al. pour le saccharose (Stange et al., 2013) et par Hancock et al. pour une molécule modèle de substance active (3-[(4-O-[4,6-

bis(fluorophenylcarbonyl)]- β -D-glucopyranosyl]- β -D-flucopyranosyl]oxy-(3 β , 5, 25R)-spirostan-12-one) (Hancock et al., 2002).

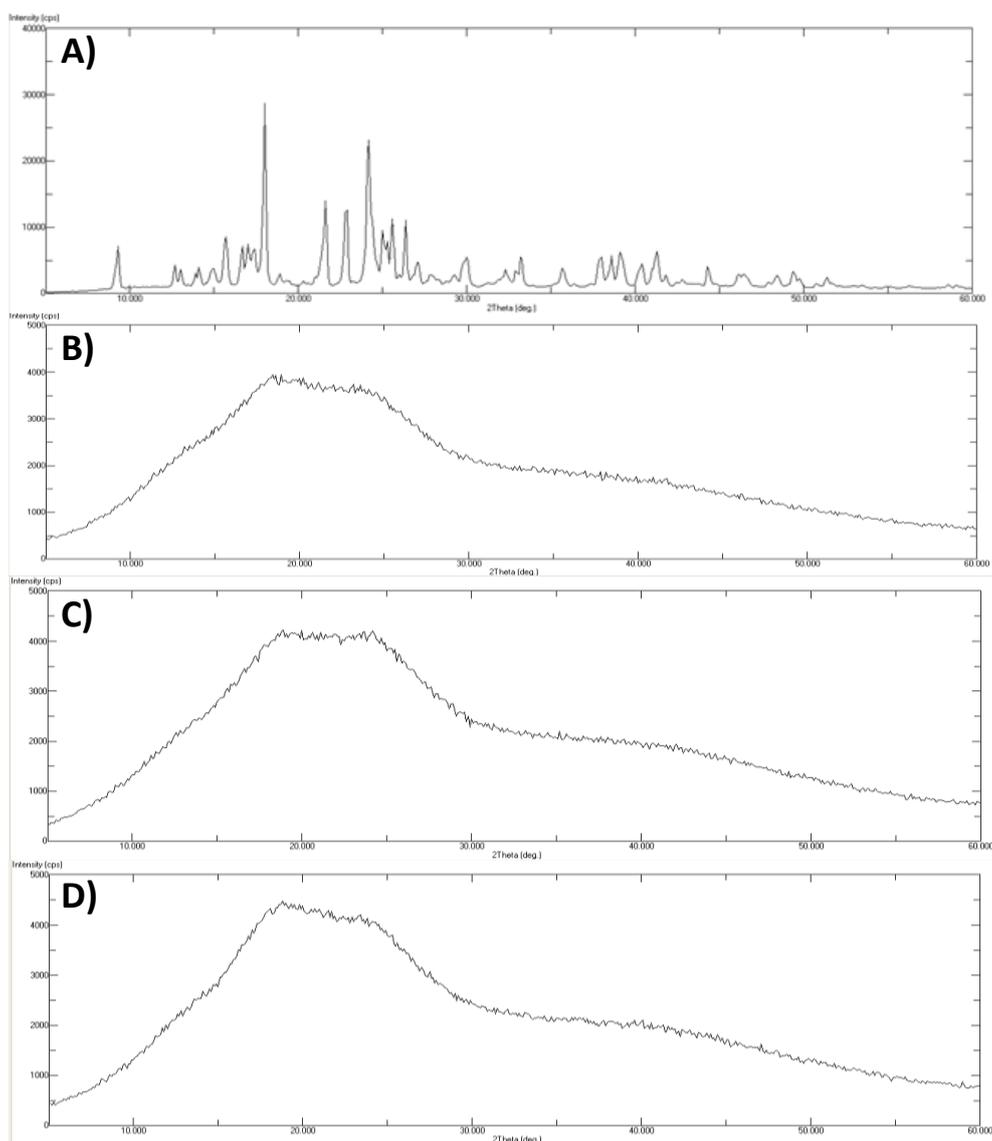


Figure 42 – Diffractogrammes du tréhalose avant lyophilisation (A), après lyophilisation (B), après compression de la poudre lyophilisée à 50 MPa (C) et à 150 MPa (D).

3.3.1.5 Isothermes de sorption de l'eau par DVS

En fonction des propriétés physicochimiques d'un échantillon, son comportement vis-à-vis de l'humidité peut varier (Hancock and Zografi, 1997). Un solide cristallin peut adsorber de faibles quantités d'eau ou bien de plus grandes quantités afin de former des solvates (molécules d'eau à l'intérieur du réseau cristallin) (Hancock and Zografi, 1997). Par contre, les matériaux amorphes, peuvent adsorber ou absorber de larges quantités d'eau (Hancock and Zografi, 1997). L'eau pouvant

agir comme plastifiant, et susceptible de modifier les propriétés physico-chimiques et mécaniques des poudres lyophilisées, il était important pour nous de réaliser les déterminations par DVS (Dynamic Vapour Sorption) des isothermes de sorption d'eau, afin d'être sûr que les conditions d'humidité dans lesquelles les poudres utilisées seront manipulées et processées ne modifient pas leurs propriétés de base et n'entraînent pas une recristallisation des systèmes amorphes lyophilisés.

La DVS est une technique gravimétrique qui mesure la quantité de solvant (l'eau dans nos essais) absorbée par un échantillon placé dans une enceinte régulée en humidité et en température. Cette technique permet également d'appréhender la cinétique selon laquelle la prise d'eau se réalise. Pendant l'analyse, il est possible de suivre précisément la variation de la masse de l'échantillon à des intervalles de temps réguliers. Les analyses par DVS ont été réalisées sur le tréhalose lyophilisé dans le but d'anticiper sur les conditions de manipulation de ces poudres au moment de la mise en forme par compression dans des conditions de température et d'humidité contrôlées à des valeurs de 25 °C et 30 – 40 % respectivement. Les analyses ont été réalisées à une température de 25 °C et à des humidités relatives variant entre 0 et 100% avec des pas de 5%. Pour chaque taux d'humidité relative, le temps d'équilibration a été fixé à 13 heures. Des lyophilisats de FD tréhalose de 270 mg ont été analysés.

L'isotherme de sorption de la vapeur d'eau pour le FD tréhalose est représenté sur la **Figure 43**. Le profil de l'isotherme du FD tréhalose montre que ce dernier commence à adsorber l'eau graduellement à partir d'une humidité relative de 10 %. Quand l'humidité relative est entre 20 et 40 %, la variation de masse du FD tréhalose est inférieure ou égale à 5 % (**Figure 43**). La variation de masse augmente très progressivement jusqu'à 10 % quand l'humidité relative passe de 40% à 90%. Finalement, à une humidité relative de 90%, le FD tréhalose adsorbe une très grande quantité d'eau (**Figure 43**).

Les comprimés de FD tréhalose analysés par titration de Karl Fischer ont montré que leur teneur en eau se situait autour de 4 à 5%. Ce résultat est cohérent avec les résultats de l'isotherme de sorption obtenu par DVS. Il y a donc un pourcentage de 3 à 4% d'eau qui est adsorbé entre le temps d'ouverture des flacons de lyophilisation et leur compression (approximativement 2 minutes), dans des conditions d'humidité entre 30 et 40% dans la salle de compression. L'adsorption d'eau par le FD tréhalose est donc rapide puisque juste en deux minutes de manipulation, le lyophilisat s'équilibre aux teneurs qui ont été obtenues par l'isotherme de sorption DVS. Ce résultat est intéressant car, d'après l'isotherme de sorption, la concentration en eau à l'équilibre reste stable malgré les variations des conditions environnementales (la variation de masse du lyophilisat est toujours de 5 % quand l'humidité relative varie entre 30 et 45 %), ce qui suggère que les caractéristiques du lyophilisat ne sont pas sensibles à ces fluctuations dans les conditions de manipulations.

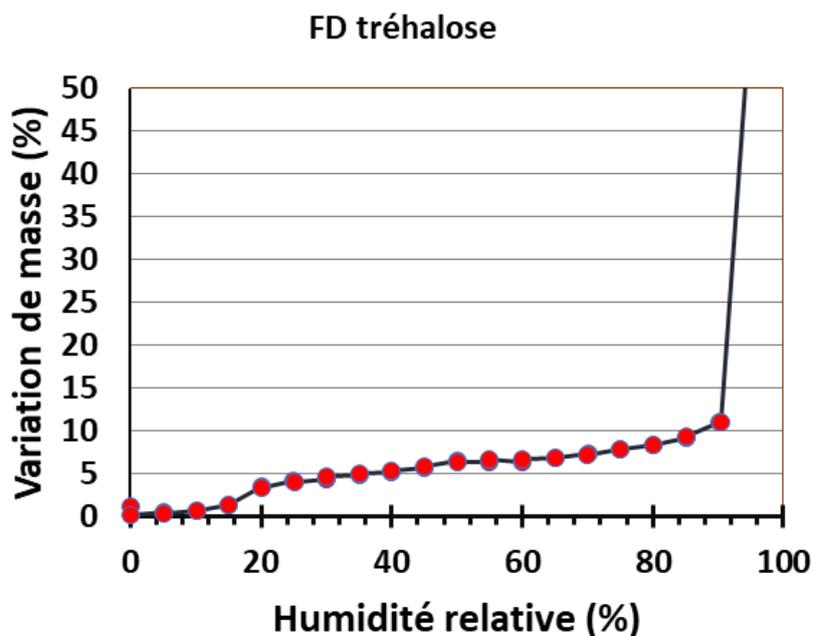


Figure 43 – Isotherme de sorption de la vapeur d'eau pour le FD tréhalose.

3.3.2 Propriétés physico-chimiques des comprimés de tréhalose lyophilisés

Le tréhalose lyophilisé a ensuite été comprimé à 50 et 150 MPa. Son état physique n'a pas été modifié par la compression puisqu'il est resté amorphe au sein des comprimés (**Figure 42**). Par contre, l'analyse en DSC a montré une diminution de la T_g avec des valeurs entre 65 et 78 °C selon le comprimé testé. Cette diminution peut être expliquée par l'absorption d'eau aux différentes étapes préalables à la compression (ouverture du flacon initialement fermé sous-vide, broyage de la poudre dans le mortier, étape de compression). Après compression, la teneur en eau des comprimés mesurés par titrage Karl Fischer a été mesurée aux alentours de 4%. Un meilleur contrôle des conditions environnementales, par exemple une humidité ambiante plus faible, pourrait probablement limiter l'absorption en eau des comprimés et aider à maintenir une valeur de T_g plus élevée afin d'améliorer la stabilité à long terme. L'absence de recristallisation après compression, même à des pressions élevées, est un résultat important qui présente un grand intérêt pour les applications futures lorsque des biomolécules telles que des protéines seront ajoutées à la formulation. Nos résultats ont permis de confirmer ceux d'Eriksson et al. (Eriksson et al., 2002). Dans cette étude, du FD tréhalose est resté amorphe après compression et conservation à 20 °C sous une humidité relative de 0% (Eriksson et al., 2002). Par contre, des modifications des conditions de stockage des comprimés (60 °C/0% HR ou conditionnement à 33% ou 45% HR) ont provoqué une recristallisation du FD tréhalose. En outre, l'activité de la phosphatase alcaline utilisée comme protéine modèle n'a pu être conservée que lorsque les comprimés de tréhalose restaient amorphes (stockage à 20 °C/0% HR). Une perte importante ou totale de l'activité protéique a été observée dans les conditions de

conservation entraînant la cristallisation du tréhalose. Dans le cadre de notre étude, le tréhalose lyophilisé s'est amorphisé, et est resté amorphe même après compression, ce qui représente un résultat encourageant pour l'ajout de biomolécule et la conservation de son activité dans des applications futures.

3.3.3 Le comportement en compression du tréhalose lyophilisé

3.3.3.1 La compressibilité

Pour l'étude de la compressibilité, la teneur en eau des échantillons était un paramètre très important à prendre en compte. Puisque l'eau se comporte comme un plastifiant et qu'une augmentation de sa teneur induit une baisse de la T_g de la poudre, il est très probable que cela influence la stabilité physique des comprimés produits. De plus, l'humidité d'un système granulaire peut influencer son comportement en compression ainsi que les propriétés des comprimés produits telles que leur résistance à la rupture ou leur dissolution (Elkhider et al., 2007). Pour éviter tout effet d'une variation de la teneur en eau des poudres lyophilisées, tous les flacons ont été fermés sous-vide et stockés au maximum deux jours avant la compression.

La compressibilité du FD tréhalose a été évaluée en traçant l'évolution de la porosité en fonction de la pression de compression. Cette étude a été réalisée « in-die » (sous compression) et « out-of-die » (à l'éjection). Le profil de compressibilité « out-of-die » du FD tréhalose (**Figure 45**) montre une diminution de la porosité avec une porosité égale à 50% pour une pression de 12,5 MPa et une valeur de 1% à 250 MPa. La compressibilité « in-die » du FD tréhalose (**Figure 44**) montre une réduction de la porosité jusqu'à des valeurs négatives de -1% à une pression de compression de 250 MPa. Cette valeur était attendue puisque le profil de compressibilité « in-die » inclut la déformation élastique du comprimé (Ilić et al., 2013). Il existe deux phénomènes essentiels qui peuvent expliquer ce résultat. Premièrement, du fait de la compressibilité d'un solide, la masse volumique particulière de la poudre peut augmenter avec l'augmentation de la pression de compression appliquée (Wünsch et al., 2019). Comme généralement décrit dans la littérature, cet effet a été négligé lors du calcul de la porosité. A des pressions de compression élevées, cette sous-estimation de la masse volumique particulière peut mener à une porosité apparente négative. Deuxièmement, une autre caractéristique liée à la structure amorphe de produits lyophilisés peut expliquer la porosité négative. Les produits amorphes, à l'inverse des produits cristallins, ne possèdent pas une masse volumique bien définie, cette masse volumique, inférieure à celle du même produit sous sa forme cristallisée, peut évoluer durant la compression, et cela peut aussi contribuer à l'obtention d'un résultat de porosité apparente négative à des pressions appliquées élevées quand on utilise la masse volumique mesurée par pycnométrie pour le calcul de la porosité des comprimés.

En comparant les profils de compressibilité du tréhalose cristallin et du FD tréhalose, il est observé que les valeurs de porosité pour la forme cristalline sont significativement moins élevées pour des pressions de compression entre 12,5 MPa et 100 MPa. Ces résultats indiquent que le tréhalose cristallin est plus compressible que le FD tréhalose aux faibles pressions.

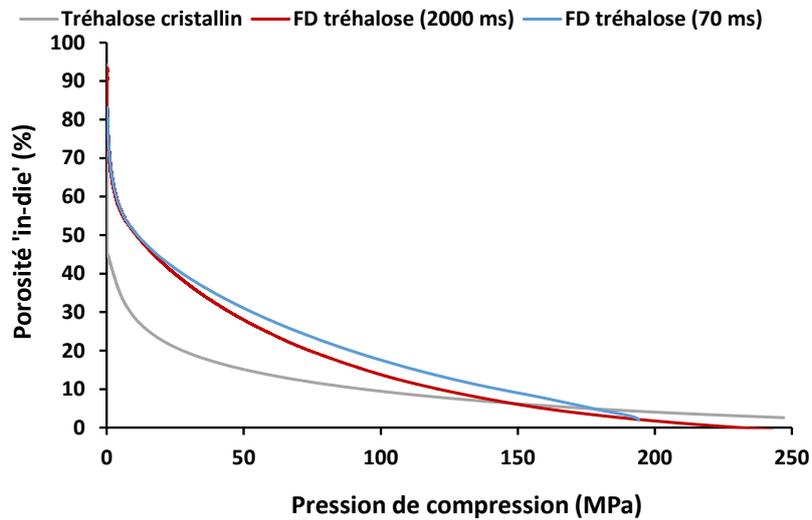


Figure 44 – Profils de compressibilité « in-die » pour le tréhalose cristallin et le tréhalose lyophilisé (FD tréhalose). Pour le tréhalose lyophilisé, 2000 ms et 70 ms indiquent le temps du cycle de compression.

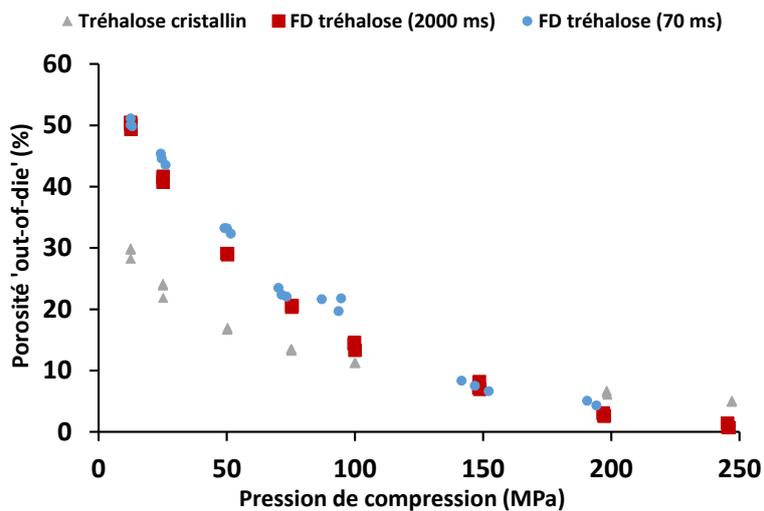


Figure 45 – Profils de compressibilité « out-of-die » pour le tréhalose cristallin et le tréhalose lyophilisé (FD tréhalose). Pour le tréhalose lyophilisé, 2000 ms et 70 ms indiquent le temps du cycle de compression.

Pour appuyer ces résultats, une visualisation de la structure interne des comprimés obtenus à différentes pressions a été réalisée par MEB (**Figure 46**). Les images des comprimés de FD tréhalose ont montré des feuillets relativement bien individualisés et orientés aléatoirement pour des pressions de compression allant de 12,5 MPa à 75 MPa, signe que la structure interne des lyophilisats a été conservée. De plus, les images ont montré une porosité plus faible pour les pressions élevées ce qui conforte les résultats de compressibilité présentés sur la **Figure 44** et la **Figure 45**.

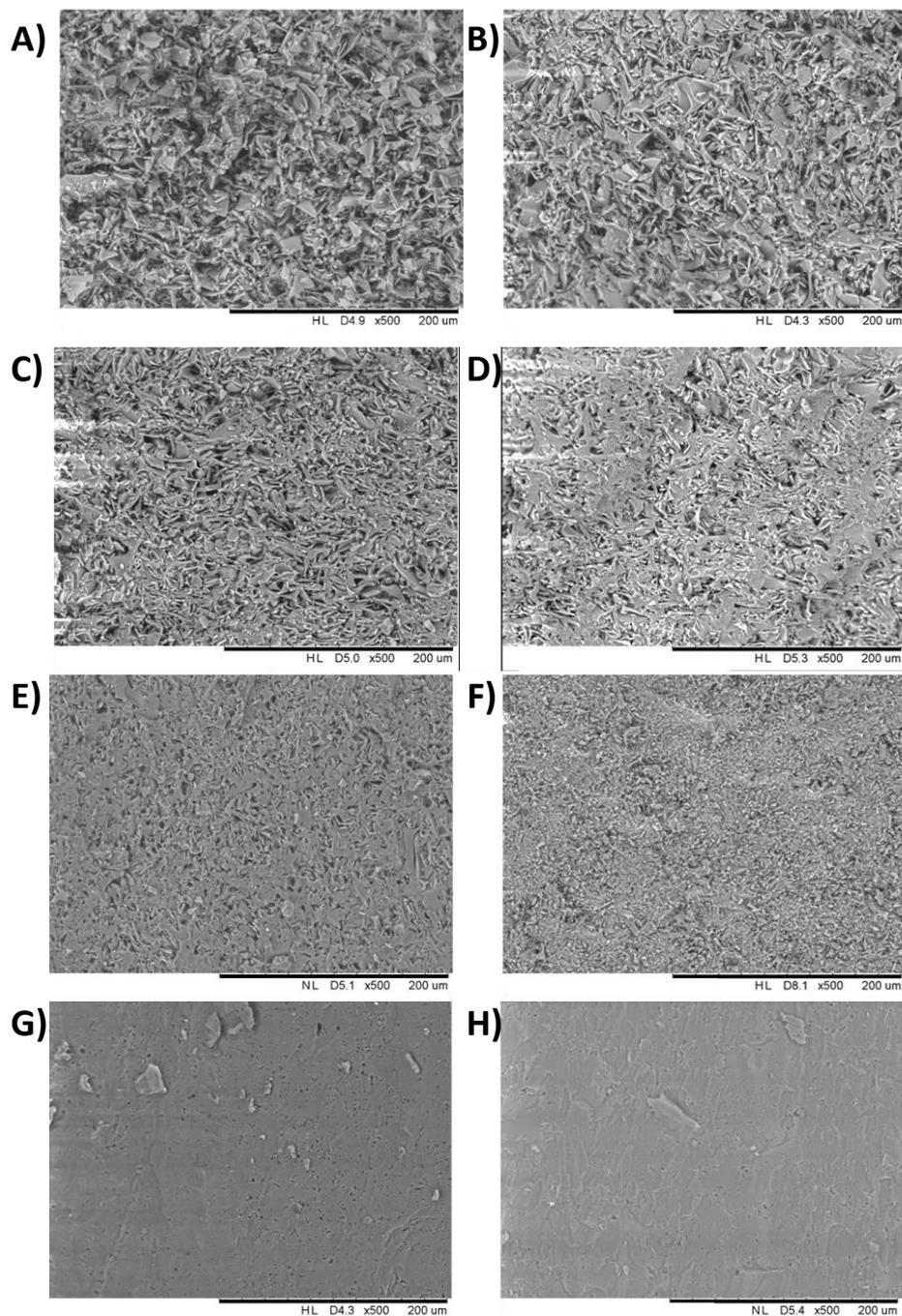


Figure 46 – Images MEB de la structure interne des comprimés de tréhalose lyophilisé obtenus à 12,5 (A), 25 (B), 50 (C), 75 (D), 100 (E), 150 (F), 200 (G) et 250 MPa (H). (Grossissement x500)

Pour une pression de compression appliquée supérieure ou égale à 100 MPa, les images MEB (**Figure 46**) ont montré une disparition progressive des feuillets en lien avec une diminution de la porosité des comprimés, jusqu'à tendre vers une quasi fusion des feuillets et l'obtention d'un solide quasi-continu. En effet, la conservation de la morphologie du FD tréhalose dans les comprimés obtenus à faibles pressions (**Figure 46**) combinée à leur état amorphe (**Figure 42**) peut être un élément d'intérêt pour la conservation de la structure des biomolécules après lyophilisation et compression.

L'influence de la vitesse de compression sur la compressibilité du FD tréhalose a ensuite été évaluée en calculant la sensibilité à la vitesse de déformation (SRS). Les résultats montrent une valeur de SRS de 20% ce qui, d'après Roberts et Rowe, est une sensibilité à la vitesse de compression associée à un mécanisme de déformation plastique (Roberts and Rowe, 1985). Cette valeur de SRS est la plus élevée parmi les excipients testés puisque des valeurs de 12,8 ; 12,7 ; 5,5 et 3,5% ont été calculées respectivement pour le tréhalose cristallin, la MCC, le Lac et l'aCP.

Il a également été intéressant d'observer les différences entre les courbes de compressibilité « in-die » obtenues à deux vitesses différentes pour le FD tréhalose (**Figure 44**). En effet, ces profils ont montré que les deux courbes étaient superposées aux basses pressions, différenciées à des valeurs de pressions intermédiaires puis de nouveau superposées à partir de 200 MPa pour des niveaux de pression où la porosité est très faible. Ce type de comportement est cohérent avec un comportement viscoplastique tel que décrit par Desbois et al. (Desbois et al., 2022). Ce résultat est également cohérent avec les valeurs élevées de SRS calculées qui montrent une dépendance marquée des déformations sous compression au temps d'application des contraintes de compression.

Dans la deuxième partie de cette étude, les profils de compressibilité « in-die » et « out-of-die » du FD tréhalose ont été comparés à ceux d'autres excipients couramment utilisés en compression pharmaceutique et qui possèdent différents mécanismes de déformation sous pression (**Figure 47 A et B**). Les excipients choisis étaient la cellulose microcristalline (MCC), le phosphate de calcium anhydre (aCP) et le lactose monohydrate granulé (Lac). Les profils de compressibilité « in-die » et « out-of-die » du FD tréhalose montrent des profils assez similaires à ceux de la MCC. Par contre le tréhalose cristallin présente des profils de compressibilité « in-die » et « out-of-die » plus proche de ceux du Lac (**Figure 47 A et B**).

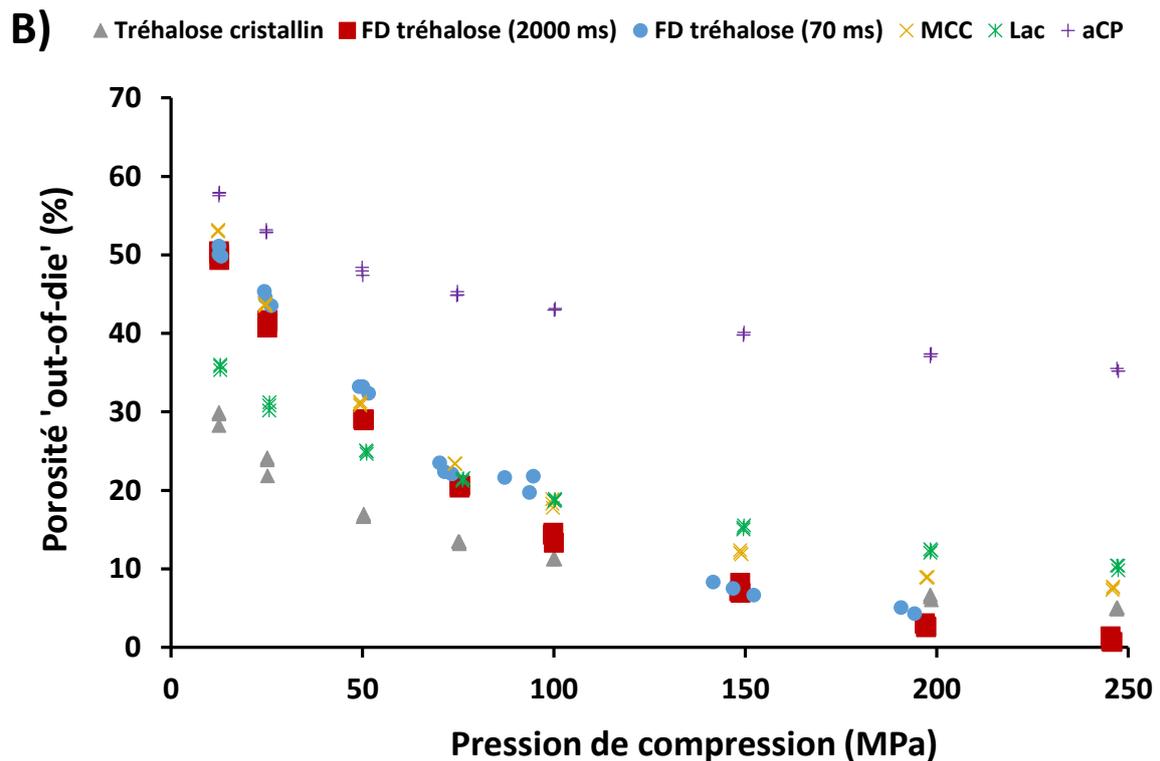
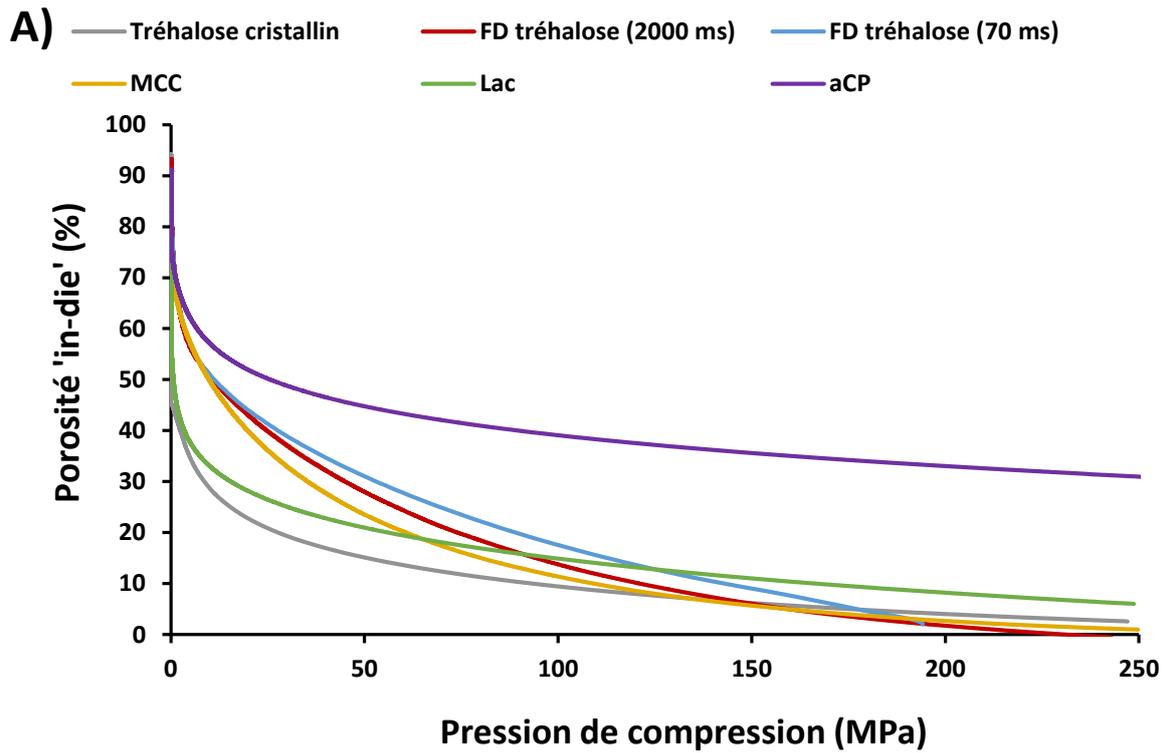


Figure 47 – Profils de compressibilité « in-die » (A) et « out-of-die » (B) pour le tréhalose cristallin, le tréhalose lyophilisé (FD tréhalose) et trois excipients de compression directe (MCC, cellulose microcristalline ; Lac, lactose monohydrate ; aCP, phosphate de calcium anhydre). Pour le tréhalose lyophilisé, 2000 ms et 70 ms indiquent le temps du cycle de compression.

3.3.3.2 L'énergie plastique

L'énergie plastique est, par définition, l'énergie totale conférée à une poudre durant un cycle de compression (elle est obtenue par l'aire totale sous la courbe force vs épaisseur). Les valeurs d'énergie plastique ont été directement calculées en utilisant le logiciel Analis. Elles ont ensuite été normalisées par le volume du solide comprimé, comme recommandé par Wunsch et al., afin de permettre la comparaison de produits ayant des masses volumiques pycnométriques différentes (Wunsch et al., 2021). Cette énergie est considérée comme un indicateur du comportement en compression d'un système granulaire qui pourrait être en relation avec des problèmes tels que le décalottage (un système granulaire caractérisé par une faible énergie plastique aurait une plus forte tendance au décalottage) (Meynard et al., 2022b; Nakamura et al., 2012). Cette énergie étant bien sur dépendante de la pression de compression, il a été choisi de comparer les valeurs obtenues pour les différents excipients comprimés à 150 MPa (**Tableau 9**).

Tableau 9 – Energie plastique des différents excipients comprimés à 150 MPa.

Energie plastique (J.cm ⁻³)				
FD tréhalose	Tréhalose cristallin	MCC	Lac	aCP
45,6 ± 0,4	16,4 ± 0,2	38,5 ± 0,1	18,7 ± 0,0	37,1 ± 0,5

On note ici une valeur particulièrement grande de l'énergie plastique dans le cas du FD tréhalose, très différente de celle du tréhalose cristallin et supérieure à la MCC, souvent présentée comme un excipient de référence.

3.3.3.3 La tablétabilité

Comme décrit dans le **Chapitre 1**, les profils de tablétabilité ont été étudiés en mesurant la contrainte de rupture en test de compression diamétrale, pour des comprimés obtenus à différentes pressions. La contrainte de rupture est une caractéristique très importante des comprimés pharmaceutiques à considérer puisqu'ils doivent être délivrés intacts aux patients, sans aucun dommage mécanique (Yohannes and Abebe, 2021).

Il est généralement considéré qu'une contrainte de rupture entre 1,5 et 2 MPa est suffisante pour assurer une bonne résistance mécanique des comprimés pendant tout le procédé de production, à partir de la compression jusqu'au conditionnement. Une contrainte de rupture de 1 MPa peut être

tolérée dans le cas de production à petite échelle si les comprimés ne sont pas exposés à des contraintes mécaniques trop importantes (McCormick, 2005; Pitt and Heasley, 2013).

Comme le montre la **Figure 48**, des comprimés de FD tréhalose cohésifs ont pu être produits sous de très faibles pressions, quel que soit la vitesse de compression, puisque des contraintes de rupture de 1,5 MPa et 2,8 MPa ont été obtenues pour des pressions de compression de 25 MPa et 50 MPa respectivement.

En plus, la **Figure 48** montre l'impact de la vitesse de compression sur les profils de tabléabilité du FD tréhalose. Cet impact a été évalué à des pressions allant de 12,5 MPa à 250 MPa avec un cycle de compression lent (durée totale du cycle de 2000 ms) et de 12,5 MPa à 200 MPa avec un cycle de compression rapide (durée totale du cycle de 70 ms) (**Figure 48**). Pour les deux vitesses étudiées, les comprimés de FD tréhalose ont montré une forte cohésion dès les faibles pressions. Compte tenu de la variabilité des contraintes de rupture, il est difficile de voir une réelle différence de comportement pour des pressions de compression inférieures ou égales à 100 MPa aux deux vitesses de compression étudiées. Pour les comprimés obtenus en utilisant le cycle rapide, la contrainte de rupture chute brusquement à partir d'une pression de 150 MPa et un laminage a été observé en sortie de la matrice pour tous les comprimés. Dans le cas d'une compression réalisée en utilisant le cycle lent, la contrainte de rupture chute brusquement à partir d'une pression de compression supérieure, de l'ordre de 200 MPa et aucun laminage n'est observé en sortie de matrice. Pour tenter d'éviter l'apparition de ce défaut en compression rapide, une étape de pré-compression a été rajoutée au cycle de compression. L'utilisation d'une pré-compression a permis d'éviter le laminage des comprimés sur toute la gamme de pression en utilisant le cycle rapide. D'après la classification proposée par Mazel et al., le défaut observé est donc un laminage de type 1 causé par un emprisonnement d'air (Mazel and Tchoreloff, 2022). Pour les comprimés qui n'ont pas laminés en sortie de matrice, la texture particulière du tréhalose lyophilisé a pu favoriser l'apparition de défauts internes pendant la compression, à l'origine de la chute de la contrainte de rupture.

Le comportement du FD tréhalose et de la MCC pendant le test de compression diamétrale des comprimés obtenus à 50 MPa s'est avéré très différent (**Figure 49**). En effet, diverses études ont montré que des comprimés de MCC se comportent de manière ductile durant le test de compression diamétrale (Gong and Sun, 2015; Mazel and Tchoreloff, 2023; Procopio et al., 2003). Ce comportement a été observé dans nos essais pour la MCC, au contraire des comprimés de tréhalose lyophilisé qui ont présenté une rupture brutale dans le domaine élastique (**Figure 49**).

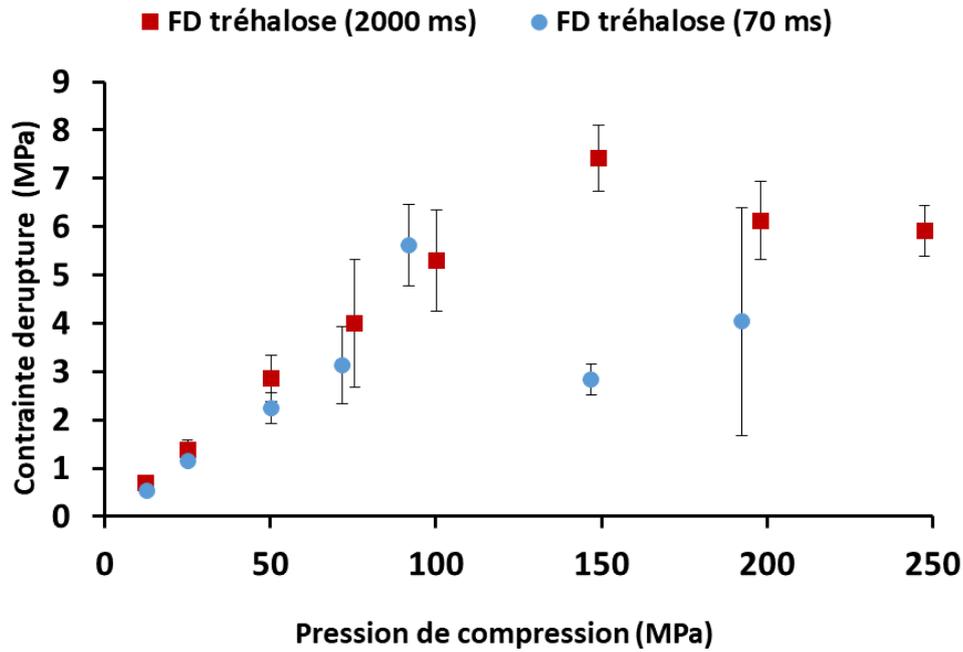


Figure 48 – Profils de tablétabilité montrant l'évolution de la contrainte de rupture en fonction de la pression de compression axiale. FD tréhalose (2000 ms) et (70 ms) indiquent le temps du cycle de compression. Chaque point correspond à la moyenne de trois mesures.

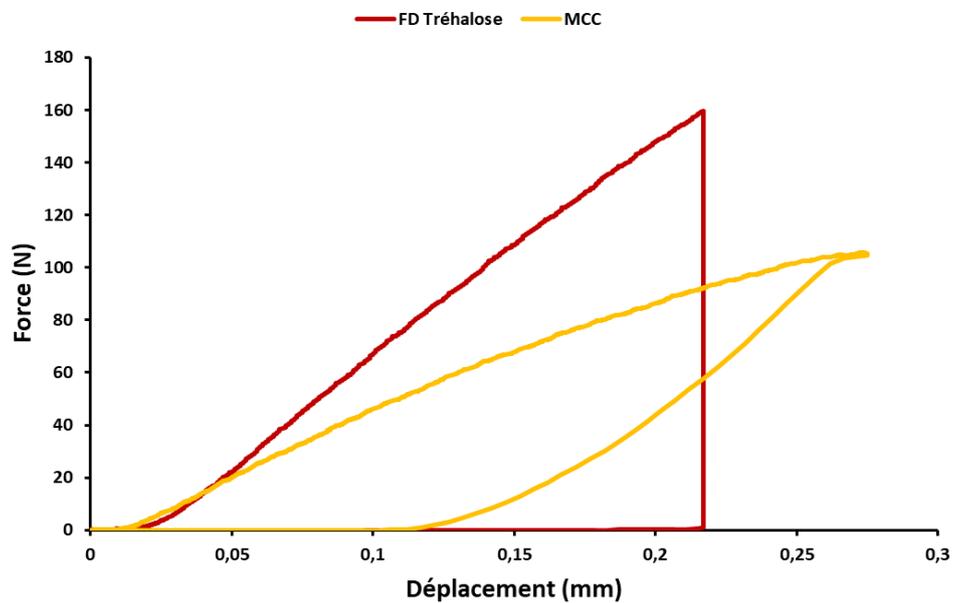


Figure 49 – Courbes force/déplacement obtenues durant le test de rupture diamétrale pour les comprimés de tréhalose lyophilisé (FD trehalose) et de cellulose microcristalline (MCC) obtenues à une pression de compression de 50 MPa.

La comparaison avec les autres excipients étudiés a montré que le profil de tablétabilité du FD tréhalose était très différent de celui du tréhalose cristallin mais qu'il était relativement similaire à celui de la MCC (**Figure 50**). De plus, les profils de tablétabilité des comprimés de tréhalose lyophilisé obtenus à des pressions de compression plus élevées (supérieures à 75 MPa ou 150 MPa selon la vitesse de compression) présentent une plus grande variabilité et une chute de la contrainte de rupture (**Figure 48**). Le fait que les comprimés ne se soient pas tous cassés diamétralement pourrait expliquer cette forte variabilité de mesure propre au FD tréhalose.

En plus, le tréhalose cristallin a nécessité l'application d'une plus grande pression de compression pour pouvoir atteindre des contraintes de rupture suffisantes (des pressions de compression de 150 et 200 MPa permettent d'atteindre respectivement des contraintes de rupture de $1,44 \pm 0,02$ MPa et $1,79 \pm 0,04$ MPa) (**Figure 50**). Cette différence de comportement peut être due à l'état amorphe du FD tréhalose et/ou à sa texture spécifique. Ce résultat est cohérent avec une étude précédente de Bourduche et al. qui a montré que le maltitol amorphe présentait une plus forte cohésion que le maltitol cristallin quand il était comprimé à faible pression (Bourduche et al., 2020).

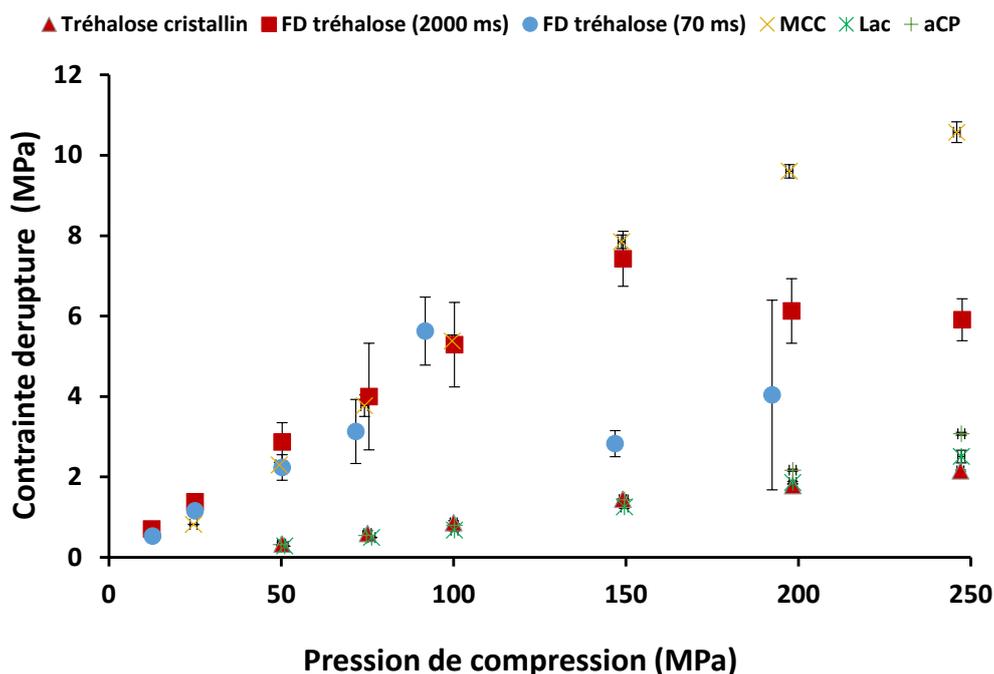


Figure 50 – Profils de tablétabilité montrant l'évolution de la contrainte de rupture en fonction de la pression de compression axiale. Pour FD tréhalose, 2000 ms et 70 ms indiquent le temps du cycle de compression. Chaque point correspond à la moyenne de trois mesures.

3.3.3.4 Le BFI (Brittle Fracture Index)

Le BFI du FD tréhalose a été déterminé sur des comprimés produits à 25 MPa (contrainte de rupture de 1,5 MPa) à une valeur de 1,12. Cette valeur singulière indique une forte tendance à la rupture fragile. Ce résultat est en cohérence avec le comportement fragile qui a été observé sur les courbes force/déplacement du test de rupture. Au regard des valeurs données dans la littérature, cette valeur de BFI est élevée (Meynard et al., 2022a; Okor et al., 1998). Le **Tableau 10** montre que les comprimés de MCC produits à la même pression que le FD tréhalose présentent un BFI très faible de l'ordre de 0,1. Le BFI des comprimés de MCC est bien décrit dans la littérature (Yost et al., 2022). Les valeurs publiées sont en cohérence avec nos résultats et justifient le comportement ductile observé durant les tests de rupture diamétrale pour ce type de produit.

A l'exception de la MCC, il n'a pas été possible de produire des comprimés des autres excipients à une pression de 25 MPa car les comprimés étaient très friables et peu cohésifs ce qui ne permettait pas de les percer. Afin de pouvoir comparer le BFI du FD tréhalose à celui des autres excipients (tréhalose cristallin, Lac et aCP), des comprimés de ces excipients ont été produits à 150 MPa. Il est important de noter que le BFI augmente avec la pression (Croquelois et al., 2020) et il en sera tenu compte dans la comparaison entre les différents produits. Le **Tableau 10** montre que le BFI de tous les excipients comprimés à 150 MPa est beaucoup plus petit que celui du FD tréhalose, alors que leur pression de compression était plus élevée. La comparaison du BFI du FD tréhalose comprimé à 25 MPa, à celui du tréhalose cristallin comprimé à 150 MPa, montre également une valeur significativement plus importante du système lyophilisé et comprimé.

Pour confirmer le comportement fragile du tréhalose lyophilisé au cours du test de rupture, la rupture des comprimés de tréhalose lyophilisé a été aussi observée durant le test de rupture diamétrale en utilisant une caméra à haute vitesse d'acquisition (10 000 images/s). La **Figure 51** présente les images enregistrées au moment de la rupture du comprimé. La rupture centrale qui est attendue dans un test de rupture diamétrale est bien présente, mais d'autres fractures sont également visibles. Le comprimé se rompt mais avec plusieurs ruptures simultanées. Ces images confirment encore une fois la grande fragilité des comprimés de tréhalose lyophilisé qui pourrait expliquer la variabilité des mesures de contraintes de rupture obtenue aux hautes pressions de compression.

Ce résultat est là encore relativement singulier. Nous avons pu voir que les caractéristiques de déformation du FD tréhalose s'apparentait fortement à celles de la MCC, produit réputé pour son caractère ductile. Les énergies de compression sont également grandes pour ces systèmes lyophilisés supérieures même à celles calculées pour la MCC. Pourtant quand on s'intéresse aux propriétés de cohésion et surtout de rupture des comprimés, le comportement du FD tréhalose s'avère être totalement différent de celui de la MCC. La MCC sous forme de compacts conserve son

caractère ductile alors que les comprimés de FD tréhalose sont caractérisés par un comportement de rupture fragile extrêmement marqué.

Tableau 10 – BFI (Brittle Fracture Index) des excipients étudiés à différentes pressions de compression.

Excipient	Pression de compression (MPa)	BFI
FD tréhalose	25	1,12
Tréhalose cristallin	150	0,20
MCC	25	0,09
	150	0,18
Lac	150	0,23
aCP	150	0,18

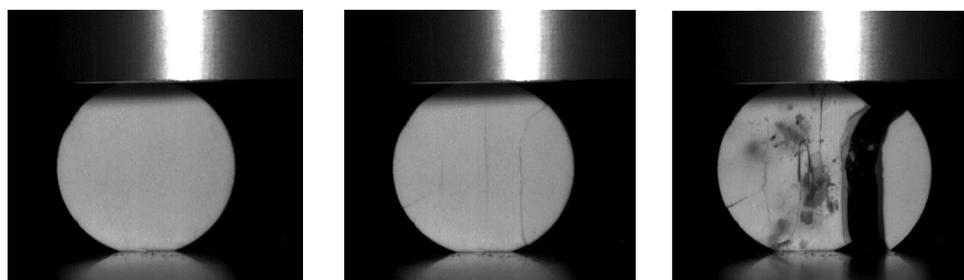


Figure 51 – Test de compression diamétrale d'un comprimé de tréhalose lyophilisé (pression de compression de 50 MPa). Les images enregistrées au moment de la rupture montrent des ruptures aléatoires et non diamétrales signe d'une forte tendance à une rupture fragile.

3.3.3.5 Le recouvrement élastique

Une autre caractéristique importante utilisée dans la caractérisation de comprimés est leur recouvrement élastique après compression. Le pourcentage de recouvrement élastique des comprimés en fonction de la pression de compression appliquée est représenté sur la **Figure 52** pour le tréhalose lyophilisé, le tréhalose cristallin, la MCC, l'aCP et le Lac. Concernant le tréhalose lyophilisé, les valeurs de recouvrement élastique diminuent quand la pression augmente (de 6% à

12,5 MPa jusqu'à 2% à 150 MPa) pour la plage de pressions inférieures à 150 MPa. Ces valeurs sont dépendantes de la vitesse du cycle de compression utilisé. Entre 150 MPa et 250 MPa, le recouvrement élastique se stabilise à une valeur de 2% similaire au recouvrement élastique des comprimés de tréhalose cristallin. Ce comportement diffère de celui observé pour les autres excipients étudiés.

Une diminution du recouvrement élastique est également observée aux basses pressions pour la MCC, mais avec des valeurs beaucoup plus élevées que celles relevées pour le FD tréhalose. Par exemple, pour des comprimés obtenus sous 50 MPa de pression de compression, le pourcentage de recouvrement élastique des comprimés de FD tréhalose est dans un ordre de grandeur de 2 fois plus faible que celui de la MCC. Il est aussi important de noter que le recouvrement élastique du tréhalose cristallin est très faible (2%) pour toute la gamme de pressions utilisées.

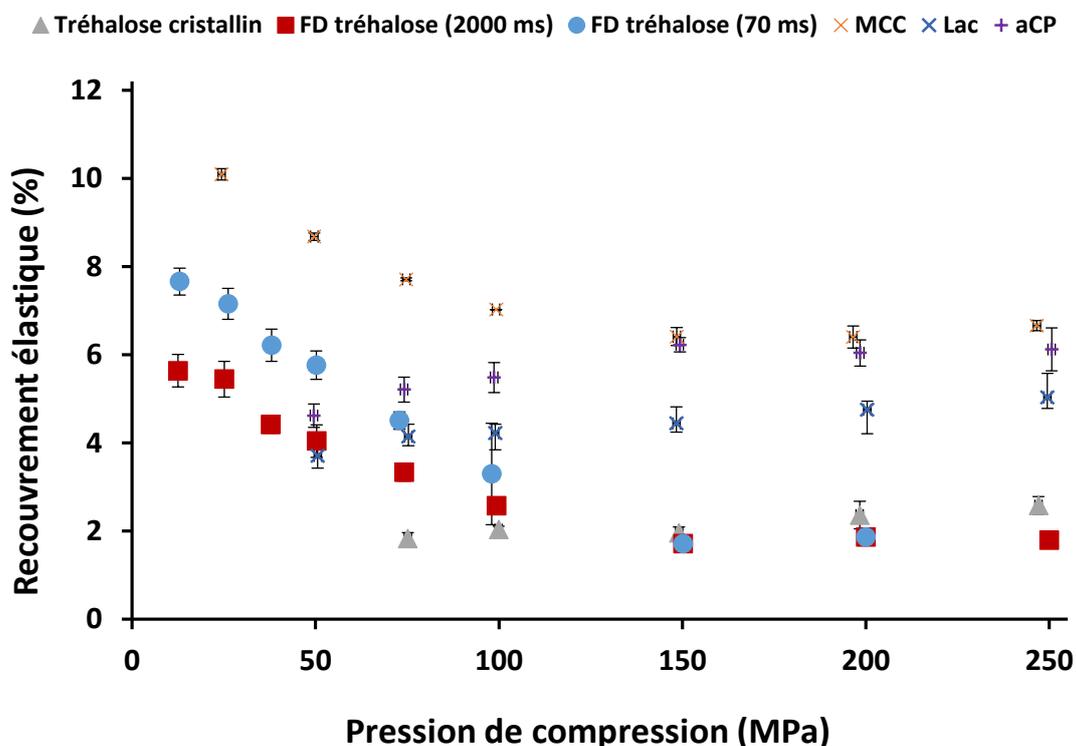


Figure 52 – Variation du pourcentage de recouvrement élastique en fonction de la pression de compression axiale appliquée pour les différents systèmes granulaires étudiés. Pour FD tréhalose, 2000 ms et 70 ms indiquent le temps du cycle de compression. Pour chaque pression de compression, chaque point correspond à la moyenne de trois mesures.

3.3.3.6 La viscoélasticité

Il est bien connu que les produits amorphes sont généralement susceptibles de présenter un comportement viscoélastique (Alcoutlabi and Martinez-Vega, 1999; Deshmukh et al., 2020). Afin de

vérifier ce comportement dans le cas du tréhalose lyophilisé, cette propriété a été étudiée sur des comprimés obtenus à 150 MPa en mesurant le rapport d'amortissement basé sur la technique d'excitation impulsionnelle (Meynard et al., 2021) puis comparée aux autres excipients. Les résultats obtenus sont représentés sur la **Figure 53**. Les comprimés de tréhalose cristallin, de Lac et d'aCP donnent des valeurs de viscoélasticité très semblables alors que le tréhalose lyophilisé a un comportement très similaire à celui de la MCC. Pour le tréhalose, cette augmentation de la viscoélasticité après lyophilisation peut être liée à l'amorphisation et pourrait aussi expliquer l'influence de la vitesse de compression sur la compressibilité et le recouvrement élastique du tréhalose lyophilisé.

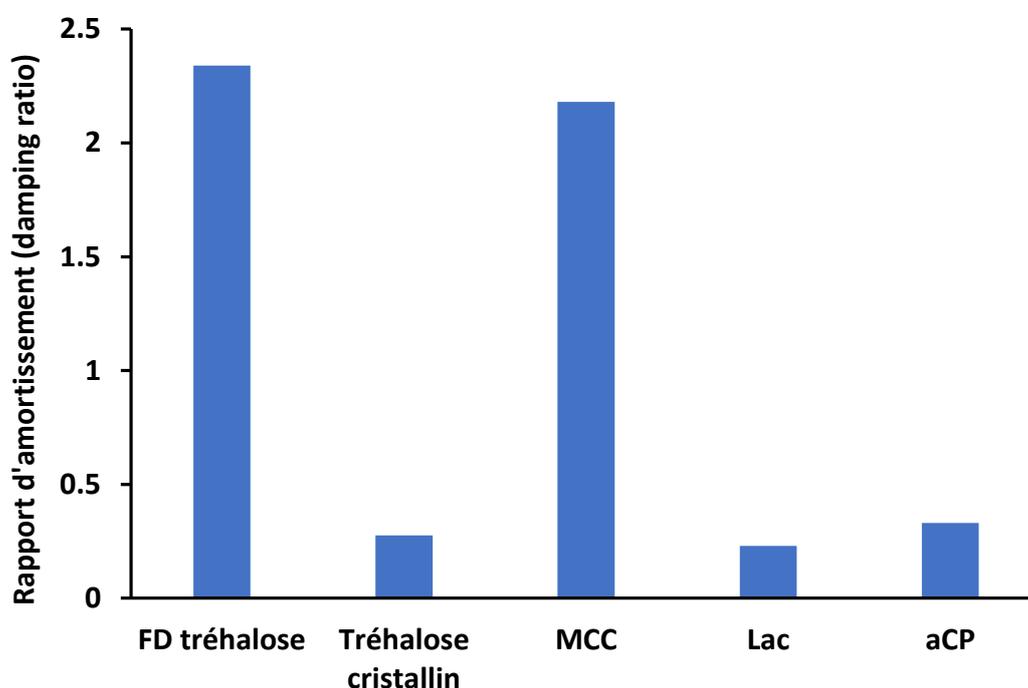


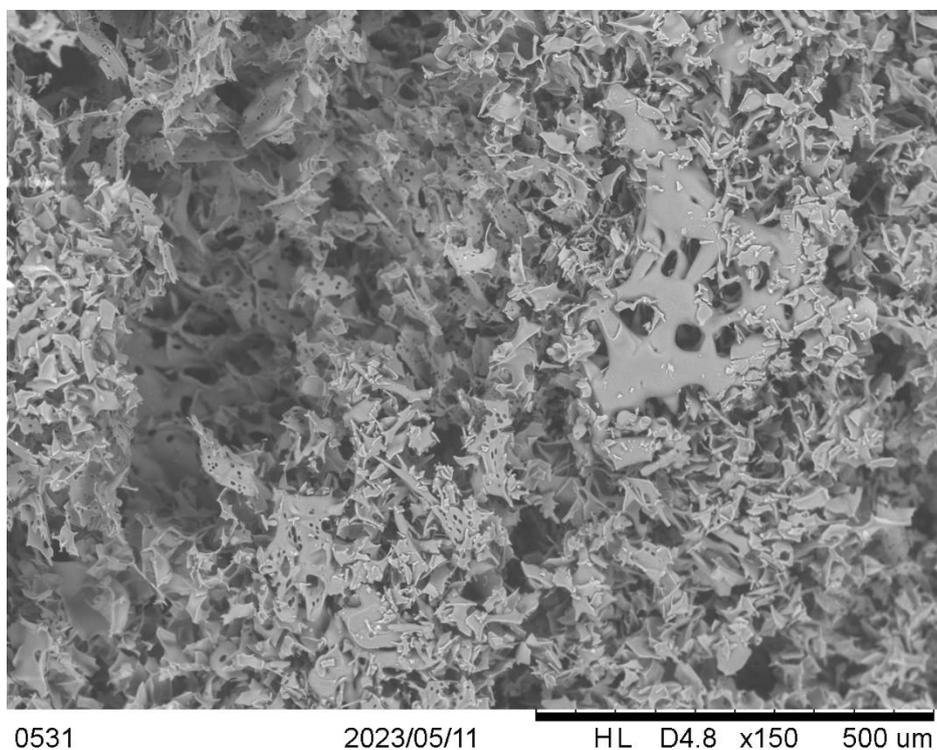
Figure 53 – Valeurs du rapport d'amortissement (damping ratio) déterminées sur des comprimés de tréhalose lyophilisé (FD tréhalose), de tréhalose cristallin, de MCC, de Lac et d'aCP (pression de compression de 150 MPa) au moyen de la technique d'excitation impulsionnelle.

3.3.4 Problèmes liés à la caractérisation du saccharose lyophilisé (FD saccharose)

L'étude du saccharose va être traitée dans cette partie de façon séparée, car cet excipient s'est avéré être difficile à manipuler sous sa forme lyophilisée, et que les résultats obtenus étaient dans la majorité compliqués à traiter. Le saccharose est comme le tréhalose, un sucre réducteur qui permet de conserver l'activité des protéines durant et après la lyophilisation (Kawai and Suzuki, 2007; Ohori et al., 2018). Pour cela nous avons décidé d'explorer ses propriétés mécaniques et physico-chimiques en compression.

Le saccharose lyophilisé a été obtenu dans les mêmes conditions que celles décrites pour le tréhalose lyophilisé. Toutes les caractérisations physico-chimiques et mécaniques réalisées sur le FD tréhalose ont été effectuées sur le FD saccharose.

Tout d'abord, la DRX a démontré que le FD saccharose est amorphe après lyophilisation. La titration de Karl Fischer a démontré que le FD saccharose avait une humidité résiduelle légèrement supérieure (2%) à celle du FD tréhalose (0,52%). Les analyses en DSC sur le FD saccharose montrent une T_g à 55 °C, ce qui est en concordance avec les valeurs de la littérature pour un taux d'humidité résiduel équivalent (Roe and Labuza, 2005). Les images en microscopie électronique à balayage ont donné des résultats équivalents à ceux du tréhalose lyophilisé (texture très poreuse en nid d'abeilles) (**Figure 54**).



*Figure 54 – Images de la structure interne du saccharose lyophilisé obtenues en MEB.
(Grossissement X150)*

Les résultats de mesures des masses volumiques pycnométriques montrent une masse volumique égale $1,493 \pm 0,03 \text{ g/cm}^3$ qui est identique à celle obtenue pour le FD tréhalose ($1,496 \pm 0,009 \text{ g.cm}^3$).

La caractérisation du comportement en compression du FD saccharose a été compliquée à réaliser en raison de problèmes de reproductibilité et de manipulation de la poudre. La poudre de FD saccharose étant très hygroscopique, l'absorption de l'eau était immédiate (5% m/m) dès l'ouverture

du flacon malgré des conditions de travail dans un environnement à l'humidité contrôlée à 35%. Les caractéristiques de la poudre évoluent très rapidement au cours de sa manipulation. Même si la quantité d'eau adsorbée par le FD saccharose était équivalente à celle du FD tréhalose après ouverture du flacon et compression, elle semble influencer beaucoup plus le comportement de la poudre pendant et après la compression. Les résultats de compressibilité en particulier se sont avérés non reproductibles d'une expérience à l'autre. Des difficultés ont également été rencontrées pour l'étude de la tablétabilité. Pendant le test de rupture, les comprimés s'écrasaient (se déformaient) irréversiblement sans détection d'une force de rupture. Il n'a pas non plus été possible de réaliser l'étude du BFI, car il était très difficile de perforer les comprimés. Pour les quelques comprimés qui ont pu être percés, les propriétés de la poudre au niveau du trou semblaient là encore rapidement évoluer, et le test de rupture n'était pas reproductible.

En se basant sur tous ces résultats, et même si le saccharose est considéré comme cryo- et lyoprotecteur, il a été décidé de l'exclure dans la suite de notre étude.

3.4 Conclusion

Dans ce chapitre, il a été démontré que le tréhalose lyophilisé est caractérisé par un comportement particulier et spécifique qui diffère de celui observé avec d'autres excipients pharmaceutiques classiquement utilisés en compression.

Les études de compressibilité et de tablétabilité ont montré que le tréhalose lyophilisé présente un comportement proche de celui de la MCC. Cependant, contrairement à la MCC dont les comprimés se comportent de manière ductile durant les tests de compression diamétrale, les comprimés de tréhalose lyophilisé présentent un caractère fragile très marqué qui est observé sur les courbes de rupture diamétrale (force/déplacement) et qui est confirmé par des valeurs de BFI très élevées par rapport aux autres excipients décrits dans la littérature. Le tréhalose lyophilisé se différencie également de la MCC par un recouvrement élastique après compression très faible (2%) pour des pressions de compression élevées.

Un élément important qui ressort de cette étude est la préservation de la structure amorphe du tréhalose lyophilisé après compression sur une large gamme de pressions de compression. L'obtention d'une structure amorphe étant recherchée pour garantir la préservation de l'activité biologique de biomolécules après lyophilisation, la conservation d'une structure amorphe après compression du tréhalose lyophilisé est encourageant dans l'objectif de formuler des comprimés contenant des biomolécules tout en conservant leur activité biologique.

Un autre résultat intéressant est la différence entre le comportement du tréhalose lyophilisé et celui du tréhalose cristallin. Il est probable que cette différence soit essentiellement liée à la nature amorphe du tréhalose lyophilisé ainsi qu'à sa microstructure spécifique. Cette hypothèse sera étudiée plus en détail dans le **Chapitre 4** qui aura pour objectif de comparer plusieurs excipients cristallins ou amorphes générés au moyen de différents procédés. Cette approche plus fondamentale nous permettra d'orienter le choix des excipients, les paramètres des procédés en lien avec les caractéristiques physico-chimiques et mécaniques des systèmes granulaires qui pourront par la suite contenir des biomolécules.

Cette étude est, à notre connaissance, la première étude qui présente l'évaluation du comportement en compression du tréhalose lyophilisé et qui montre la possibilité d'obtenir des comprimés cohésifs à de faibles pressions (25 à 50 MPa). Cela peut être d'un grand intérêt pour de futures applications avec des formulations qui contiennent des biomolécules, car une faible pression de compression impliquera une limitation du stress mécanique subit par les molécules biologiques.

Chapitre 4. Les propriétés en compression de différents excipients lyophilisés et atomisés dans les formulations pharmaceutiques

SOMMAIRE

4.1	Introduction.....	140
4.2	Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 4	142
4.3	Résultats et discussions	143
4.3.1	Caractérisations physico-chimiques des poudres lyophilisées.....	143
4.3.1.1	Détermination du taux d'humidité des lyophilisats	143
4.3.1.2	Diffraction des rayons X	143
4.3.1.3	Analyse thermique par DSC	143
4.3.1.4	Isothermes de sorption de l'eau par DVS	145
4.3.1.5	Imagerie en microscopie électronique à balayage.....	147
4.3.1.6	Détermination de la surface spécifique par adsorption gazeuse.....	147
4.3.1.7	Détermination de la masse volumique pycnométrique	148
4.3.2	Caractérisation physico-chimique des poudres atomisées.....	148
4.3.2.1	Détermination de l'humidité résiduelle.....	148
4.3.2.2	Diffraction des rayons X	148
4.3.2.3	Analyse thermique par DSC	149
4.3.2.4	Imagerie en microscopie électronique à balayage et distribution granulométrique par diffraction laser.....	149
4.3.2.5	Mesure de la masse volumique pycnométrique.....	150
4.3.2.6	Détermination de la surface spécifique par adsorption gazeuse.....	150
4.3.3	Caractérisation physico-chimique des poudres cristallines (CCP) et cristallines broyées (CCMP)	150
4.3.4	Caractérisations en compression des poudres étudiées	151
4.3.4.1	La compressibilité	152
4.3.4.2	Le recouvrement élastique	156
4.3.4.3	L'énergie plastique	157
4.3.4.4	La tablétabilité	158
4.3.4.5	Le Brittle Fracture Index (BFI)	163
4.3.4.6	La viscoélasticité	165
4.4	Conclusion	166

4.1 Introduction

Dans la partie précédente, nous avons montré que le tréhalose lyophilisé avait des propriétés en compression spécifiques. Pour expliquer ce comportement particulier, nous avons suggéré une influence de la texture du lyophilisat et de son état amorphe. Ce chapitre vise donc à approfondir l'étude du comportement en compression du tréhalose lyophilisé afin d'en comprendre la cause.

Les propriétés en compression des poudres dépendent de nombreux facteurs tels que la granulométrie ou la teneur en eau. Par exemple, Persson et al. ont démontré que la compressibilité et la tablétabilité augmentaient quand la taille des particules du lactose α -monohydrate diminuait (Persson et al., 2022). Dans une étude de Tomar et al. (Tomar et al., 2017) il a été démontré que la teneur en eau peut avoir une influence sur les propriétés physiques et chimiques des produits pendant la compression, et que pour obtenir des comprimés assez cohésifs, la température et l'humidité de l'environnement de compression devaient être maintenues dans des limites bien définies et spécifiques à chaque système granulaire. Puisque les excipients lyophilisés possèdent une forme et une taille de particules bien particulières ainsi qu'une humidité résiduelle faible, propre à chaque type de poudre, et qu'ils peuvent être cristallins ou amorphes, il est important de prendre en compte ces différentes caractéristiques pour l'étude de leur comportement en compression.

Dans la partie précédente, il a été démontré que le tréhalose lyophilisé était moins compressible que le tréhalose cristallin aux faibles pressions et plus compressible quand la pression augmentait (Hsein et al., 2023). Il a également été observé que des comprimés avec une contrainte de rupture élevée (1,5 MPa) pouvaient être obtenus à de faibles pressions de compression (25 MPa). De plus, nous avons observé expérimentalement pour les comprimés obtenus avec du tréhalose lyophilisé une tendance importante à la rupture fragile. Cette tendance a été confirmée par une valeur de BFI plus élevée comparativement à ce qui est reporté dans la littérature pour des excipients pharmaceutiques classiquement employés en compression (Hiestand et al., 1977; Hsein et al., 2023; Meynard et al., 2022a).

Pour tenir compte du changement de la structure physique et de la texture du tréhalose après lyophilisation, il a été choisi dans cette partie d'orienter l'étude sur une comparaison du comportement en compression de ce dernier avec d'autres excipients lyophilisés, atomisés ou cristallins.

Afin de comprendre l'impact de la structure physique sur les propriétés en compression des poudres lyophilisées, le lactose, amorphe après lyophilisation et le mannitol, cristallin même après lyophilisation ont été retenus. Dans une deuxième étape, l'obtention de systèmes granulaires de textures différentes a pour but de conclure quant à l'effet de la forme des particules de la poudre sur les propriétés en compression lorsque la structure physique reste inchangée. Ces trois excipients ont été atomisés pour produire du tréhalose et du lactose amorphes, et du mannitol cristallin mais avec

une forme de particules sphériques et les excipients natifs, sous forme cristalline ont été broyés pour modifier leur granulométrie.

Sur ces différents systèmes granulaires, les caractérisations suivantes ont donc été réalisées :

- 1) Caractérisations physico-chimiques des systèmes granulaires lyophilisé, atomisé, cristallin et cristallin broyé : détermination des isothermes de sorption par DVS, analyse de la structure physique par DRX, détermination des transitions de phase par DSC, titration Karl Fischer, analyse de la morphologie des particules en MEB et de leur granulométrie par granulométrie laser, détermination de la surface spécifique par adsorption gazeuse et mesure de la masse volumique vraie par pycnométrie.
- 2) Caractérisations en compression avec l'étude de la compressibilité, de la tablétabilité, la mesure de l'énergie plastique, la détermination du BFI, la détermination du recouvrement élastique et de la viscoélasticité.

Les résultats exposés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans the International Journal of Pharmaceutics sous le titre « Tableting behavior of freeze and spray-dried excipients in pharmaceutical formulations » (Madi et al., 2024) (cf. **annexes**).

4.2 Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 4

Les différents excipients caractérisés dans cette partie étaient le tréhalose cristallin (Biohale, Kyoto, Japon), le lactose cristallin (Supertab 30 Gr, BFE Pharma, Coch, Allemagne) et le mannitol cristallin (Cooper, Melun, France). Ces trois excipients ont été lyophilisés, atomisés ou broyés puis caractérisés. Dans la suite de cette partie, ces excipients seront nommés CCP (crystalline commercial powder) quand ils sont dans leur état brut, CCMP (crystalline commercial milled powder) après broyage, FD (freeze-dried) après lyophilisation ou SD (spray-dried) après atomisation.

Les systèmes granulaires lyophilisés ont été obtenus par la lyophilisation de 6 ml de solution à 5% m/v de chacun des trois excipients dans des flacons de verre de 20 ml, partiellement bouchés par des bouchons en caoutchouc et placés sur la même étagère du lyophilisateur. Tous les cycles de lyophilisation ont été réalisés dans des conditions de lyophilisation « agressives » telles que décrites dans le **Chapitre 2** (cf. paragraphe **2.2.1.1**).

Le contenu de chaque flacon a été utilisé pour produire un comprimé d'environ 250 mg. Le remplissage de la matrice a été effectué manuellement. Les comprimés ont été obtenus en utilisant des poinçons Euro B, ronds plats, de 10 mm de diamètres lubrifiés en externe par du stéarate de magnésium (Peter Greven, Bad Münstereifel, Nordrhein-Westfalen, Allemagne). Pour le cas particulier des mesures de BFI, des comprimés produits à l'aide de poinçons de 11 mm de diamètre avec méplat ont été utilisés.

Pour rappel, les produits testés, après mise en solution, ont été atomisés à une température d'entrée de 110 °C (cf. paragraphe **2.2.1.2**). Les CCMP ont été obtenus en broyant les CCP à l'aide du broyeur à bille (cf. paragraphe **2.2.1.3**). Toutes ces poudres obtenues, y compris les CCP, ont été introduites manuellement dans la matrice de compression.

4.3 Résultats et discussions

4.3.1 Caractérisations physico-chimiques des poudres lyophilisées

Après lyophilisation, les lyophilisats de tréhalose, lactose et mannitol étaient visuellement élégants, et ne montraient aucun signe d'effondrement. Il est important de noter que dans ce chapitre, les conditions de lyophilisation étaient celles du cycle « agressif » avec une température d'étagère au cours de la dessiccation primaire égale à 25 °C. Les caractérisations physico-chimiques des lyophilisats ont été réalisées avant l'étude en compression de ces derniers.

4.3.1.1 Détermination du taux d'humidité des lyophilisats

Le FD tréhalose et FD lactose contenaient respectivement $1,00 \pm 0,02\%$ et $1,00 \pm 0,05\%$ d'eau. Ces valeurs sont cohérentes avec celles habituellement recherchées pour des lyophilisats contenant des molécules biologiques puisqu'une teneur en eau autour de 1% est souvent requise pour la stabilisation des biomolécules (Schneid et al., 2011). La teneur en eau du mannitol lyophilisé n'a pas pu être déterminée à du fait de sa faible solubilité dans le méthanol et dans le milieu réactif utilisé pour le titrage Karl Fischer, mais il est attendu que celle-ci soit faible en raison de la faible hygroscopie du mannitol lyophilisé (Vanhoorne et al., 2020).

4.3.1.2 Diffraction des rayons X

Afin d'analyser l'organisation moléculaire (structure physique cristalline ou amorphe), des mesures par diffraction des rayons X ont été réalisées sur les échantillons de FD tréhalose, lactose et mannitol. Les diffractogrammes montrent que le FD tréhalose et le FD lactose sont totalement amorphes (**Figure 55 A et C**) alors que le FD mannitol reste cristallin même après lyophilisation (**Figure 55 E**). L'analyse des diffractogrammes du FD mannitol montre que les lyophilisats sont majoritairement formés du polymorphe β associé au polymorphe α .

4.3.1.3 Analyse thermique par DSC

L'analyse thermique par DSC a servi à consolider les résultats obtenus en diffraction des rayons X et a permis de déterminer la T_g des lyophilisats quand ces derniers étaient amorphes. Les thermogrammes du FD tréhalose et du FD lactose ont permis de visualiser dans les deux cas une T_g alors que le thermogramme du FD mannitol présentait un pic de fusion à 166,5 °C. Les valeurs expérimentales de T_g obtenues pour le FD tréhalose et le FD lactose sont respectivement de $100 \pm 1,5$ °C et $96 \pm 0,9$ °C (**Tableau 11**). La littérature montre que les T_g du tréhalose et du lactose amorphes et secs s'élèvent à 120 °C et 107 °C respectivement (Haque and Roos, 2006; Roe and

Labuza, 2005). Sachant que la T_g diminue quand la teneur en eau de l'échantillon augmente (Haque and Roos, 2006; Roe and Labuza, 2005), les valeurs de T_g déterminées sur nos lyophilisats sont en adéquation avec les valeurs reportées dans la bibliographie pour des teneurs en eau équivalentes (Haque and Roos, 2006; Roe and Labuza, 2005).

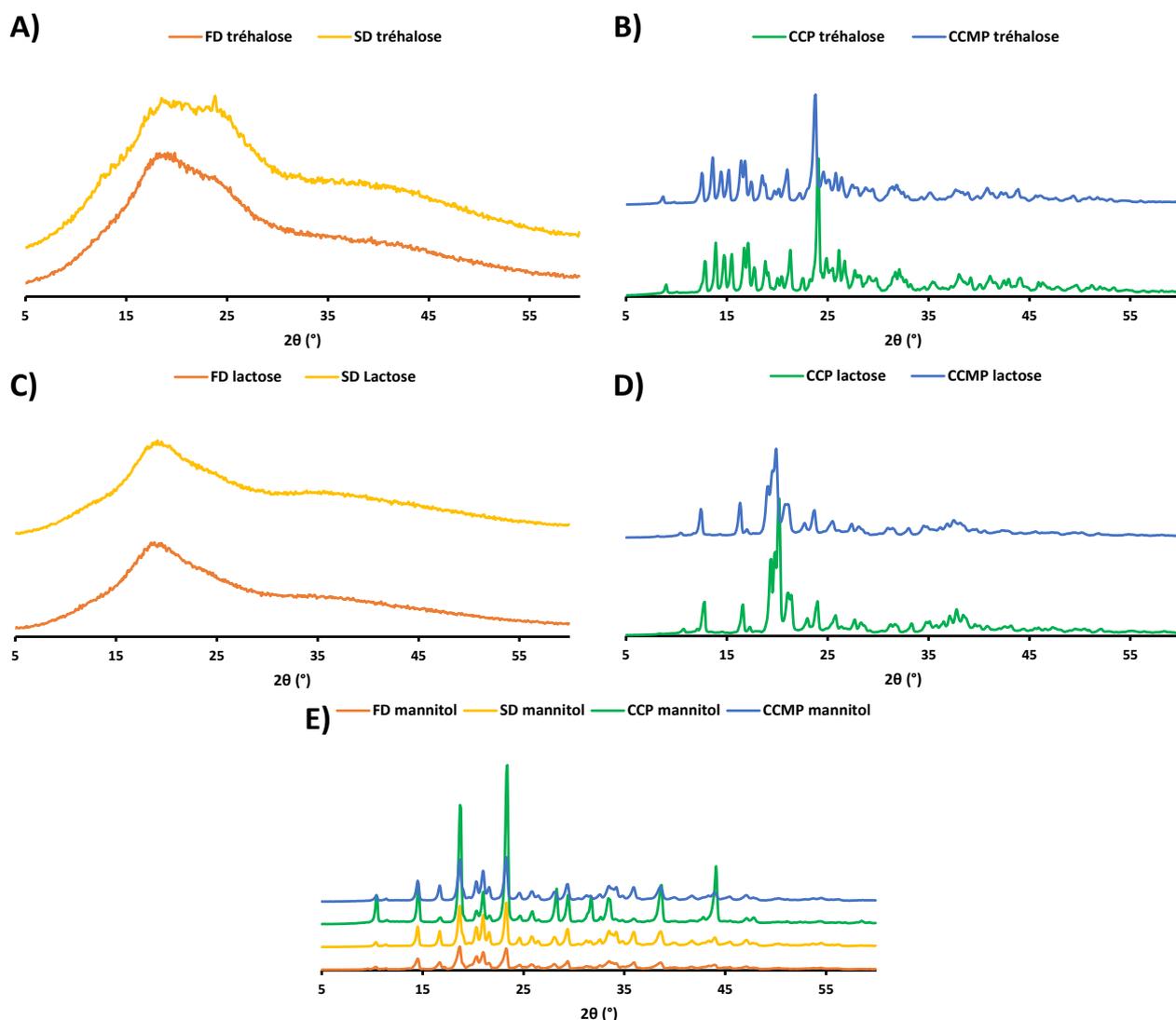


Figure 55 – Diffractogrammes des excipients sous les différentes formes étudiées : cristallin (CCP), cristallin broyé (CCMP), lyophilisé (FD) et atomisé (SD). (A) tréhalose lyophilisé et atomisé ; (B) tréhalose cristallin et cristallin broyé ; (C) lactose lyophilisé et atomisé ; (D) lactose cristallin et cristallin broyé ; (E) mannitol lyophilisé, atomisé, cristallin et cristallin broyé.

Tableau 11 – Caractérisations physico-chimiques des trois excipients étudiés. (FD : lyophilisé, SD : atomisé, CCP : cristallin, CCMP : cristallin broyé)

Excipient	T_g Expérimental (°C)	Teneur en eau (%)	Masse volumique pycnométrique (g/cm ³)	Surface spécifique (m ² /g)	Structure physique (DRX)	Granulométrie $D_v(50)$ (µm)
FD tréhalose	100,0 ± 1,5	1,0 ± 0,02	1,45 ± 0,020	0,95 ± 0,060	Amorphe	-
FD lactose	96,0 ± 0,9	1,0 ± 0,05	1,39 ± 0,008	1,06 ± 0,018	Amorphe	-
FD Mannitol			1,49 ± 0,010	2,78 ± 0,084	Cristallin	-
SD tréhalose	65,0 ± 2,7	4,0 ± 0,6	1,51 ± 0,002	1,39 ± 0,037	Amorphe	4,2
SD lactose	69,0 ± 0,2	5,0 ± 0,3	1,51 ± 0,006	1,16 ± 0,042	Amorphe	5,2
SD Mannitol	-	-	1,43 ± 0,011	2,37 ± 0,074	Cristallin	3,5
Tréhalose CCP	-	-	1,51 ± 0,004	1,64 ± 0,231	Cristallin	285
Lactose CCP	-	-	1,53 ± 0,0003	0,45 ± 0,099	Cristallin	100
Mannitol CCP	-	-	1,49 ± 0,001	0,23 ± 0,058	Cristallin	69,6
Tréhalose CCMP	-	-	1,53 ± 0,0008	3,63 ± 0,287	Cristallin	6,3
Lactose CCMP	-	-	1,55 ± 0,001	3,39 ± 0,090	Cristallin	6,8
Mannitol CCMP	-	-	1,50 ± 0,0006	3,57 ± 0,280	Cristallin	5,2

4.3.1.4 Isothermes de sorption de l'eau par DVS

Dans cette partie, les analyses par DVS ont été réalisées sur le FD lactose et le FD mannitol dans le but d'anticiper sur la manipulation de ces poudres au moment de la mise en forme par compression dans des conditions de température et d'humidité contrôlées à des valeurs de 25 °C et 35% respectivement. Les analyses ont été réalisées sur des lyophilisats de 270 mg de lactose et 300 mg de mannitol (un flacon de lyophilisation) à une température de 25 °C et à des humidités relatives variant entre 0 et 100% avec des pas de 5%. Pour chaque taux d'humidité relative, le temps d'équilibration a été fixé à 13 heures.

Les isothermes de sorption de la vapeur d'eau pour les deux excipients lyophilisés (FD lactose et FD mannitol) sont représentés sur la **Figure 56**. L'isotherme de sorption du FD tréhalose a été traité dans la partie précédente (cf. paragraphe **3.3.1.5**)

L'isotherme de sorption de l'eau obtenu pour le FD lactose est différent de celui obtenu pour le tréhalose lyophilisé (cf. paragraphe **3.3.1.5**). Entre 0 et 40% d'humidité relative, la variation de masse n'est que de quelques pourcents (1,2 % à 30% d'humidité relative et 2,5 % à 40% d'humidité relative). Au-delà de 40% d'humidité relative, un pic d'absorption d'eau est observé, puis le système retombe à une humidité de produit très faible. Ce phénomène peut être expliqué par la cristallisation du lactose amorphe lorsque l'humidité relative atteint environ 45 %. Ce résultat est en concordance avec celui montré par Omar et Roos (Omar and Roos, 2007). Il est donc important de maintenir dans le box de compression une humidité relative inférieure à 40% afin de conserver le lactose lyophilisé à l'état amorphe pendant toutes les étapes du procédé de compression.

L'isotherme de sorption du FD mannitol, cristallin après lyophilisation, montre une variation de masse d'environ 0,2 % jusqu'à des humidités relatives de 80 %. Ce n'est qu'à partir de 80% HR que la quantité d'eau adsorbée augmente, tout en restant modérée, pour atteindre une variation de masse de 1,6% à une humidité relative de 95 %.

D'après ces résultats, il apparaît donc que dans les conditions de manipulation des poudres lyophilisées (environnement régulé entre 30 et 40 % d'humidité relative), la variation de masse des lyophilisats due à une absorption de vapeur d'eau est limitée. La structure physique des excipients ne risque donc pas d'évoluer au cours de la préparation avant leur compression. Les mesures d'humidité résiduelle, de DSC et DRX sur les comprimés obtenus ont confirmé ces résultats.

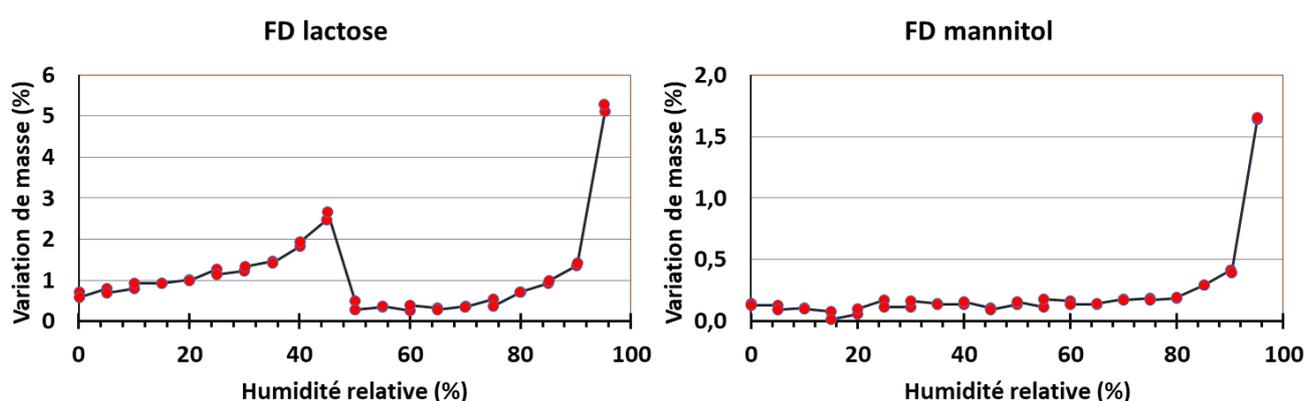


Figure 56 – Isothermes de sorption de la vapeur d'eau pour les systèmes granulaires lyophilisés (FD lactose et FD mannitol).

4.3.1.5 Imagerie en microscopie électronique à balayage

Les structures internes et de surface des lyophilisats ont été visualisées en microscopie électronique à balayage. La surface des lyophilisats de tréhalose (**Figure 57 A**) et de lactose (**Figure 57 B**) présente une texture en nid d'abeilles ainsi que des tailles de pores similaires. Le FD mannitol présente une texture différente avec une surface relativement lisse et moins de pores (**Figure 57 C**). Les images de la structure interne du FD tréhalose et du FD lactose montrent que la structure en nid d'abeilles est développée sur toute la profondeur du cake (**Figure 57 D et E**). Dans le cas du FD mannitol, une légère différence de texture caractérisée par des feuillets plus irréguliers est visualisée. Ces différences de textures peuvent être liées au fait que le tréhalose et le lactose sont amorphes après lyophilisation alors que le mannitol reste cristallin.

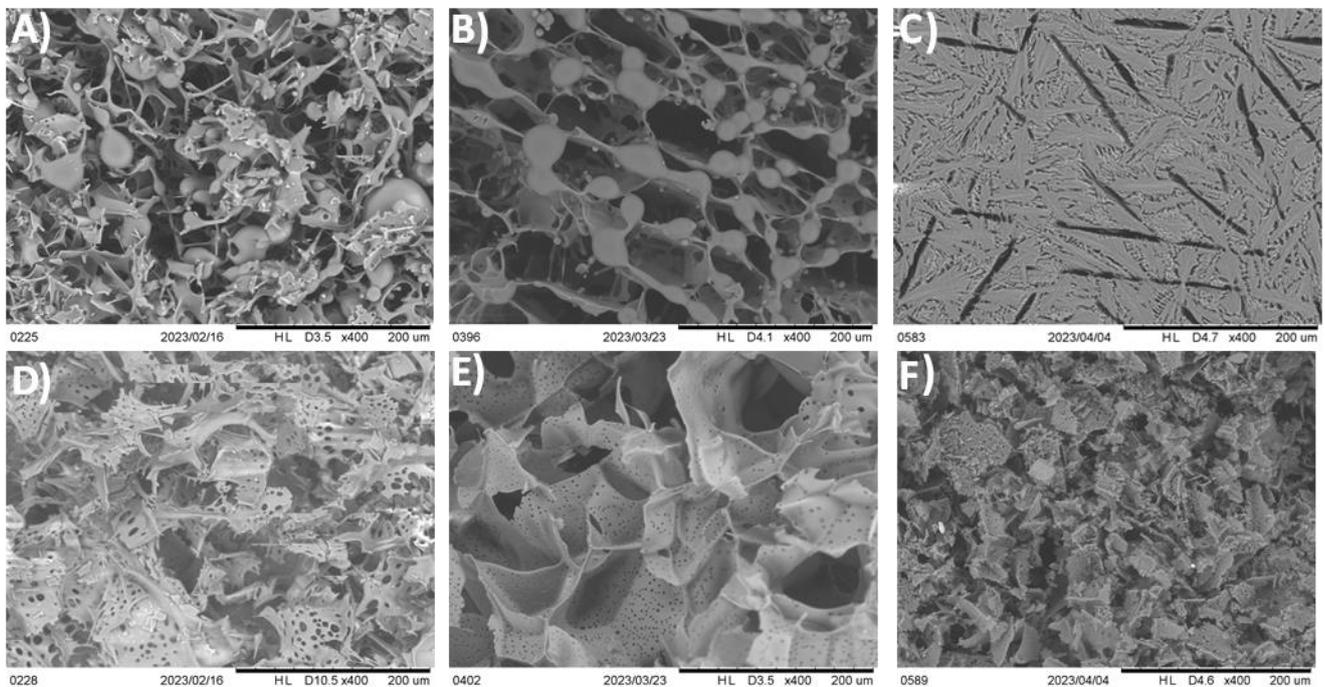


Figure 57 – Images MEB du FD tréhalose (A et D), du FD lactose (B et E) et du FD mannitol (C et F). A, B et C : images de la surface des lyophilisats ; D, E et F : images internes des lyophilisats. (Grossissement x400)

4.3.1.6 Détermination de la surface spécifique par adsorption gazeuse

Les résultats des mesures de surface spécifique des différents excipients sont représentés dans le **Tableau 11**. Rambhatla et al. ont démontré que la surface spécifique peut changer en fonction du paramétrage du cycle de lyophilisation et plus particulièrement selon la température de nucléation durant l'étape de congélation (Rambhatla et al., 2004). Leur étude montre que le mannitol lyophilisé présentait une surface spécifique plus élevée que celle du saccharose lyophilisé. Dans les conditions

choisies pour notre cycle de lyophilisation, le FD tréhalose est caractérisé par une surface spécifique similaire à celle du FD lactose (respectivement $0,952 \pm 0,060 \text{ m}^2/\text{g}$ et $1,060 \pm 0,018 \text{ m}^2/\text{g}$), alors que le FD mannitol présente une surface spécifique plus élevée ($2,780 \pm 0,084 \text{ m}^2/\text{g}$) (**Tableau 11**), ce qui est concordant avec les travaux de Rambhalta.

4.3.1.7 Détermination de la masse volumique pycnométrique

Les masses volumiques pycnométriques du FD tréhalose et du FD lactose (respectivement $1,45 \pm 0,02$ et $1,39 \pm 0,008 \text{ g}/\text{cm}^3$) sont plus faibles que celles obtenues pour les formes cristallines (tréhalose CCP : $1,51 \pm 0,004 \text{ g}/\text{cm}^3$ et lactose CCP : $1,53 \pm 0,0008 \text{ g}/\text{cm}^3$) (**Tableau 11**). C'est un résultat attendu puisque la masse volumique vraie d'un matériau diminue après amorphisation (Bookwala et al., 2020; Bourduche et al., 2020). Contrairement au tréhalose et au lactose lyophilisés, la masse volumique pycnométrique du FD mannitol (qui est cristallin après lyophilisation) est restée similaire à celle du mannitol cristallin (CCP).

4.3.2 Caractérisation physico-chimique des poudres atomisées

Pour les trois excipients atomisés, $T_{\text{entrée}}$ et T_{sortie} ont été fixées à $110 \text{ }^\circ\text{C}$ et $60 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivement. Les rendements d'obtention des poudres de SD tréhalose et de SD lactose étaient aux alentours de 50% alors que celui du mannitol était plus élevé (80%). Les mêmes caractérisations que celles effectuées sur les lyophilisats ont été réalisées sur les poudres atomisées à l'exception de la DVS.

4.3.2.1 Détermination de l'humidité résiduelle

Les poudres atomisées se caractérisent par une humidité résiduelle plus élevée que les poudres lyophilisées avec une valeur de $4,0 \pm 0,6 \%$ pour le SD tréhalose et $5,0 \pm 0,3 \%$ pour le SD lactose. Le mannitol cristallin est connu comme étant non hygroscopique et en raison de son insolubilité dans le méthanol et le milieu réactif utilisé pour le titrage Karl Fischer, l'humidité résiduelle n'a pas pu être mesurée.

4.3.2.2 Diffraction des rayons X

Le diffractogramme représenté sur la **Figure 55 A**, montre que le SD tréhalose est majoritairement amorphe. Il est possible de noter également la présence d'un seul petit pic à $2\theta = 23,8^\circ$ qui correspond au pic le plus intense visualisé sur le diffractogramme du tréhalose cristallin (Megarry et al., 2011). Le diffractogramme du SD lactose montre qu'il est complètement amorphe juste après atomisation

(**Figure 55 C**). Le mannitol est totalement cristallin après atomisation (**Figure 55 E**), et les pics de cristallisation correspondent à ceux du polymorphe β (Cares-Pacheco et al., 2014).

4.3.2.3 Analyse thermique par DSC

Les mesures par DSC ont montré que le SD tréhalose et le SD lactose avaient une T_g inférieure (respectivement $65 \pm 2,7$ °C et $69 \pm 0,2$ °C) à celle des excipients lyophilisés ($100 \pm 1,5$ °C pour le FD tréhalose et $96 \pm 0,9$ °C pour le FD lactose) (**Tableau 11**). Les teneurs en eau des poudres atomisées étant supérieures à celles des lyophilisats, ce résultat est attendu et les valeurs sont concordantes avec celles de la littérature, à la même teneur en humidité résiduelle (Haque and Roos, 2006; Roe and Labuza, 2005). Pour le SD mannitol un pic de fusion a été détecté à 166,5 °C, ce qui correspond à la température de fusion du polymorphe β .

4.3.2.4 Imagerie en microscopie électronique à balayage et distribution granulométrique par diffraction laser

La morphologie des poudres atomisées ainsi que leur distribution de taille (**Figure 58**) ont été évaluées par microscopie électronique à balayage (**Figure 59**) et par diffraction laser (**Tableau 11**).

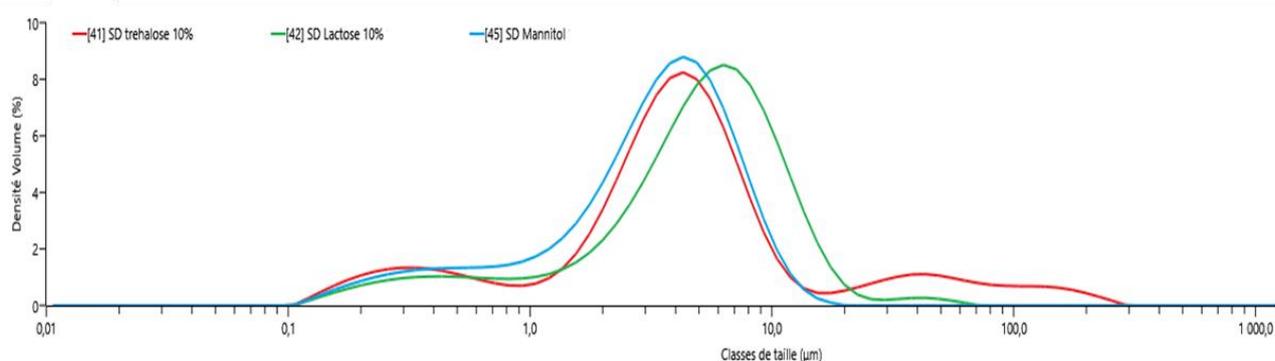


Figure 58 – Représentation des distributions de taille granulométrique du SD tréhalose, SD lactose et SD mannitol.

Les trois excipients atomisés présentent la même morphologie sphérique avec une taille de particules allant de 1 µm à 10 µm et une taille moyenne comprise entre 3 et 6 µm (**Figure 59**). Le diamètre médian (D_{50}) est respectivement de 4,2 µm, 5,2 µm et 3,5 µm pour le SD tréhalose, le SD lactose et le SD mannitol.

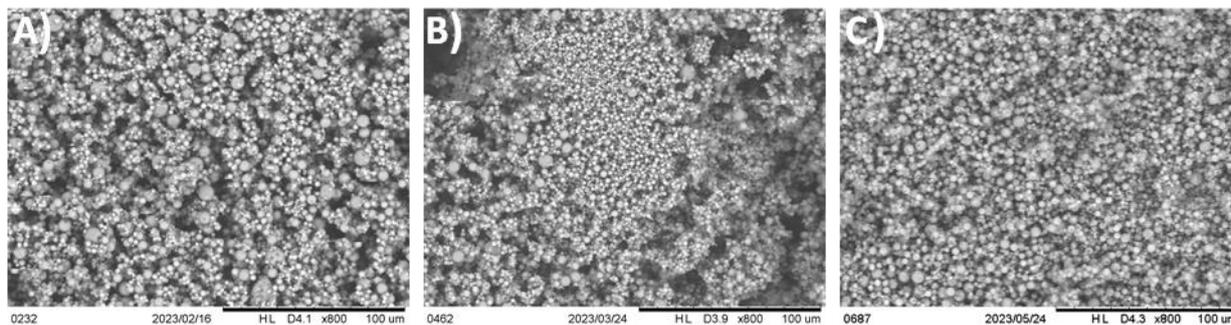


Figure 59 – Images en microscopie électronique à balayage du SD tréhalose (A), du SD lactose (B) et du SD mannitol (C). (Grossissement x800)

4.3.2.5 Mesure de la masse volumique pycnométrique

Les résultats des mesures en pycnométrie à gaz montrent des valeurs de masse volumique plus élevées pour le SD tréhalose et le SD lactose (respectivement $1,51 \pm 0,002$ et $1,51 \pm 0,006$ g/cm³) que les poudres lyophilisées ($1,45 \pm 0,02$ pour le FD tréhalose et $1,39 \pm 0,008$ g/cm³ pour le FD lactose). Le SD mannitol a quant à lui, une valeur de masse volumique plus faible ($1,43 \pm 0,011$ g/cm³) que celle du FD mannitol ($1,49 \pm 0,01$ g/cm³) (**Tableau 11**). Ces résultats peuvent être liés à la différence de structure physique entre le mannitol lyophilisé et atomisé.

4.3.2.6 Détermination de la surface spécifique par adsorption gazeuse

La même tendance que celle observée pour les poudres lyophilisées a été retrouvée pour les poudres atomisées. Les atomisât de tréhalose et de lactose ont une surface spécifique (respectivement $1,390 \pm 0,037$ et $1,160 \pm 0,042$ m²/g) qui est beaucoup plus faible que celle du SD mannitol cristallin ($2,370 \pm 0,074$ m²/g). En plus, il apparaît que la surface spécifique du FD tréhalose, FD lactose et FD mannitol (respectivement $0,95 \pm 0,06$, $1,06 \pm 0,018$ et $2,78 \pm 0,084$) est dans le même ordre de grandeur que celle des poudres atomisées, et aucune tendance particulière n'est observée.

4.3.3 Caractérisation physico-chimique des poudres cristallines (CCP) et cristallines broyées (CCMP)

La distribution granulométrique (**Tableau 11**) et les images MEB (**Figure 60**), montrent que le broyage a bien diminué la taille des particules ($D_v(50) = 285, 100$ et $69,6$ μm respectivement pour le tréhalose, lactose et mannitol CCP alors que $D_v(50) = 6,3, 6,8$ et $5,2$ μm respectivement pour le tréhalose, lactose et mannitol CCMP). Le **Tableau 11** montre, comme attendu par effet de taille des particules, que la surface spécifique augmente après broyage.

Le broyage des poudres cristallines a été réalisé dans le seul but de changer leur texture tout en préservant leur structure cristalline, afin d'évaluer l'impact de la texture sur les propriétés des poudres en compression. Toutes les poudres cristallines ont donc été analysées par DRX et DSC. La DSC a été réalisée dans le but de s'assurer que le broyage n'a pas entraîné une amorphisation partielle ou totale des poudres cristallines. Les résultats de la DSC montrent qu'en effet, aucune T_g n'a été détectée et que la température de fusion caractéristique de chaque polymorphe est restée inchangée. De plus, les mesures DRX ont été réalisées pour s'assurer que le broyage n'avait pas induit de changement de polymorphes cristallins. Les diffractogrammes de tous les excipients broyés montrent effectivement qu'aucune modification polymorphique n'a été détectée après broyage, du fait de la superposition des pics des poudres broyées avec les poudres cristallines (**Figure 55 B, D et E**).

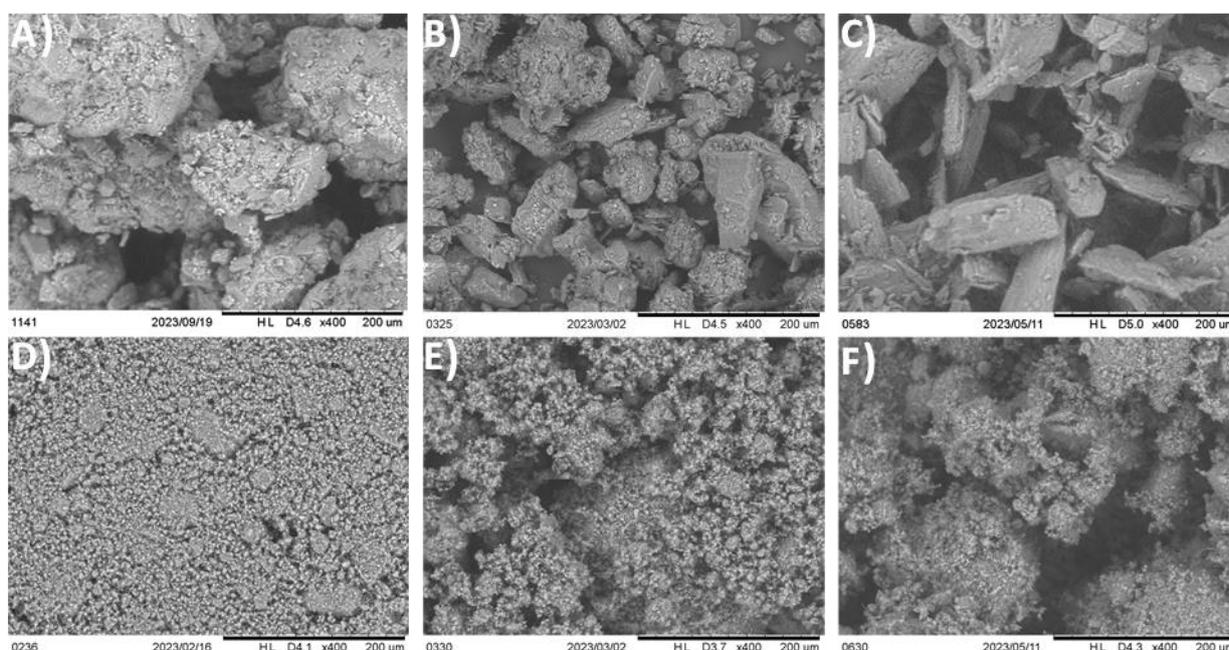


Figure 60 – Imageries MEB du CCP tréhalose, lactose et mannitol (respectivement A, B et C) et du CCMP tréhalose, lactose et mannitol (respectivement D, E et F). (Grossissement x400)

4.3.4 Caractérisations en compression des poudres étudiées

L'analyse des propriétés physico-chimique décrites ci-dessus vise à nous aider dans l'interprétation des résultats obtenus lors de la caractérisation du comportement en compression, car un comportement spécifique en compression peut être relié à une caractéristique physico-chimique de la poudre étudiée.

4.3.4.1 La compressibilité

Le comportement en compression de toutes les poudres a d'abord été étudié en analysant leurs courbes de compressibilité qui représentent l'évolution de la porosité « in-die » en fonction de la pression appliquée (**Figure 61**). Sachant que l'humidité résiduelle peut influencer le comportement en compression (Elkhider et al., 2007), et le FD tréhalose et lactose étant hygroscopiques, la compression des lyophilisats a été réalisée rapidement après l'ouverture des flacons, dans une pièce dont l'humidité relative était réglée à 30 – 40 %. Les poudres CCP (cristallin) et CCMP (cristallin broyé) ont été comprimées dans les mêmes conditions.

La **Figure 61** montre que les profils de compressibilité du FD tréhalose et du FD lactose présentent des porosités négatives aux hautes pressions. Il existe deux phénomènes essentiels qui peuvent expliquer ces résultats comme cela a déjà été argumenté au **Chapitre 3**, paragraphe **3.3.3.1**.

Les profils de compressibilité du FD tréhalose et du FD lactose semblent avoir une représentation essentiellement similaire. Comme le montre la **Figure 61 A et B**, à faible pression (jusqu'à environ 50 MPa), les porosités « in-die » du FD tréhalose et du FD lactose sont plus élevées que celles des poudres SD, CCP et CCMP. Par contre, à des pressions plus élevées que 50 MPa, ces poudres lyophilisées ont des porosités « in-die » qui deviennent inférieures à celles des autres poudres. Le FD mannitol semble avoir un comportement différent de celui des 2 autres produits lyophilisés puisque sa porosité « in-die » n'est jamais inférieure à celle des autres poudres et n'atteint jamais des valeurs négatives (**Figure 61 C**).

Les profils de compressibilité des trois poudres atomisées semblent être similaires et diffèrent clairement de ceux de toutes les autres poudres. La **Figure 61 A, B et C** montre que la porosité de toutes les poudres atomisées (SD) chute rapidement à très faible pression (quelques mégapascals) jusqu'à atteindre approximativement 40% avant un changement de pente. A pression maximale, la porosité des poudres SD est plus élevée que celle des poudres FD pour le tréhalose et le lactose, mais pas pour le mannitol. Il est décrit dans la littérature que la morphologie et les propriétés mécaniques des poudres atomisées dépendent de la température de l'air de sortie au cours du procédé d'atomisation (Littringer et al., 2013). Dans le cas de notre étude, la température de l'air de sortie durant l'atomisation était faible (67 °C), ce qui a abouti à la formation de particule sphériques, rugueuses et creuses avec de l'air emprisonné à l'intérieur. De plus, l'humidité résiduelle dans la poudre SD est plus élevée que celle de la poudre lyophilisée ou cristalline. Les différences de texture et de teneur en eau (l'eau est un plastifiant) peuvent expliquer une différence de comportement des poudres SD durant la compression.

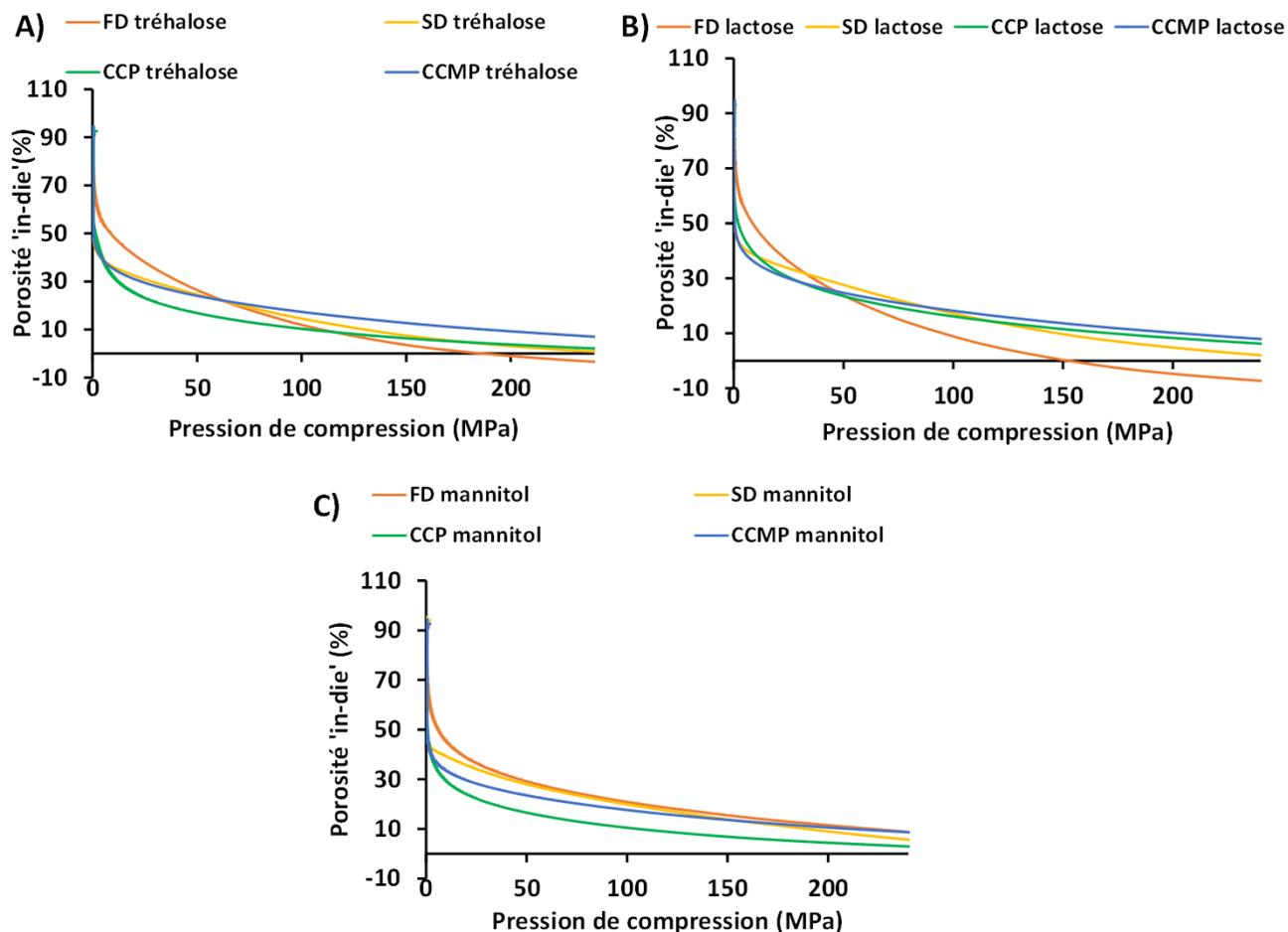


Figure 61 – Profils de compressibilité « in-die » des poudres FD, SD, CCP et CCMP (FD : lyophilisé, SD : atomisé, CCP : cristallin, CCMP : cristallin broyé).

En comparant les profils de compressibilité des poudres CCP et CCMP, il apparaît que les poudres CCP ont toujours des porosités « in-die » inférieures aux porosités des poudres CCMP. Ce résultat est cohérent avec la littérature (Persson et al., 2022). Ce phénomène est un peu moins marqué pour le lactose. Ces résultats peuvent être expliqués par une taille de particules plus petites dans le cas des poudres CCMP qui induit plus d'interactions entre les particules, plus de cohésion et donc plus de résistance à la compression entraînant une porosité « in-die » plus élevée.

Tous ces résultats montrent que les profils de compressibilité sont fortement impactés par la texture des poudres mais aussi par leur structure physique. En effet, comme attendu pour toutes les poudres testées, quand la texture change, le profil de compressibilité change également. De plus, les résultats obtenus montrent que quand les poudres lyophilisées ou atomisées sont amorphes, des profils de compressibilité particuliers sont obtenus en comparaison avec les poudres cristallines, même si ces dernières sont obtenues par différents procédés de séchage.

Afin de comprendre les phénomènes mis en jeu, des images en microscopie électronique à balayage sur des comprimés ont été réalisées. Aux faibles pressions (12,5 à 75 MPa), les images de la surface des comprimés des poudres lyophilisées et atomisées montrent que la morphologie des particules (particules sphériques pour les poudres atomisées et feuillets orientés aléatoirement pour les poudres lyophilisées) ainsi qu'une forte porosité sont conservées (**Figure 62 A, C, E et G**). Quand la pression augmente, les particules commencent à perdre leur forme initiale pour former des surfaces plus lisses avec moins de porosité. A la pression maximale de 250 MPa, les pores de surface disparaissent presque complètement (**Figure 62 B, D, F et H**). Un résultat identique (conservation de la morphologie initiale aux faibles pressions et disparition de la porosité de surface aux fortes pressions) a été observé dans le cas des poudres CCP et CCMP après compression.

De plus, comme démontré dans l'étude précédente présentée au **Chapitre 3**, le FD tréhalose possède un profil de compressibilité spécifique et différent de celui du tréhalose cristallin (Hsein et al., 2023). Notre étude montre que le FD lactose, amorphe comme le tréhalose lyophilisé présente un comportement identique à ce dernier alors que ce n'est pas le cas pour le FD mannitol qui reste cristallin après lyophilisation. Ces résultats permettent de montrer que les comportements particuliers sous compression du FD tréhalose et du FD lactose sont étroitement liés à la structure amorphe de ces poudres. La lyophilisation, l'atomisation ou le broyage des excipients entraînent un changement de leur structure physique, de leur texture ou des deux combinées et le profil de compressibilité de chaque excipient change également. Cette modification du profil de compressibilité est clairement liée à la fois à la texture et à la structure physique des poudres.

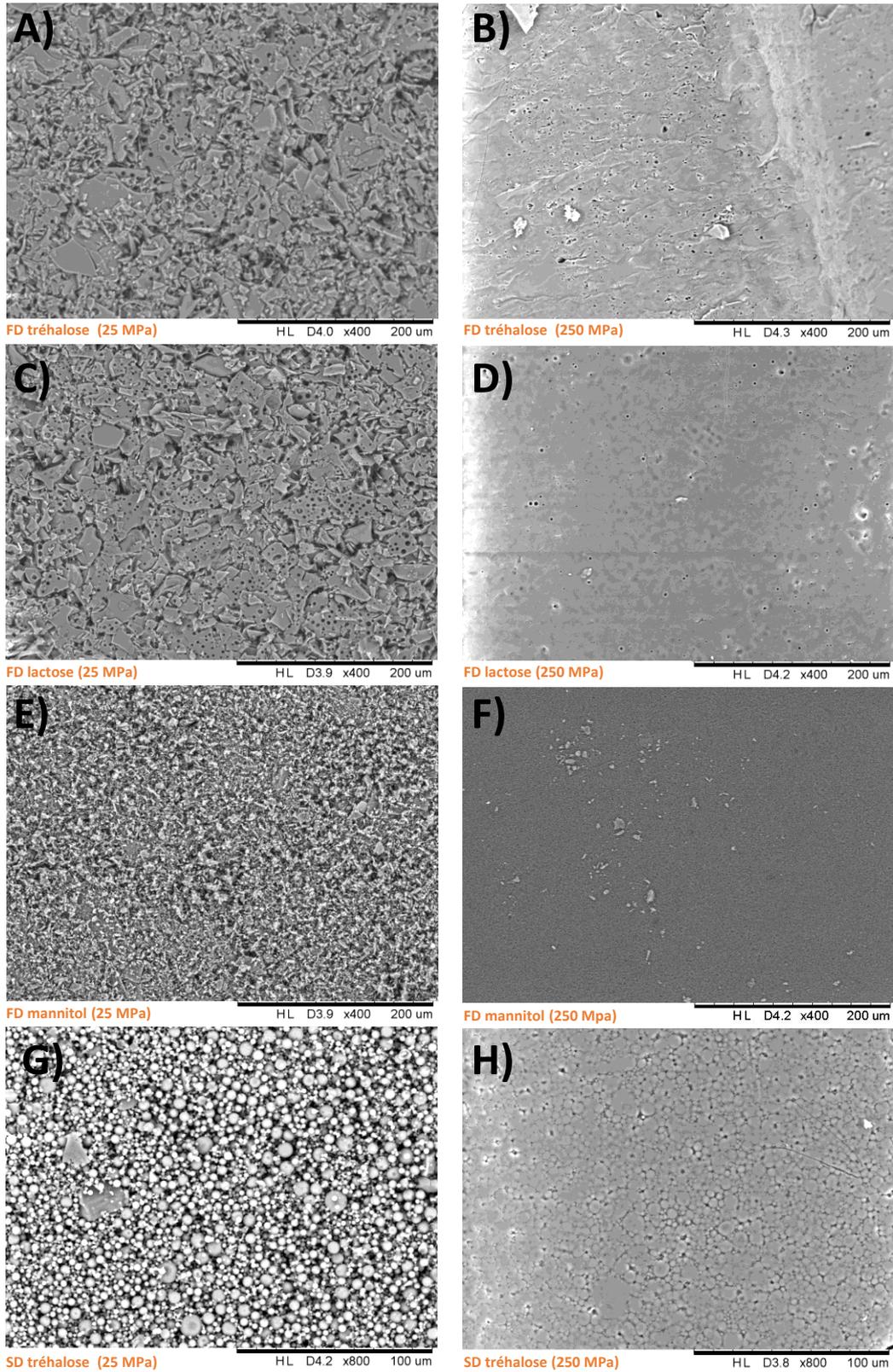


Figure 62 – Images MEB de la surface des comprimés de tréhalose, lactose et mannitol lyophilisés (FD) et atomisés (SD) à 25 et 250 MPa. (Grossissement x400 (A-F), x800 (G, H))

4.3.4.2 Le recouvrement élastique

Le recouvrement élastique est une propriété importante à considérer dans l'étude des comprimés. La **Figure 63** représente les profils d'évolution du pourcentage de recouvrement élastique en fonction de la pression de compression appliquée pour toutes les poudres de tréhalose, lactose et mannitol. Nous avons montré au **Chapitre 3** que le FD tréhalose avait un recouvrement élastique spécifique et différent de celui du tréhalose cristallin (Hsein et al., 2023). C'est ce que montrent également nos résultats dans cette partie. A faible pression, le FD tréhalose a le recouvrement élastique le plus élevé, puis quand la pression appliquée augmente, il diminue graduellement, jusqu'à une pression de 100 MPa pour se stabiliser et devenir indépendant de la pression. Les profils de recouvrement élastique sont différents pour le tréhalose cristallin (CCP et CCMP) puisqu'une augmentation de la pression de compression entraîne une légère augmentation du recouvrement élastique avant qu'il ne se stabilise et devienne indépendant de la pression. Le FD lactose, SD tréhalose et SD lactose présentent le même comportement que le FD tréhalose (recouvrement élastique le plus élevé aux faibles pressions et diminution graduelle quand la pression augmente). Par contre, ce comportement est un peu moins marqué pour le FD et le SD mannitol. Ce résultat indique que même si une poudre est amorphe ou cristalline, c'est la texture spécifique de la poudre atomisée (particules sphériques) ou lyophilisée (feuilletés lisses) qui est responsable d'un tel comportement (**Figure 63 A, B et C**).

Concernant les poudres CCP et CCMP, le lactose et le mannitol montrent un comportement similaire à celui du tréhalose natif. Un point intéressant est qu'après broyage, toutes les poudres cristallines broyées ont un recouvrement élastique plus faible que les poudres cristallines natives quelle que soit la pression de compression appliquée. Il y a donc une relation entre la granulométrie de la poudre et le recouvrement élastique des comprimés.

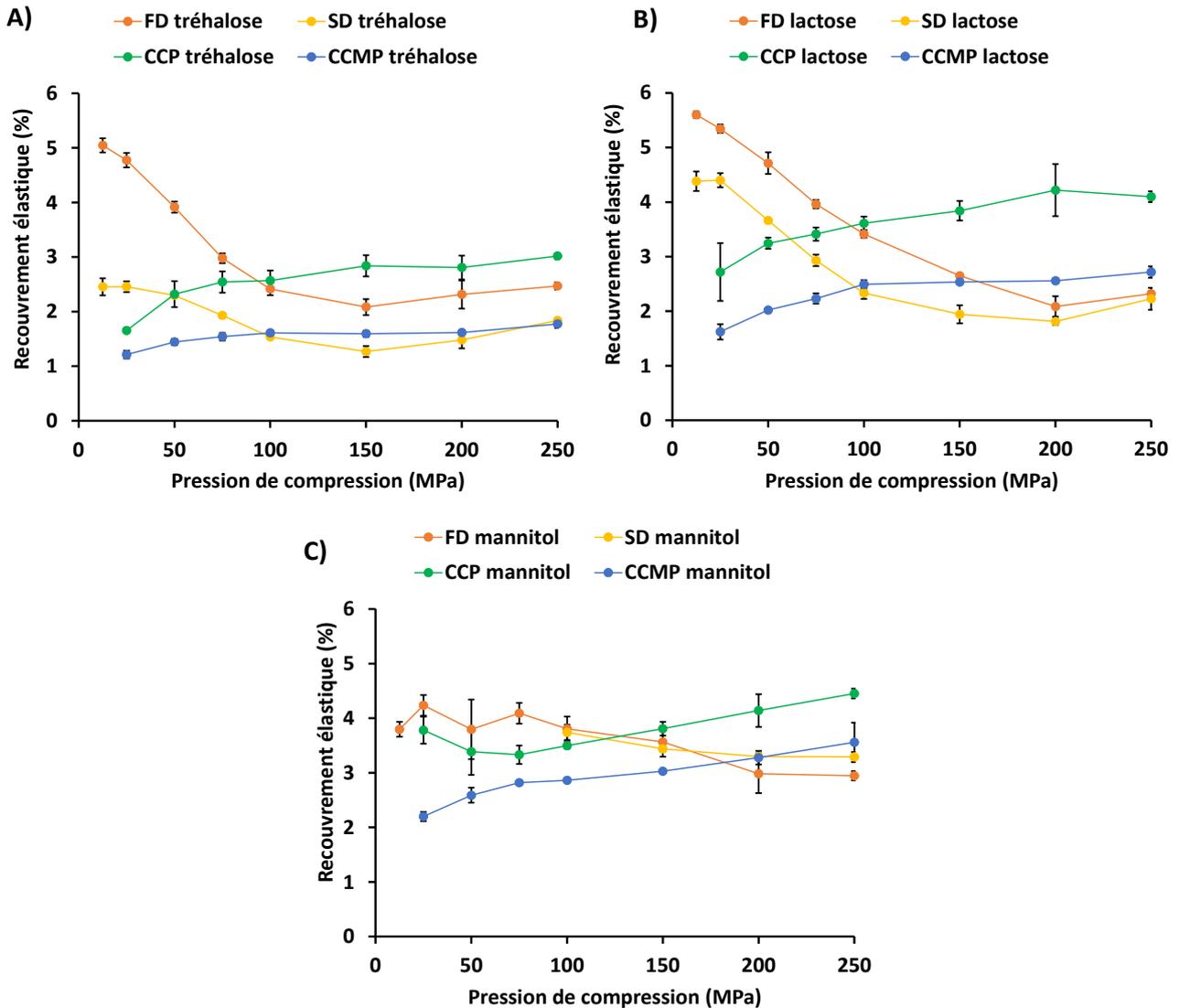


Figure 63 – Profils de recouvrement élastique des poudres de tréhalose (A), de lactose (B) et de mannitol (C). FD : lyophilisé, SD : atomisé, CCP : cristallin, CCMP : cristallin broyé.

4.3.4.3 L'énergie plastique

L'énergie plastique (EP) est l'énergie totale conférée à une poudre durant le cycle de compression. Elle peut être normalisée par le volume du solide comprimé pour permettre la comparaison des produits qui ont des masses volumiques différentes (Wünsch et al., 2021).

Dans le **Chapitre 3**, nous avons montré que l'énergie plastique du FD tréhalose est supérieure à celle du tréhalose cristallin (Hsein et al., 2023). La même tendance a été retrouvée pour les deux autres excipients lyophilisés. Le FD tréhalose, le FD lactose et le FD mannitol présentent tous des énergies plastiques plus élevées, sur toute la gamme de pression, que les poudres cristallines commerciales (**Figure 64 A, B et C**). Dans le cas du mannitol, la lyophilisation a un impact sur l'énergie plastique (effet de la texture), mais le FD et le SD mannitol, qui sont tous deux cristallins, possèdent des profils

d'énergie plastique similaires. Par contre, dans le cas des poudres amorphes (FD et SD pour le tréhalose et le lactose), une énergie plastique plus élevée a été observée pour les poudres FD en comparaison avec les poudres SD. Cela démontre une fois de plus l'impact de la texture des poudres lyophilisées amorphes sur les propriétés mesurées en compression.

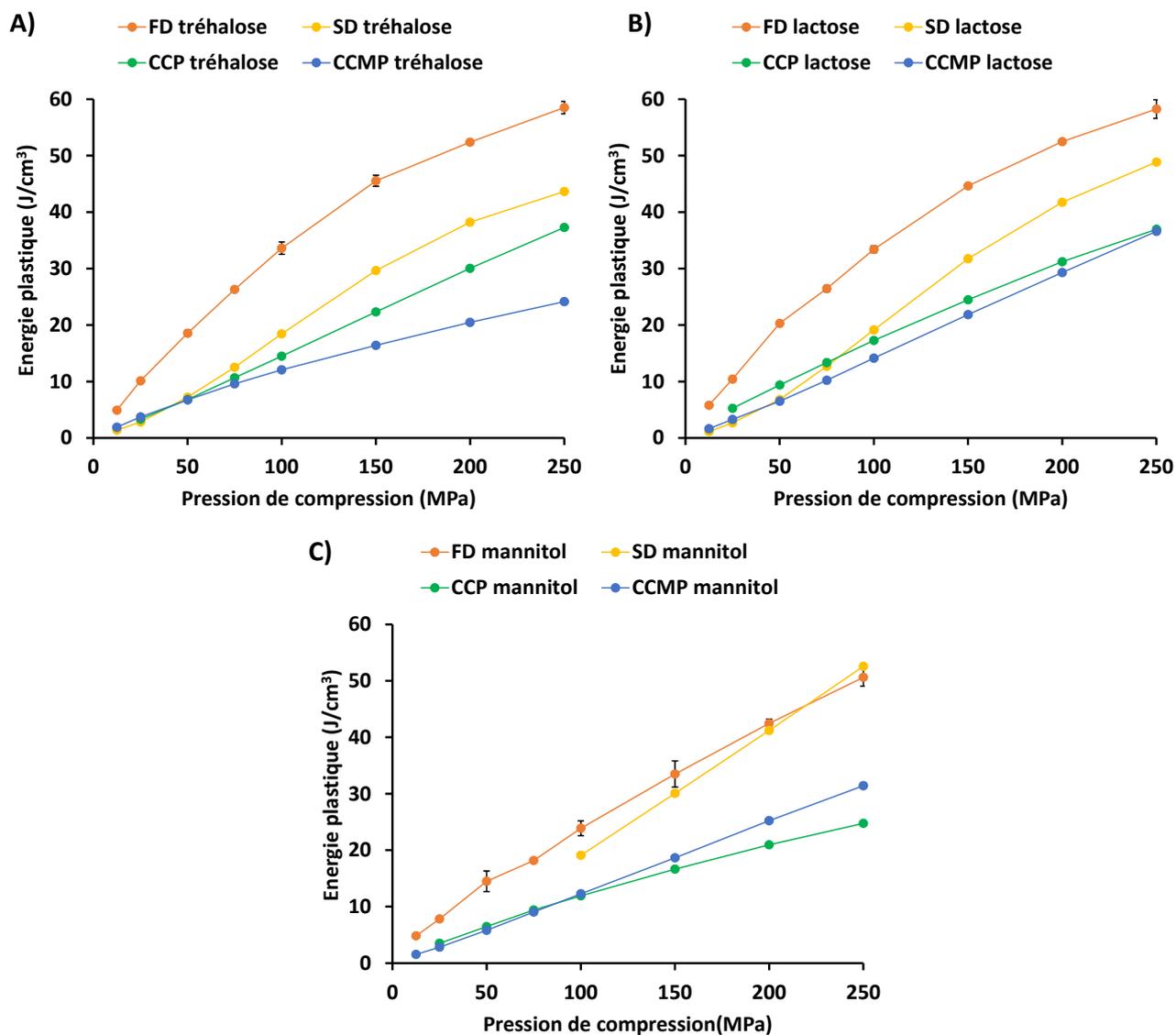


Figure 64 – Profils des énergies plastiques des poudres de (A) tréhalose, (B) lactose et (C) mannitol. FD : lyophilisé, SD : atomisé, CCP : cristallin, CCMP : cristallin broyé.

4.3.4.4 La tabléabilité

Le test de compression diamétrale a été réalisé 24 heures après compression et les profils de tabléabilité ont été tracés (**Figure 65 A, B et C**). Il est généralement considéré qu'une contrainte de rupture entre 1,5 et 2 MPa est suffisante pour assurer une bonne résistance mécanique permettant

le maintien de l'intégrité physique des comprimés durant tout le processus de production et d'acheminement vers les patients (Pitt and Heasley, 2013).

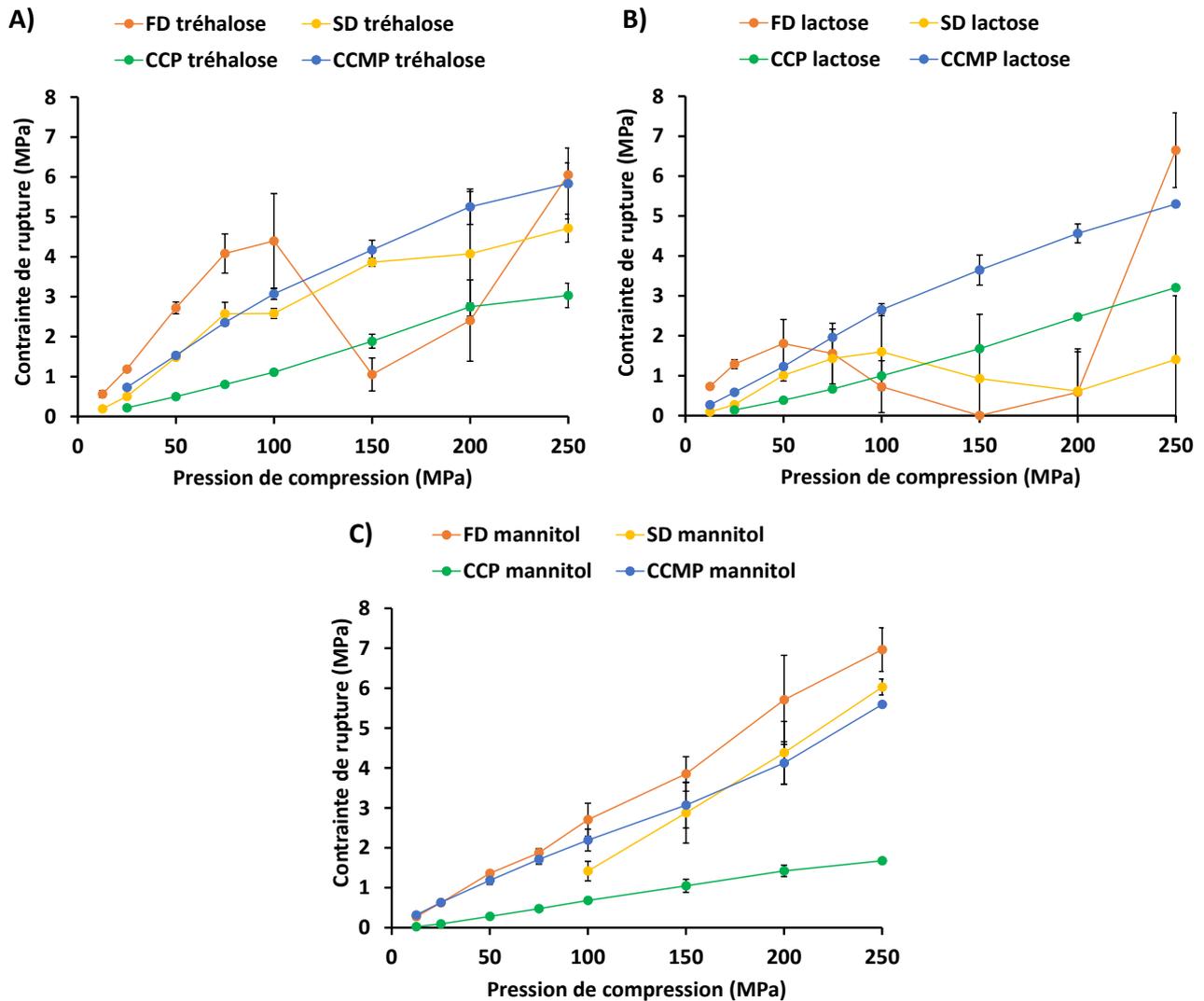


Figure 65 – Profils de tablétabilité des poudres de (A) tréhalose, (B) lactose et (C) mannitol. FD : lyophilisé, SD : atomisé, CCP : cristallin, CCMP : cristallin broyé.

Comme le montre la **Figure 65 A, B et C**, quel que soit l'excipient, la contrainte de rupture et donc le profil de tablétabilité des comprimés obtenus à partir des poudres broyées (CCMP) est plus élevée que celle des comprimés obtenus avec les poudres cristallines avant broyage (CCP). C'est un résultat attendu qui peut être expliqué par la différence de distribution de taille des particules des deux poudres (Persson et al., 2022).

De plus, aux faibles pressions pour le tréhalose et le lactose, et sur toute la gamme de pression pour le mannitol, les profils de tablétabilité des poudres SD sont similaires à ceux des poudres CCMP

(**Figure 65 A, B et C**). Ce résultat peut être lié au fait que les poudres SD et CCMP possèdent des granulométries du même ordre de grandeur (**Tableau 11**).

Un autre résultat très intéressant ressort de cette étude de tablétabilité. En effet, aux très faibles pressions pour le FD tréhalose et le FD lactose, tous deux amorphes, les comprimés présentent des contraintes de ruptures très élevées. Une contrainte de rupture supérieure à 2 MPa est obtenue pour des comprimés de FD tréhalose produits à 50 MPa et même de près de 1,5 MPa pour des comprimés de FD tréhalose obtenus à 25 MPa. Ces valeurs sont significativement plus élevées que celles obtenues pour les poudres de tréhalose et de lactose SD, CCP et CCMP. Le FD mannitol cristallin montre quant à lui, des contraintes de ruptures similaires à celles du mannitol SD et CCMP. Ces résultats montrent encore une fois une étroite relation entre la texture des lyophilisats amorphes et les propriétés mécaniques de ces comprimés.

La **Figure 65 A et B** montre également un comportement intéressant des poudres de lactose et de tréhalose lyophilisées ou atomisée (FD et SD). En effet, une grande variabilité sur les mesures de la force de rupture a été observée expérimentalement avec l'augmentation de la pression et cela se traduit par une variabilité sur la contrainte de rupture pour les comprimés de tréhalose et lactose FD et SD (**Figure 65 A et B**). A des pressions relativement élevées (de 100 à 200 MPa selon les produits), une chute drastique de la contrainte de rupture est observée pour les comprimés obtenus avec des produits amorphes, alors que cela n'est pas le cas dans le cas des comprimés de FD et SD mannitol, qui eux sont cristallins.

Afin de comprendre ce phénomène, des comprimés ont été observés en microscopie électronique à balayage juste après compression. Les images montrent que les comprimés produits à des pressions relativement élevées avec des poudres lyophilisées ou atomisées amorphes présentent de nombreuses fissures en surface juste après compression (**Figure 66 A, C et E**). De plus, comme le montre les images prises 24 heures après compression sur la même zone du comprimé ces fissures ne sont pas stables et évoluent dans le temps (elles peuvent se rétracter ou s'écarter) (**Figure 66 B, D et F**).

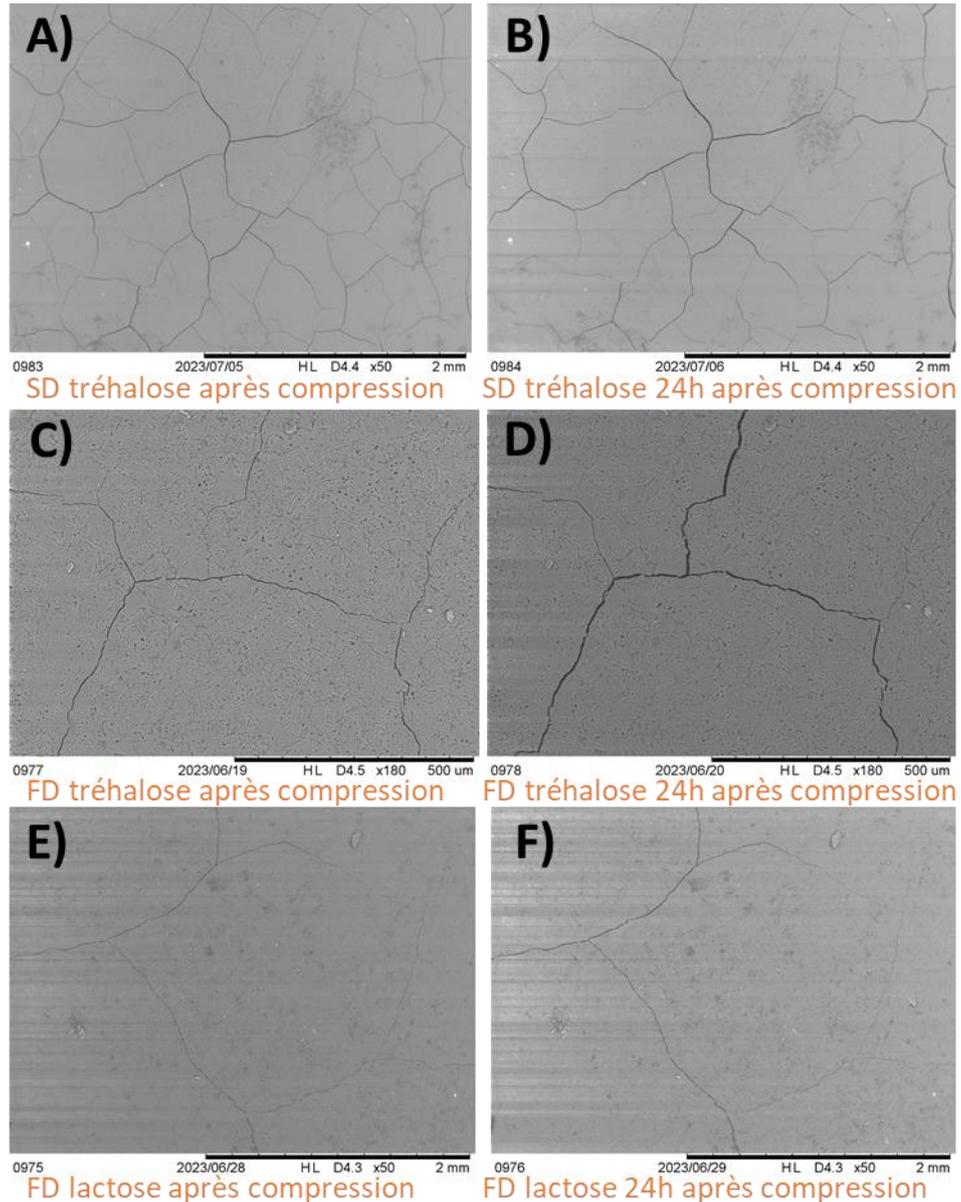


Figure 66 – Imagerie en microscopie électronique à balayage des comprimés de tréhalose et de lactose produits à 150 MPa. (A, B) SD tréhalose après compression et 24 heures après compression, (C, D) FD tréhalose après compression et 24 heures après compression, (E, F) FD lactose après compression et 24 heures après compression. (Grossissement x50 (A, B, E, F), x180 (C, D))

Pour aller encore plus loin, et savoir si les fissures visualisées en surface sont profondes dans le comprimé, un comprimé de FD tréhalose obtenu à 150 MPa a été étudié en tomographie à rayons X afin de visualiser la structure interne du comprimé sans le casser. Les résultats de tomographie à rayons X montrent bien que les fissures se propagent de la surface jusqu'à l'intérieur des comprimés (**Figure 67**). Ces défauts dans les comprimés produits aux pressions de compression élevées

expliquent la grande variabilité retrouvée sur les valeurs de contraintes de rupture des comprimés de tréhalose lyophilisé. Les mêmes analyses, microscopie électronique à balayage et tomographie aux rayons X, ont été réalisées sur des comprimés de FD tréhalose ou FD lactose produits aux faibles pressions, et aucune fissure à la surface ou dans le volume du comprimé n'a été détectée.

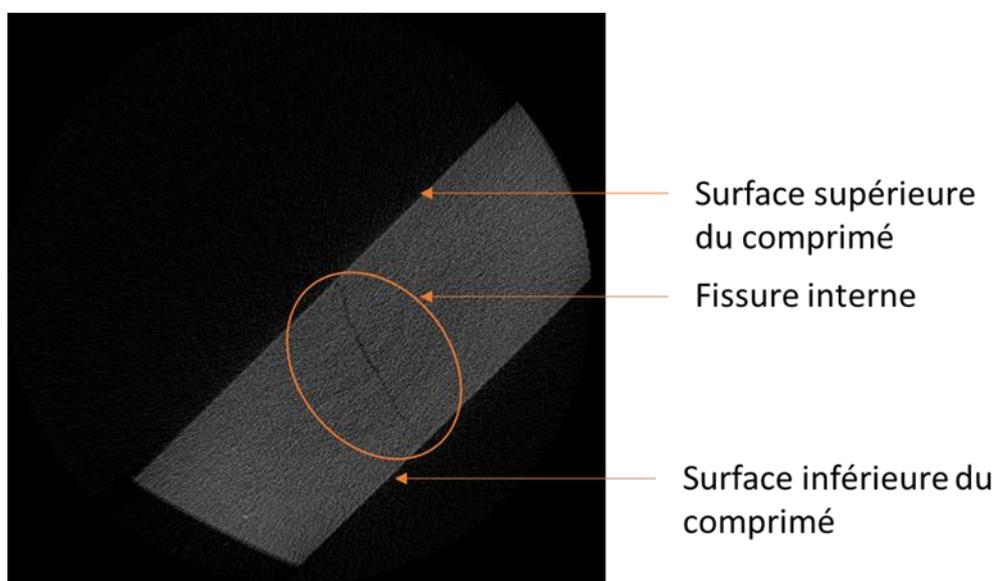


Figure 67 – Imagerie par tomographie à rayons X montrant une fissure se propageant de la surface jusqu'à l'intérieur d'un comprimé de FD tréhalose produit à 150 MPa.

La **Figure 65 A et B** montre également qu'à la pression maximale de 250 MPa, les comprimés de FD tréhalose et de FD lactose présentent une forte contrainte de rupture. Ce phénomène n'a pu être expliqué. Une étude plus approfondie du mécanisme de développement des fissures dans les comprimés devrait être menée pour mieux comprendre ce phénomène mais cela est hors du champ d'investigation de nos travaux.

Les comprimés formés à partir de matériaux cristallins ne montrent aucun signe de fissuration, même pour le FD mannitol cristallin. Il est donc possible de conclure à partir de ces résultats que l'obtention d'une forte contrainte de rupture aux faibles pressions est probablement liée aux textures et structures particulières des poudres amorphes lyophilisées. La variabilité observée sur la valeur de la contrainte de rupture lors d'une compression à haute pression semble être liée à la nature amorphe de la poudre indépendamment de sa texture. L'intervalle de pressions de compression d'intérêt pour les poudres amorphes lyophilisées (FD tréhalose et FD lactose) se situe donc dans une zone de faibles pressions (25 à 75 MPa), et ne doit pas dépasser 100 MPa pour éviter le risque de formation de fissures.

4.3.4.5 Le Brittle Fracture Index (BFI)

Comme expliqué précédemment, le BFI d'un comprimé est un indicateur de sa fragilité qui permet d'évaluer la sensibilité vis-à-vis des défauts (concentration stress) (Hiestand et al., 1977; Mazel and Tchoreloff, 2023). Il est connu que le BFI est dépendant de la pression de compression et qu'il est d'autant plus important que la pression est élevée (Croquelois et al., 2020; Hiestand et al., 1977).

Le test de BFI a été réalisé sur les comprimés de toutes les poudres étudiées. Les comprimés ont été produits à des pressions de compression pour lesquelles les comprimés étaient suffisamment résistants avec des valeurs de contraintes de rupture reproductibles. Par ailleurs, tous les comprimés perforés ont été visualisés en microscopie électronique à balayage avant le test de rupture diamétrale dans le but de s'assurer qu'aucune fissure n'avait été créée au cours de la perforation. Si des fissures étaient détectées, le comprimé était écarté de la mesure du BFI.

Le tréhalose CCMP comprimé à 75 MPa ou 150 MPa, a montré des fissures après perforation, ce qui rendait impossible la détermination du BFI. Il était également impossible de comprimer les poudres SD à la même pression afin de les comparer entre elles. Les poudres SD de chaque excipient ont donc été comprimées à la pression permettant la meilleure reproductibilité de l'essai. A titre de comparaison, quelques excipients CCMP ont été produits à ces mêmes pressions afin de pouvoir comparer les poudres SD et les poudres CCMP (**Tableau 12**).

Les valeurs de BFI du SD lactose et du CCMP lactose (respectivement $0,48 \pm 0,12$ et $0,38 \pm 0,02$) (**Tableau 12**), tous les deux comprimés à 50 MPa, sont similaires. Les valeurs obtenues pour le SD mannitol et le CCMP mannitol, comprimés à 150 MPa (respectivement $0,95 \pm 0,44$ et $1,20 \pm 0,21$) sont aussi dans le même ordre de grandeur. Sachant que les deux excipients, sous leur formes SD ou CCMP, ont des tailles de particules similaires, et sachant que le SD lactose est amorphe et que le SD mannitol est cristallin, la structure physique des poudres semble ne pas avoir d'influence sur les valeurs de BFI.

Dans le chapitre précédent, il a été montré que le FD tréhalose possède un BFI beaucoup plus important que le tréhalose cristallin (Hsein et al., 2023). Les résultats obtenus dans cette étude sont cohérents avec ceux obtenus précédemment puisqu'un BFI de $1,90 \pm 0,17$ a été obtenu pour le FD tréhalose comprimé à 25 MPa, et de $0,83 \pm 0,01$ pour le CCP tréhalose comprimé à 250 MPa (**Tableau 12**). De plus, le même comportement a été observé avec le lactose puisque le FD lactose comprimé à 25 MPa donne un BFI de $1,60 \pm 0,49$ et le CCP lactose comprimé à 250 MPa un BFI de $0,50 \pm 0,03$.

Sachant que les valeurs de BFI augmentent quand la pression de compression augmente, le fait que le BFI du FD lactose ou du FD tréhalose comprimés à 25 MPa soit plus élevé que celui du CCP lactose ou tréhalose comprimé à 250 MPa montre que le lactose et le tréhalose lyophilisés sont beaucoup plus fragiles et donc plus sensibles aux défauts que le CCP lactose ou tréhalose. Par

contre, la comparaison du BFI du FD mannitol cristallin comprimé à 25 MPa ($0,41 \pm 0,18$) à celui du CCP mannitol comprimé à 250 MPa ($0,34 \pm 0,02$) montre que même si le FD mannitol est légèrement plus fragile que le cristallin, l'effet est beaucoup moins marqué que dans le cas du tréhalose et du lactose.

Les résultats décrits ci-dessus montrent donc que la texture spécifique des lyophilisats amorphes semble jouer un rôle très important sur la fragilité des comprimés.

Tableau 12 – Valeurs expérimentales du BFI calculées pour les différents produits étudiés.

Excipient	Pression de compression	BFI calculé
FD tréhalose	25 MPa	$1,90 \pm 0,17$
FD lactose	25 MPa	$1,60 \pm 0,49$
FD mannitol	25 MPa	$0,41 \pm 0,18$
SD tréhalose	75 MPa	$0,52 \pm 0,17$
SD lactose	50 MPa	$0,48 \pm 0,12$
SD mannitol	150 MPa	$0,95 \pm 0,44$
CCP tréhalose	250 MPa	$0,83 \pm 0,01$
CCP lactose	250 MPa	$0,50 \pm 0,03$
CCP mannitol	250 MPa	$0,34 \pm 0,02$
CCMP lactose	50 MPa	$0,38 \pm 0,02$
CCMP mannitol	150 MPa	$1,20 \pm 0,21$

4.3.4.6 La viscoélasticité

Comme déjà cité, il est bien connu que les produits amorphes ont généralement un comportement viscoélastique (Alcoutlabi and Martinez-Vega, 1999; Deshmukh et al., 2020). Comme dans le chapitre précédent, cette propriété a été étudiée en mesurant le rapport d'amortissement basé sur la technique d'excitation impulsionnelle (Meynard et al., 2021). Les résultats sont représentés sur la **Figure 68**.

Le graphique montre tout d'abord que les comprimés formés à partir de poudres amorphes (FD et SD pour le tréhalose et le lactose) présentent un rapport d'amortissement significativement plus élevé que les autres produits. Leur viscoélasticité est donc plus élevée en comparaison de celle des produits cristallins (CCP et CCMP pour le tréhalose et le lactose) (**Figure 68**), ce qui est en cohérence avec la littérature (Alcoutlabi and Martinez-Vega, 1999; Deshmukh et al., 2020).

Les résultats obtenus avec le mannitol sont plus difficiles à analyser. Sachant que les quatre types de poudres étudiées (FD, SD, CCP et CCMP) sont toutes cristallines, des rapports d'amortissement similaires pour tous les produits étaient attendus. Pourtant nos résultats montrent que le FD mannitol cristallin présente un rapport d'amortissement moins élevé que celui des SD et CCMP mannitol (les valeurs pour ces derniers étant presque équivalents), qui à leur tour possèdent un rapport d'amortissement moins élevé que le CCP mannitol. Si la différence de texture des poudres avait une influence sur la viscoélasticité, la tendance aurait dû être la même que dans le cas du tréhalose et du lactose, ce qui n'est pas le cas. Les caractérisations réalisées dans ce travail ne permettent donc pas pour l'instant de conclure sur l'origine de ce comportement, et une étude plus approfondie sur le mannitol devra être réalisée.

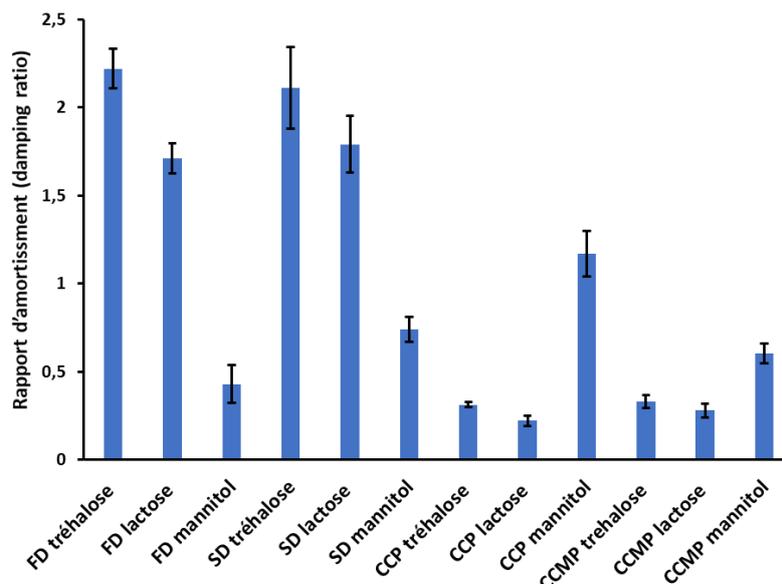


Figure 68 – Rapports d'amortissement (damping ratio) déterminés sur les comprimés des différents systèmes étudiés.

4.4 Conclusion

Les résultats de ce chapitre montrent que la texture et la structure physique des poudres peuvent avoir des effets combinés ou singuliers sur les propriétés en compressions.

Cette étude a montré une fois de plus que le FD tréhalose a en effet le même comportement en compression en le comparant aux résultats du chapitre précédent (Hsein et al., 2023). De plus, le lactose, qui est aussi amorphe après lyophilisation et compression s'est comporté d'une façon similaire. Il apparaît donc que la texture spécifique des poudres amorphes lyophilisées est la raison principale de ce comportement spécifique en compression, et que ce comportement n'est pas seulement limité à la structure physique du tréhalose.

La seule propriété étudiée qui s'est avérée indépendante de la texture et qui est seulement influencée par la structure physique de la poudre (amorphe ou cristalline), est la grande variabilité des mesures de la contrainte de rupture à des pressions de compression élevées. Cela est due à des fissures qui se développent dans les comprimés après compression. C'est un problème qui peut facilement être évité durant la compression des poudres lyophilisées amorphes, puisque ces poudres ont la propriété d'avoir une contrainte de rupture suffisamment élevée à des pressions de compression faibles. Il est donc possible de comprimer ces poudres à des pressions de compression faibles (< 50 MPa), puisque la contrainte de rupture est assez élevée (> 2 MPa) et que la reproductibilité du test est la meilleure à ces niveaux de pression.

Même si ce chapitre nous a permis de mieux comprendre le comportement des poudres lyophilisées durant la compression, des travaux complémentaires sont requis pour comprendre le mécanisme qui peut expliquer, au niveau microscopique, les tendances démontrées. Comme il a été cité précédemment, l'objectif final de ces travaux est de concevoir des comprimés, formés de poudres lyophilisées contenant des biomolécules. Dans ce chapitre nous avons pu démontrer qu'il est tout à fait possible de former avec ces poudres lyophilisées, des comprimés suffisamment cohésifs à de faibles pressions. Par contre, jusqu'à ce stade de l'étude, le remplissage de la matrice de compression s'opérait manuellement du fait du faible écoulement de la poudre lyophilisée. Le prochain défi sera d'améliorer les propriétés de la poudre pour obtenir un écoulement adéquat à un procédé industriel.

Chapitre 5. Etude des propriétés en compression des poudres lyophilisées avec différentes concentrations en excipient

SOMMAIRE

5.1	Introduction.....	168
5.2	Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 5	169
5.3	Résultats et discussions	170
5.3.1	Caractérisations physico-chimiques.....	170
5.3.1.1	Diffraction des rayons X (DRX) :	170
5.3.1.2	Analyses DSC et titration Karl Fischer :.....	171
5.3.1.3	Imagerie en microscopie électronique à balayage.....	172
5.3.1.4	Détermination de la surface spécifique par adsorption gazeuse et de la masse volumique pycnométrique	176
5.3.2	Caractérisations des poudres étudiées en compression.....	178
5.3.2.1	La compressibilité	178
5.3.2.2	Le recouvrement élastique (RE).....	180
5.3.2.3	L'énergie plastique (EP).....	181
5.3.2.4	La tablétabilité.....	182
5.3.2.5	Le BFI (Brittle Fracture Index)	184
5.3.3	Etude de l'écoulement des poudres lyophilisées	186
5.4	Conclusion	189

5.1 Introduction

Dans les deux chapitres précédents, nous avons pu montrer qu'il est tout à fait possible de produire des comprimés cohésifs à partir de poudres lyophilisées en particulier à de faibles pressions de compression. Cependant, à ce stade de l'étude, les poudres lyophilisées ont toujours été introduites manuellement dans la matrice de compression car les poudres étudiées ne présentaient pas de bonnes propriétés d'écoulement, rendant impossible l'utilisation de la trémie d'alimentation pour un remplissage gravitaire et automatisé de la matrice. Pour la suite de notre travail, nous nous sommes donc fixés comme objectif l'amélioration de la processabilité des poudres lyophilisées et plus précisément de leur écoulement afin de pouvoir produire les comprimés via un remplissage par la trémie.

Différentes stratégies peuvent être envisagées pour améliorer l'écoulement des poudres comme la granulation ou la modification de la formulation en la concentrant ou en mélangeant les poudres lyophilisées avec des excipients de compression directe présentant un bon écoulement ou encore grâce à l'utilisation de glidants. Dans ce chapitre, nous avons souhaité continuer en première intention avec le procédé de compression directe. Ainsi, afin de pouvoir améliorer l'écoulement, nous avons envisagé de densifier la poudre obtenue par lyophilisation en augmentant la concentration des excipients dans les solutions lyophilisées. Le comportement en compression des poudres ainsi obtenues a ensuite été étudié afin de comparer leurs propriétés mécaniques et d'écoulement avec celles des poudres lyophilisées, moins concentrées étudiées précédemment.

Les excipients qui ont été retenus pour ces essais de formulation sont le tréhalose et le lactose lyophilisés. Le mannitol lyophilisé a été exclu en raison de sa cristallinité et du risque d'effet négatif sur l'activité des biomolécules pour de futures applications. Diverses poudres lyophilisées ont été préparées à partir de solutions de concentrations comprises entre 10 et 30% m/v.

L'étude des différentes poudres lyophilisées s'est déroulée en deux étapes :

- 1) Etude des propriétés physico-chimiques des poudres de tréhalose et de lactose lyophilisées : analyse de la morphologie en MEB, détermination de la teneur en eau par titrage Karl Fischer, analyse de la structure physique par DRX, détermination de la T_g par DSC, mesure de la masse volumique vraie par pycnométrie à hélium et détermination de la surface spécifique par adsorption gazeuse.
- 2) Etude du comportement en compression du tréhalose et du lactose lyophilisés : étude de la compressibilité et de la tablétabilité, mesure de l'énergie plastique, détermination du BFI et du recouvrement élastique.

L'objectif de cette partie est donc de modifier la texture du lyophilisat tout en maintenant son caractère amorphe, et d'évaluer son impact sur le comportement en compression.

5.2 Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 5

Les différents excipients caractérisés dans cette partie sont le tréhalose lyophilisé (Biohale, Kyoto, Japon), et le lactose lyophilisé (Supertab 30 Gr, BFE Pharma, Coch, Allemagne) obtenus à partir de solutions de concentrations croissantes (10 à 30 % m/v pour le tréhalose et 10 à 20 % m/v pour le lactose). Dans la suite de ce chapitre, les poudres lyophilisées seront identifiées par la concentration de la solution initiale à savoir, pour le tréhalose, FD T5%, FD T10%, FD T15% et FD T30% respectivement pour des concentrations initiales de 5, 10, 15 et 30% m/v, pour le lactose, FD L5%, FD L10%, FD L15% et FD L20% pour des concentrations initiales de 5, 10, 15 et 20% m/v.

Le choix de la concentration maximale pouvant être utilisée a été déterminé à partir de la solubilité dans l'eau à température ambiante du tréhalose et du lactose (respectivement ≈ 80 g/100 g d'eau (Lammert et al., 1998) et ≈ 20 g/100 g d'eau (McSweeney and Fox, 2009)). Le cycle de lyophilisation « agressif » (cf. paragraphe **2.2.1.1**) a été utilisé avec une quantité de 6 ml de solution dans chaque flacon de lyophilisation comme décrit dans les deux chapitres précédents. Selon les concentrations utilisées, la quantité de poudre lyophilisée dans chaque flacon a permis de produire de 2 à 4 comprimés. Des poinçons Euro B, ronds plats, de 10 ou 11 mm de diamètre ont été utilisés sauf pour les comprimés nécessaires à l'étude du BFI. Dans ce cas particulier, des poinçons avec méplat de 11 mm de diamètre ont été choisis.

5.3 Résultats et discussions

5.3.1 Caractérisations physico-chimiques

Comme dans les sections précédentes, nous avons commencé cette partie par l'analyse des propriétés physico-chimiques des poudres après lyophilisation afin d'évaluer l'effet de l'augmentation de la concentration des solutions à lyophiliser sur les diverses caractéristiques des poudres, telles que leur masse volumique, leur structure physique, leur texture et leur surface spécifique.

5.3.1.1 Diffraction des rayons X (DRX) :

L'analyse de la structure physique a été réalisée sur toutes les poudres lyophilisées ainsi que sur des comprimés obtenus à 25 et 250 MPa. Les résultats de cette analyse sont présentés sur la **Figure 69**. Les diffractogrammes montrent que les poudres FD T10% et FD T15%, ainsi que les poudres FD L10%, FD L15% et FD L20% demeurent amorphes après le processus de lyophilisation de même qu'après compression y compris aux pressions fortes, jusqu'à 250 MPa. Par contre, pour la poudre FD T30%, les diffractogrammes (**Figure 69 E**) indiquent une cristallisation partielle de la poudre après lyophilisation et compression. La comparaison de ces diffractogrammes (**Figure 69 E**) avec celui du tréhalose cristallin (cf. **Chapitre 4, Figure 55 B**) montre des pics caractéristiques identiques au tréhalose cristallin ($2\theta = 13,9^\circ$ et $2\theta = 24,3^\circ$), ce qui signifie que la poudre FD T30% et les comprimés semblent avoir, au moins partiellement, la même forme cristalline.

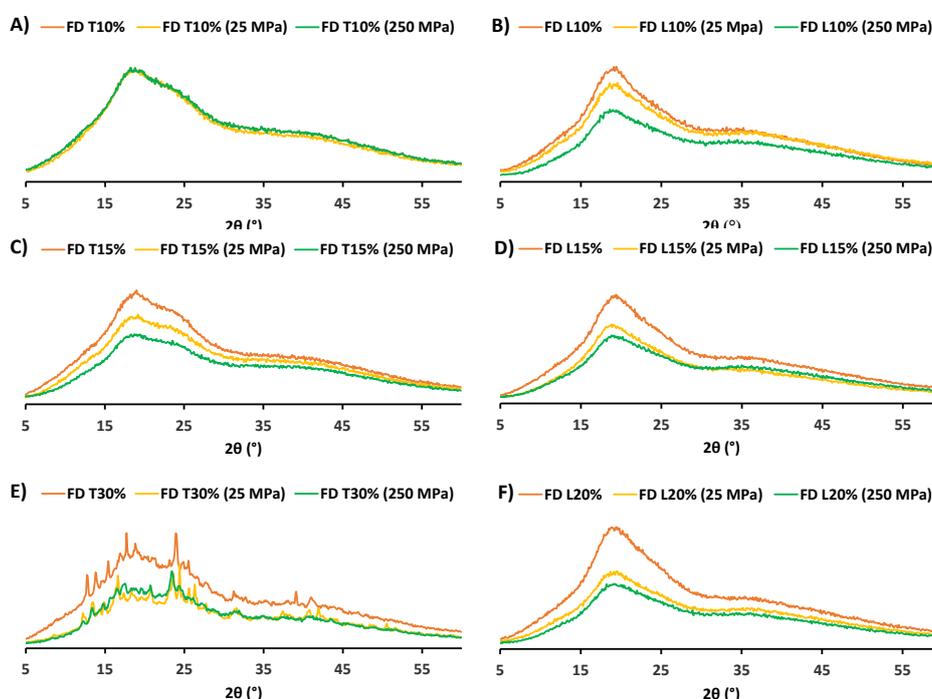


Figure 69 – Diffractogrammes des lyophilisats de tréhalose et de lactose obtenus à partir de solutions de concentrations croissantes, 10 à 30% m/v pour le tréhalose (FD T10%, FD T15% et FD T30%) et 10 à 20% m/v pour le lactose (FD L10%, FD L15% et FD L20%) et des comprimés obtenus à 25 et 250 MPa.

5.3.1.2 Analyses DSC et titration Karl Fischer :

Les résultats de la titration de Karl Fischer ainsi que la mesure de la température de transition vitreuse sont présentés dans le **Tableau 13**. Les échantillons FD T10 et 15% sont caractérisés par des T_g similaires (≈ 105 °C) pour une humidité résiduelle de 2%. Concernant les échantillons de FD lactose, le FD L10% présente une température de transition vitreuse de 103 °C pour une humidité résiduelle de 1,2% alors que pour FD L15% et FD L20% les pourcentages d'humidités résiduelles sont plus élevés (de 2 à 2,7%) et les T_g sont plus faibles (entre 87 et 90 °C).

Tableau 13 – Températures de transition vitreuse et humidité résiduelle des différents échantillons analysés. FD T10%, FD T15% et FD T30% représentent les échantillons de FD tréhalose obtenus à partir de solutions de concentrations 10, 15 et 30% m/v respectivement. FD L10%, FD L15% et FD L20% représentent les échantillons de FD lactose obtenus à partir de solutions de concentrations 10, 15 et 20% m/v respectivement.

Echantillon	Température de transition vitreuse (T_g) en °C	Pourcentage d'humidité résiduelle (%)
FD T10%	105	2,1 ± 0,15
FD T15%	105	2,0 ± 0,2
FD T30%	-	4,2 ± 0,4
FD L10%	103	1,2 ± 0,21
FD L15%	89	2,1 ± 0,25
FD L20%	87	2,7 ± 0,45

Les divers échantillons analysés présentent des valeurs de température de transition vitreuse (T_g) en corrélation avec les pourcentages d'humidité résiduelle mesurés sur les lyophilisats (**Tableau 13**), ce qui est conforme aux valeurs de la littérature (Haque and Roos, 2006; Roe and Labuza, 2005). Cependant, dans le cas du FD T30%, qui présente une cristallinité partielle, aucune T_g n'a pu être détectée en DSC. De plus, à l'exception du FD T30% et du FD L10%, il a été observé que le pourcentage d'humidité résiduelle dans les lyophilisats se situait entre 2 et 3%. Ces valeurs sont supérieures à celles des formulations obtenues après lyophilisation de solutions avec une concentration en excipient de 5% (m/v) (pour rappel, des valeurs d'humidité résiduelle autour de 1% ont été mesurées pour FD T5% et FD L5%). Cela peut être expliqué par le fait qu'une augmentation de la concentration en excipient dans la solution à lyophiliser conduit à la formation d'un lyophilisat

avec des feuillets plus épais avec une résistance accrue pendant les étapes de dessiccation primaire et secondaire. Cette modification de texture a été observée sur les images en microscopie électronique à balayage des lyophilisats obtenus (cf. paragraphe **5.3.1.3**).

5.3.1.3 Imagerie en microscopie électronique à balayage

Les lyophilisats ainsi que les comprimés préparés sous des pressions de 25 et 250 MPa ont été examinés en microscopie électronique à balayage. La **Figure 70** illustre l'influence de la concentration de la formulation sur la texture des lyophilisats. Les images révèlent que l'augmentation de la concentration de l'excipient n'a pas affecté la structure aérée en nid d'abeilles des lyophilisats. Cependant, les **Figure 70 D, E et F**, montrent une représentation endommagée de cette structure, probablement due à des difficultés dans la préparation des échantillons. En effet, à mesure que la concentration en excipient augmente, la texture du lyophilisat devient plus rigide, rendant sa préparation pour l'observation plus délicate. Néanmoins, les images mettent en évidence la présence de feuillets et d'une porosité significative, caractéristiques des lyophilisats. De plus, une augmentation de la concentration en excipient entraîne une augmentation de l'épaisseur des feuillets, particulièrement visible pour le FD T30% et le FD L20% (**Figure 70 G et H**).

Les **Figure 70 A et B** révèlent également la présence de petits trous sur les feuillets. Ces trous se sont formés progressivement pendant la sublimation pour faciliter le passage du flux de vapeur d'eau à travers les couches du lyophilisat. Ils sont uniquement observés sur les feuillets des lyophilisats FD T5% et FD L5%, et ne sont plus présents sur les feuillets des lyophilisats plus concentrés. Pour ces lyophilisats, le flux de vapeur d'eau ne parvient pas à percer les feuillets plus épais des lyophilisats plus concentrés ce qui augmente la résistance du produit à la sublimation. Cette texture particulière justifie les pourcentages d'humidité résiduelle plus élevés pour les formulations les plus concentrées.

Par la suite, la surface des comprimés préparés à partir de FD tréhalose et du FD lactose aux différentes concentrations a été examinée. Tout comme dans les deux études précédentes (cf. **Chapitre 3** et **Chapitre 4**), les images montrent que pour les comprimés obtenus à 25 MPa, une grande porosité est observée, avec une préservation des feuillets et de la structure initiale des lyophilisats (**Figure 71 A, C D, E et Figure 72 A, C, D et E**). En revanche, lorsque les différentes poudres sont comprimées à 250 MPa, la porosité diminue jusqu'à devenir quasiment inexistante, et la forme initiale des feuillets n'est plus discernable. La surface des comprimés est devenue lisse avec une porosité très faible (**Figure 71 B, D, F, H et Figure 72 B, D, F et H**).

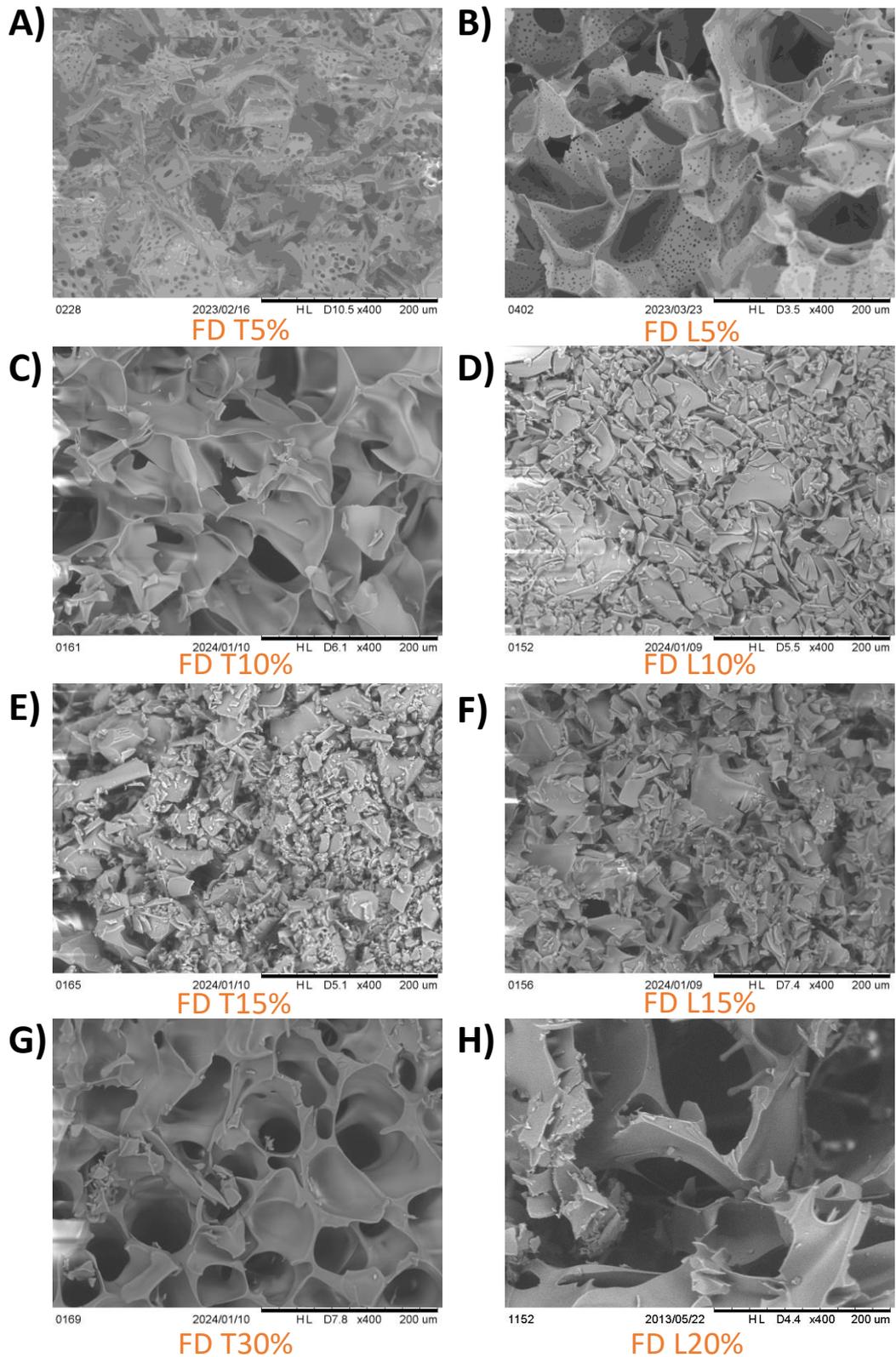


Figure 70 – Images en microscopie électronique à balayage du tréhalose et du lactose lyophilisés ; (A) FD T5%, (B) FD L5%, (C) FD T10%, (D) FD L10%, (E) FD T15%, (F) FD L15%, (G) FD T30% et (H) FD L20%. (Grossissement x400)

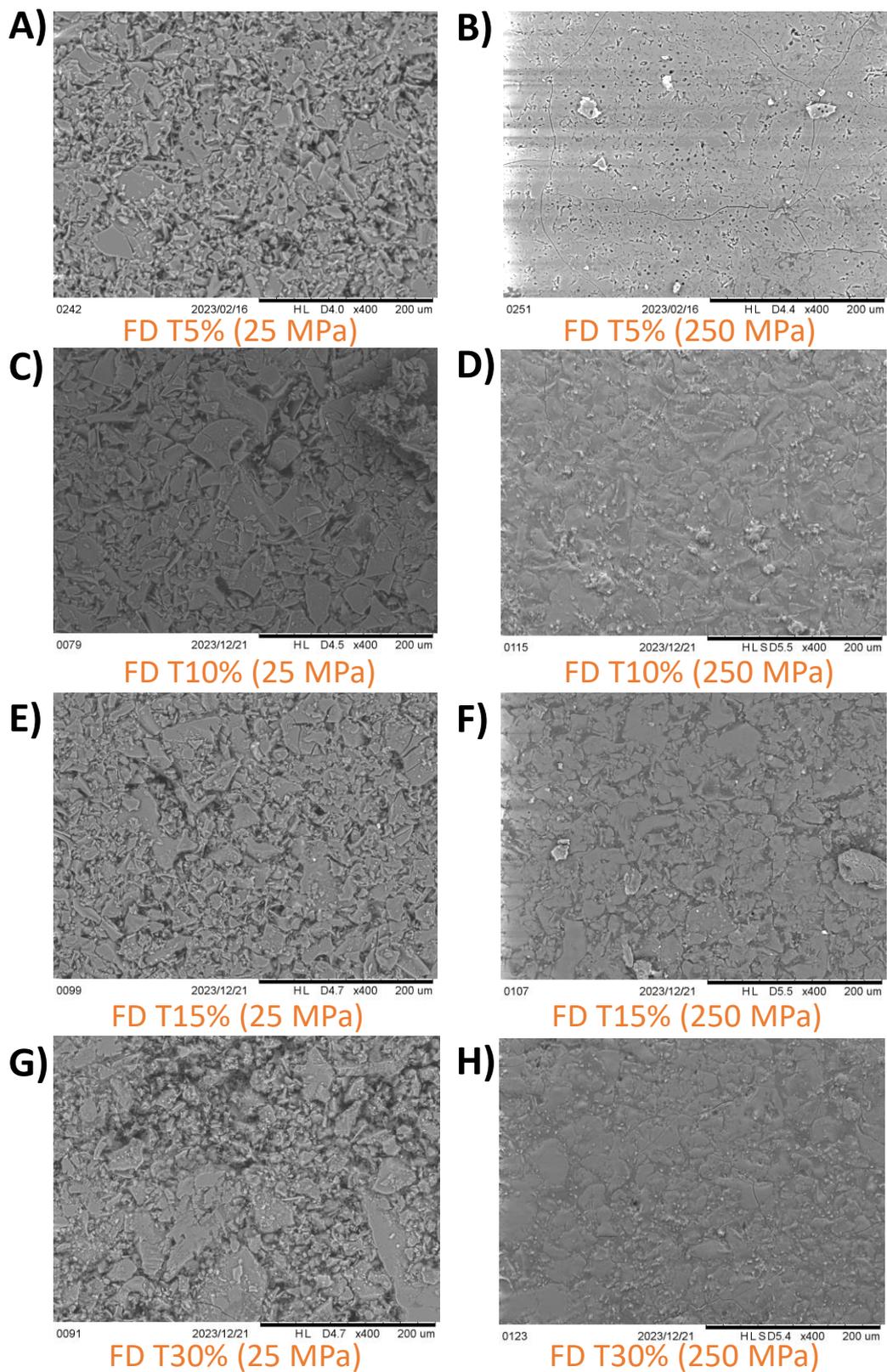


Figure 71 – Images en microscopie électronique à balayage de la surface des comprimés de tréhalose lyophilisé comprimé à 25 MPa (A, C, E et G) et 250 MPa (B, D, F et H) du FD tréhalose 5, 10, 15 et 30%. (Grossissement x400)

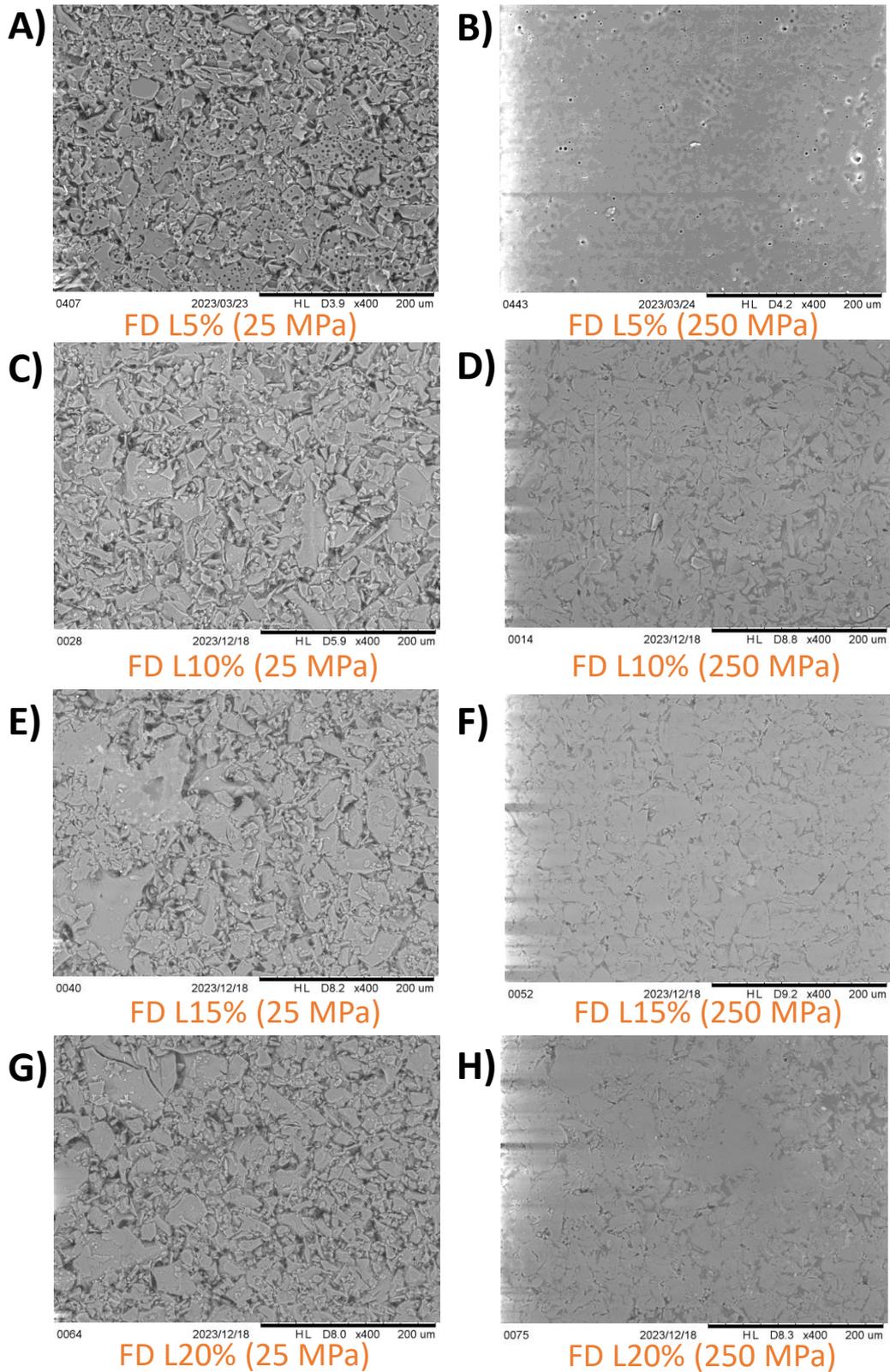


Figure 72 – Images en microscopie électronique à balayage de la surface des comprimés de lactose lyophilisé comprimé à 25 MPa (A, C, E et G) et 250 MPa (B, D, F et H) du FD lactose 5, 10, 15 et 20%. (Grossissement x400)

5.3.1.4 Détermination de la surface spécifique par adsorption gazeuse et de la masse volumique pycnométrique

Les résultats des mesures de masse volumique et de surface spécifique sont représentés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 – Valeurs des masses volumiques pycnométriques et de surface spécifique des différents échantillons analysés.

Echantillon	Masse volumique pycnométrique (g/cm ³)	Surface spécifique (m ² /g)
FD T5%	1,45 ± 0,023	0,94 ± 0,060
FD T10%	1,50 ± 0,002	0,72 ± 0,033
FD T15%	1,50 ± 0,004	0,73 ± 0,047
FD T30%	1,50 ± 0,001	1,40 ± 0,089
FD L5%	1,39 ± 0,008	1,06 ± 0,018
FD L10%	1,51 ± 0,001	0,68 ± 0,053
FD L15%	1,51 ± 0,002	0,60 ± 0,070
FD L20%	1,50 ± 0,013	0,60 ± 0,013

Les variations des masses volumiques mesurées semblent suivre les mêmes tendances pour le tréhalose et le lactose. En effet, les échantillons de tréhalose et de lactose à 5% (m/v) présentent des masses volumiques plus faibles que celles des échantillons plus concentrés (1,45 ± 0,023 g/cm³ pour le FD T5% et 1,39 ± 0,008 g/cm³ pour le FD L5%). La variabilité sur la masse volumique du FD T5% est plus élevée par rapport aux autres mesures. Cette variabilité est liée à la masse d'échantillon pesée (la masse maximale pour le FD T5% était inférieure à celle des autres échantillons, car elle correspondait à la quantité maximale permettant de remplir complètement la cellule de mesure) lors de la préparation de l'échantillon. À partir d'une concentration de 10% (m/v), la masse volumique a atteint des valeurs de l'ordre de 1,50 g/cm³ pour le tréhalose à 10, 15 et 30 % (m/v), de l'ordre 1,51 g/cm³ pour le lactose à 10, 15% et de 1,50 g/cm³ pour le lactose 20% (m/v) (**Tableau 14**). Les résultats montrent qu'à partir d'une concentration de 10%, la masse volumique se stabilise et devient indépendante de la concentration de l'excipient. Ces observations sont cohérentes avec les résultats de la littérature, où il a été démontré que les masses volumiques pycnométriques du tréhalose

lyophilisé à des concentrations de 10%, 20% voire même 50% (m/v), sont identiques et indépendantes de la concentration en tréhalose dans le lyophilisat (Imamura et al., 2008). Le lactose lyophilisé à différentes concentrations semble également présenter le même comportement que le tréhalose, avec une masse volumique pycnométrique des lyophilisats qui devient indépendante de leur concentration à partir d'une concentration de 10% (m/v). Il est tout de même important de savoir que l'interprétation de ces résultats reste très délicate et sujette à caution car un amorphe ne possède pas une masse volumique parfaitement définie.

De même, la surface spécifique des différents échantillons semble suivre des tendances similaires à celles de la masse volumique. En effet, les échantillons de tréhalose et de lactose lyophilisés les moins concentrés (5% m/v) présentent la plus grande surface spécifique, autour de 1 m²/g (**Tableau 14**). À partir d'une concentration de 10% (m/v), la surface spécifique de ces deux excipients diminue et semble devenir indépendante de la concentration de l'échantillon (**Tableau 14**). Ces résultats peuvent être liés aux variations de texture observées dans les lyophilisats plus concentrés, qui ont été visualisés à l'aide d'images de microscopie électronique à balayage (**Figure 70**). En effet, les lyophilisats plus concentrés (FD T10 et 15%, ainsi que FD L10, 15 et 20%) présentaient une texture en feuillets similaire mais avec des feuillets plus épais que ceux des FD T5% et FD L5%. Dans le cas d'un feuillet, du fait de sa géométrie, une augmentation de son épaisseur et donc de sa masse ne s'accompagne pas nécessairement d'une augmentation significative de sa surface. Par conséquent, une augmentation de masse plus importante que l'augmentation de la surface d'un feuillet entraîne une diminution de sa surface spécifique. Ce phénomène entraîne une diminution de la surface spécifique entre les excipients obtenus à partir de concentrations faibles (5% m/v) et ceux à des concentrations plus élevées. De plus, les mesures de surface spécifique révèlent que, à l'exception des concentrations de 10% pour le tréhalose et le lactose, la surface spécifique est restée stable même avec une augmentation de la concentration. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que l'augmentation de l'épaisseur des feuillets entre les lyophilisats concentrés à 5% m/v est plus importante que la variation d'épaisseur des feuillets entre les lyophilisats concentrés à 10% m/v et plus. En d'autres termes, une fois que la concentration atteint un certain seuil, l'augmentation de la concentration n'a pas un impact significatif sur la surface spécifique, car les changements d'épaisseur des feuillets deviennent moins prononcés.

En revanche, le FD T30%, partiellement cristallin, se différencie par une surface spécifique de $1,40 \pm 0,089$ m²/g, significativement supérieure à celles des autres poudres de tréhalose lyophilisé. Cette valeur reste inférieure à celle du tréhalose cristallin obtenu dans l'étude précédente (cf. **Chapitre 4**) ($1,64 \pm 0,231$ m²/g). Ce résultat est conforme aux attentes, car il a déjà été démontré que les produits cristallins ont tendance à présenter une surface spécifique supérieure à celle des produits amorphes (Rambhatla et al., 2004).

5.3.2 Caractérisations des poudres étudiées en compression

5.3.2.1 La compressibilité

Dans un premier temps, le comportement en compression des différents lyophilisats a été étudié en termes de compressibilité. Les profils de compressibilité du FD tréhalose et du FD lactose à différentes concentrations sont représentés sur la **Figure 73**.

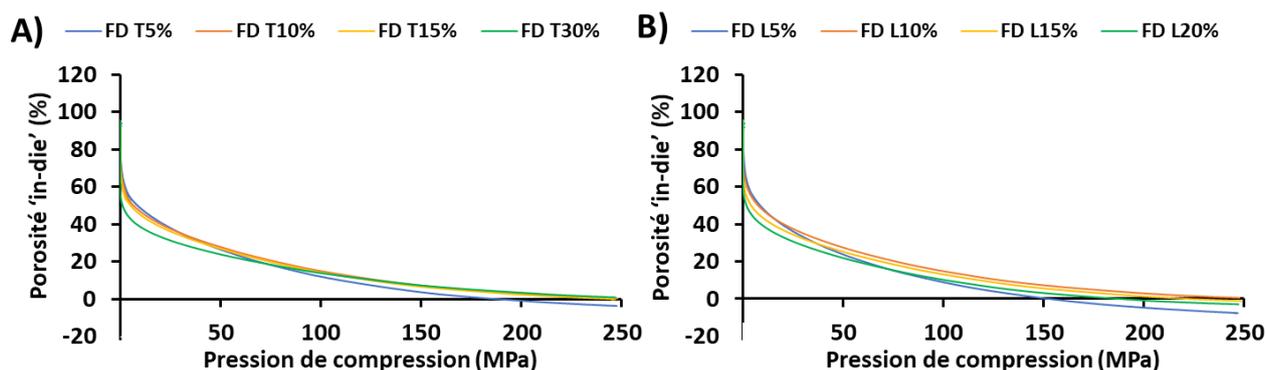


Figure 73 – Profils de compressibilité du FD tréhalose (A) et du FD lactose (B) obtenus à partir de solutions à différentes concentrations.

Les courbes de compressibilité des lyophilisats de tréhalose et de lactose ne révèlent pas de tendance spécifique. Les courbes de compressibilité des FD T5%, 10% et 15% montrent des profils similaires pour des pressions de compression comprises entre 0 et 75 MPa. Sur cette gamme de pression, le FD T30% montre une porosité légèrement plus faible que les trois autres compositions. Ce résultat est probablement dû à son caractère partiellement cristallin. En effet, dans le paragraphe **3.3.3.1** du **Chapitre 3**, il avait déjà été observé que le tréhalose cristallin était plus compressible que le tréhalose lyophilisé aux faibles pressions. A partir de 75 MPa, la porosité du FD T5% devient plus faible que celles de tous les autres échantillons alors que les FD T10%, 15% et 30% ont un comportement similaire jusqu'à 250 MPa.

Concernant le lactose lyophilisé, les FD L5% et 10% montrent des courbes de compressibilité superposables entre 0 et 25 MPa. Les porosités sont plus faibles pour les FD L15% et FD L20%. A partir de 25 MPa, la porosité du FD L5% commence à baisser progressivement pour devenir plus basse que celles de tous les autres échantillons.

Aux pressions élevées (à partir de 200 MPa pour le tréhalose et de 150 MPa le lactose), la porosité devient négative. Deux principales raisons peuvent expliquer ces valeurs négatives comme cela a déjà été argumenté au **Chapitre 3**, paragraphe **3.3.3.1**. Ces résultats montrent clairement que le profil de compressibilité change légèrement avec l'augmentation de la concentration en excipient (**Figure**

73 A et B), ce qui peut être attribué aux différences texturales et physico-chimiques des différentes poudres.

Dans le but de s'affranchir des incertitudes liées à la masse volumique pycnométrique décrites, les graphiques de compressibilité illustrant la variation de la masse volumique « in-die » en fonction de la pression de compression ont été tracés et sont présentés sur la **Figure 74 A et B**. Pour obtenir ces représentations, la masse volumique (exprimée en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) a été calculée en prenant en compte la masse finale du comprimé (m en g), la distance entre les poinçons correspondant à l'épaisseur du comprimé à chaque point de pression (h en cm), et la surface du comprimé. La formule utilisée est donnée par l'**équation 24** :

$$\rho = \frac{m}{V_{\text{cylindre}}} = \frac{m}{\pi r^2 h} \quad \text{Équation 24}$$

Où r est le rayon du comprimé (en cm).

Les courbes ainsi obtenues mettent en évidence des tendances différentes en fonction des lyophilisats (**Figure 74**). À faibles pressions et jusqu'à 100 MPa, le FD T5% affiche la plus faible masse volumique, suivi du FD T10% et du FD T15%, et enfin le FD T30% avec la masse volumique la plus élevée. En revanche, à mesure que la pression de compression augmente, les masses volumiques semblent converger vers des valeurs similaires. La même tendance est observée avec le FD lactose, mais contrairement au tréhalose lyophilisé, les différences sont observées sur toute la plage de pression étudiée avec un effet plus marqué aux faibles pressions (pressions inférieures à 100 MPa). Il semble qu'à basse pression, les propriétés des poudres présentant différents pourcentages en excipient soient légèrement distinctes, mais ce comportement tend à s'atténuer à mesure que la pression augmente.

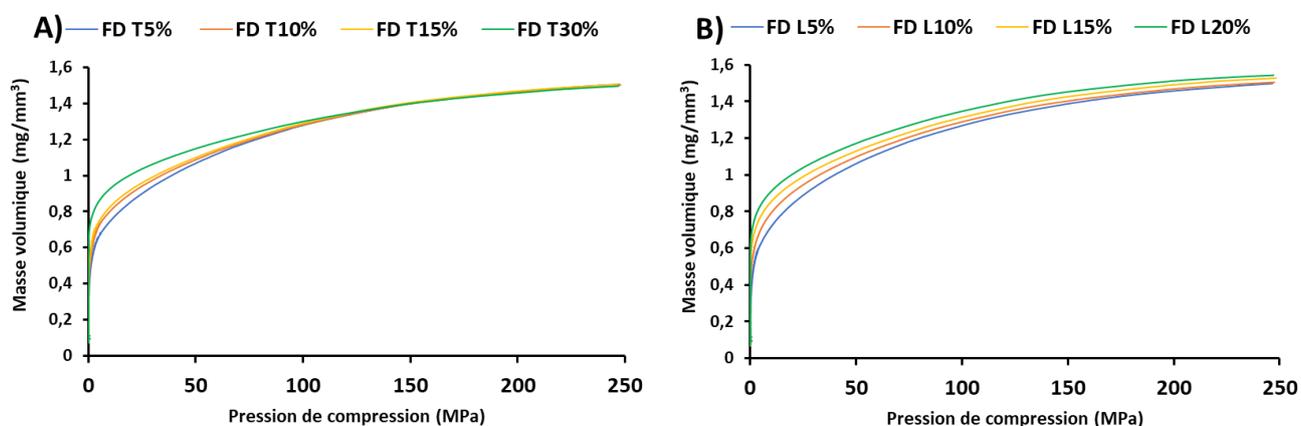


Figure 74 – Variation de la masse volumique « in-die » en fonction de la pression de compression pour le FD tréhalose (A) et le FD lactose (B) aux différentes concentrations.

5.3.2.2 Le recouvrement élastique (RE)

Après l'étude de la compressibilité, le recouvrement élastique des comprimés obtenus à partir des différentes poudres a été étudié. Les profils de recouvrement élastique des comprimés de FD tréhalose et de FD lactose à différentes pressions sont représentés sur la **Figure 75 A et B**.

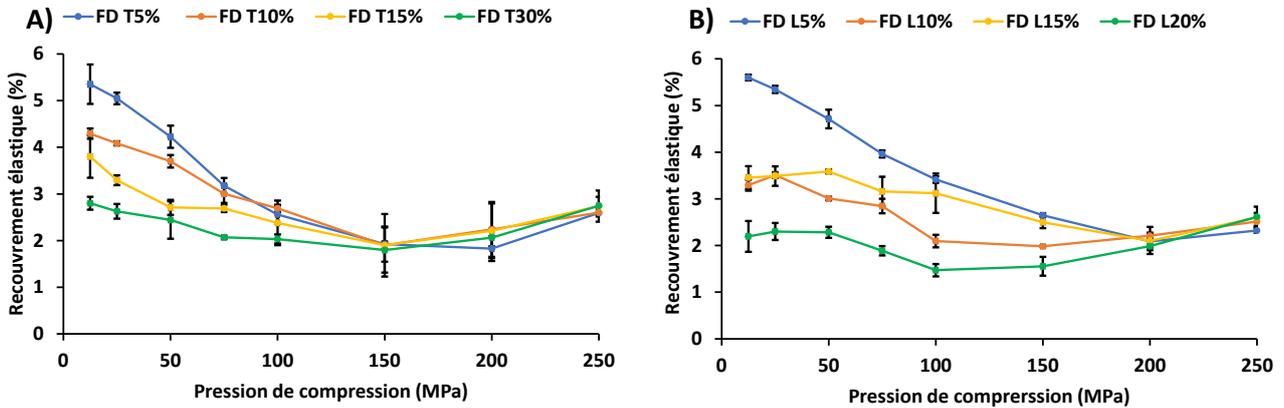


Figure 75 – Recouvrement élastique des comprimés de FD tréhalose (A) et de FD lactose (B) à différentes pressions de compression.

Les profils de recouvrement élastique illustrent une tendance similaire entre le tréhalose et le lactose. En effet, aux faibles pressions, le recouvrement élastique est d'autant plus élevé que le pourcentage en excipient est faible (**Figure 75 A et B**). Les comprimés de lyophilisats FD T5% et L5% présentent le recouvrement élastique le plus élevé à une pression de 12,5 MPa, suivis par ceux réalisés avec des concentrations de 10% et 15%. Enfin, les comprimés obtenus à partir des lyophilisats les plus concentrés présentent le recouvrement élastique le plus faible. Il est important de noter que ces valeurs de recouvrement élastique sont moins élevées que celles trouvées pour d'autres excipients couramment utilisés dans la compression pharmaceutique. Par exemple, la cellulose microcristalline, comprimée à faible pression (25 MPa), possède un recouvrement élastique de 10% (cf. paragraphe **3.3.3.5, Chapitre 3**), qui est le double du recouvrement élastique calculé pour le FD T5% ou le FD L5% à la même pression de compression.

À mesure que la pression augmente, cette différence diminue jusqu'à ce que le recouvrement élastique des comprimés des lyophilisats à différentes concentrations devienne similaire à partir de 150 MPa pour le tréhalose et 200 MPa pour le lactose (**Figure 75 A et B**).

Les résultats de recouvrement élastique obtenus dans cette étude suggèrent qu'une augmentation de la concentration d'un lyophilisat diminue le recouvrement élastique pour une pression de compression donnée. La diminution du recouvrement élastique peut, dans certains cas, être favorable pour l'obtention de comprimés. Cependant, son influence finale sur les propriétés des comprimés doit

être interprétée à la lumière d'autres propriétés en compression. Par conséquent, il est important de caractériser d'avantage le comportement en compression de ces poudres à travers d'autres caractérisations mécaniques.

5.3.2.3 L'énergie plastique (EP)

L'énergie plastique de toutes les poudres comprimées est représentée sur la **Figure 76**. Comme précédemment mentionné, l'énergie plastique représente l'énergie totale transférée à une poudre lors du cycle de compression. Cette énergie a été normalisée par le volume du solide comprimé afin de permettre la comparaison des produits présentant différentes masses volumiques.

Pour une pression donnée, les résultats mettent en évidence que l'énergie plastique est d'autant plus élevée que la concentration en excipient est faible (**Figure 76 A et B**). Comme observé avec la compressibilité, cet effet est plus prononcé pour le lactose que pour le tréhalose.

Une fois de plus, il semble que la texture influence l'énergie plastique, car même si tous les produits sont amorphes après lyophilisation (à l'exception du FD T30%), la modification de la texture des lyophilisats, comme observée en microscopie électronique à balayage, semble suffire à entraîner une diminution des valeurs de l'énergie plastique pour une pression donnée, comme le montre les profils (**Figure 76 A et B**).

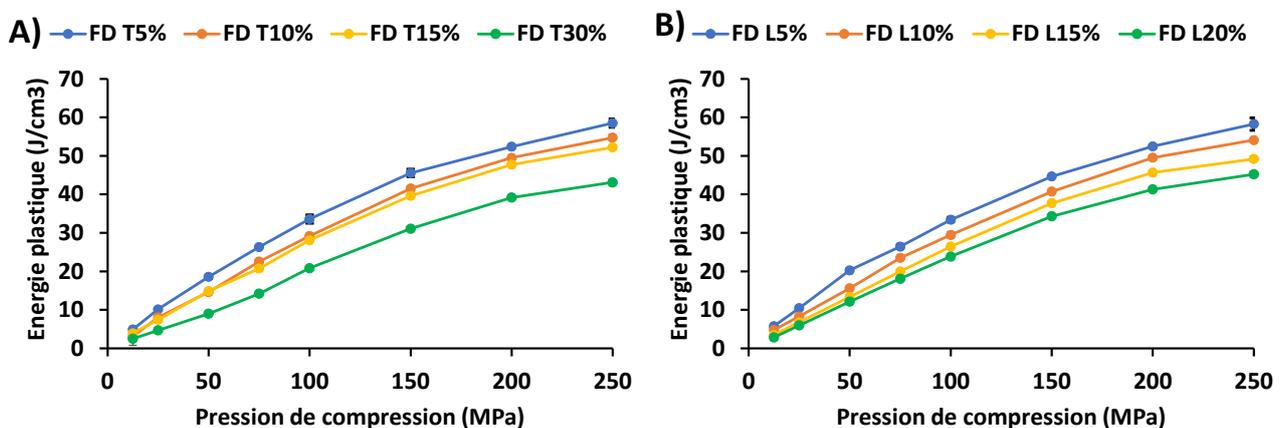


Figure 76 – Energies plastiques du FD tréhalose (A) et du FD lactose (B) à différentes concentrations.

5.3.2.4 La tablétabilité

L'analyse de la tablétabilité des poudres a été entreprise dans le but d'étudier l'effet des différentes concentrations en excipients sur la résistance mécanique des comprimés de lyophilisats. Préalablement, il avait été observé que les comprimés de FD T5% et FD L5% présentaient une résistance mécanique élevée ($\sigma \approx 2$ MPa) dès les pressions de compression faibles (inférieures à 50 MPa), mais qu'au-delà d'une certaine pression, des fissures apparaissaient sur les comprimés, entraînant une variabilité des valeurs mesurées et une baisse de la résistance mécanique.

Les poinçons de compression de 10 mm de diamètre ont été remplacés par des poinçons de 11 mm de diamètre, les poinçons de 10 mm ayant été endommagés au cours de l'étude. Pour mémoire, les tests de tablétabilité sur le FD T5% et FD L5% avaient été réalisés en utilisant des poinçons de 10 mm (cf. **Chapitre 4**), mais le fait d'interpréter les résultats en utilisant les contraintes de rupture et non pas les forces permet de s'affranchir raisonnablement des effets de géométrie et permet théoriquement une comparaison des résultats de tablétabilité. Malgré tout, afin de s'affranchir de tout biais expérimental dans la comparaison des profils de tablétabilité des comprimés obtenus avec des poudres de différentes concentrations, le test de résistance à la rupture a été répété pour les FD T5% et FD L5% en utilisant les poinçons de 11 mm.

Dans un premier temps, une comparaison des profils de tablétabilité du FD T5% et FD L5% produits avec différentes tailles de poinçons a été réalisée (**Figure 77**) afin de vérifier l'impact du diamètre du poinçon sur le test de tablétabilité. Dans le cas du FD tréhalose, des séries complètes de mesures ont été répétées à trois reprises en utilisant des poinçons de 10 mm et une série complète a été effectuée avec des poinçons de 11 mm. L'étude sur le lactose (FD L5%) a été réalisée une fois à l'aide des poinçons de 10 mm et une fois par l'intermédiaire des poinçons de 11 mm. Dans la légende de la **Figure 77**, (1), (1.1) et (1.2) représentent les profils obtenus avec des comprimés réalisés avec le poinçon de 10 mm de diamètre et (2), les valeurs pour les comprimés produits avec le poinçon de 11 mm de diamètre.

Les différents profils de tablétabilité (1), (1.1) et (1.2) du FD T5% (**Figure 77**), tous réalisés dans les mêmes conditions expérimentales, montrent qu'il y a une grande variabilité d'une série expérimentale à une autre. Ces profils montrent que pour les trois manipulations, le FD T5% acquiert une forte cohésion avec une variabilité acceptable aux faibles pressions (jusqu'à 50 MPa). A partir de 50 MPa et plus encore de 75 MPa, les variabilités des mesures augmentent, et les contraintes de ruptures au sein d'une même manipulation et entre les différentes manipulations deviennent très variables. Ces résultats sont très probablement liés au développement de fissures aléatoirement au sein des comprimés comme décrit dans le (cf. **Chapitre 4** paragraphe **4.3.4.4**). De plus, il est possible de visualiser autant de variabilité entre les manipulations réalisées avec des poinçons de 10 mm qu'entre celles réalisées à l'aide des poinçons de 10 et de 11 mm, donc il ne semble pas que la taille du

poinçon ait un effet dominant sur le profil. Un résultat identique a été obtenu dans le cas du FD L5% (**Figure 77 B**) où une grande variabilité de mesure est observée quel que soit la taille du poinçon utilisé. On peut donc considérer que les valeurs au-dessus de 50 MPa sont sujettes à caution en termes de variabilité quel que soit l'excipient lyophilisé (tréhalose ou lactose). Ce résultat appuie encore une fois les résultats discutés dans le **Chapitre 4**, où on a visualisé un effet de la structure amorphe sur le développement aléatoire de fissures sur des comprimés produits à des pressions relativement élevées (> 50 MPa).

A ce stade, la raison et le mécanisme de formation des fissures sont encore inconnus, ce qui peut justifier la faible reproductibilité des résultats entre les différentes manipulations.

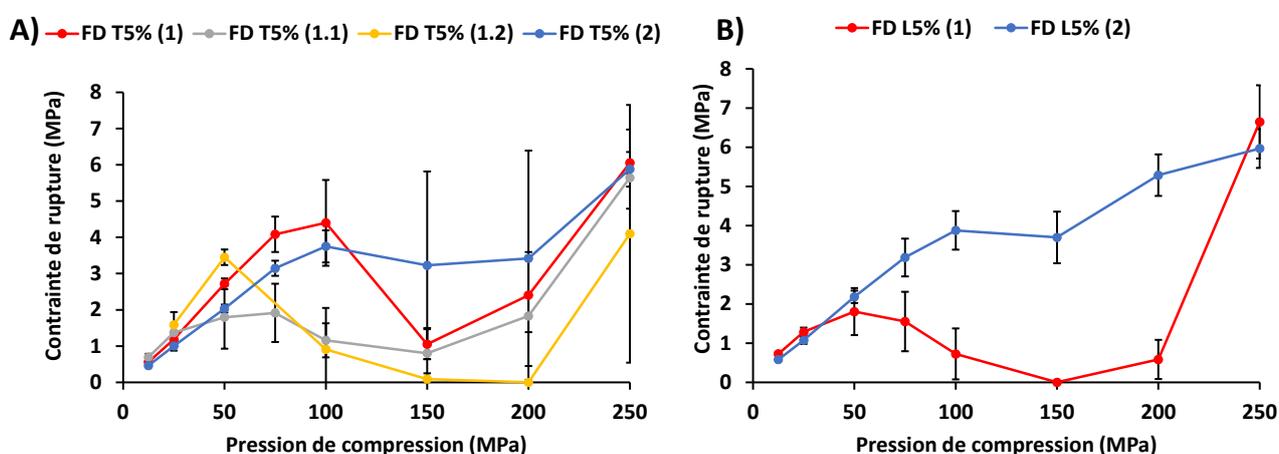


Figure 77 – Profils de tablétabilité (24 heures après compression) du FD T5% (A) et du FD L5% (B). (1), (1.1) et (1.2) représentent les résultats obtenus avec les comprimés de 10 mm. (2) représente les résultats obtenus avec les comprimés de 11 mm de diamètre.

Les profils de tablétabilité des comprimés issus du FD T5% et du FD L5% ont ensuite été comparés à ceux réalisés avec des systèmes lyophilisés de concentrations plus élevées, 24 heures après compression (**Figure 78**). Pour cette comparaison, les profils de tablétabilité réalisés avec des poinçons de 11 mm (FD T5% (2) et FD L5% (2)) ont été choisis car tous les autres profils ont été réalisés avec la même taille de poinçons. Cependant, comme évoqué précédemment, il est important de rappeler ici, que les expériences visant à déterminer le profil de tablétabilité d'une poudre lyophilisée amorphe, peut présenter une variabilité significative entre chaque réplique d'une même expérience à partir d'un certain seuil de pression (**Figure 77**).

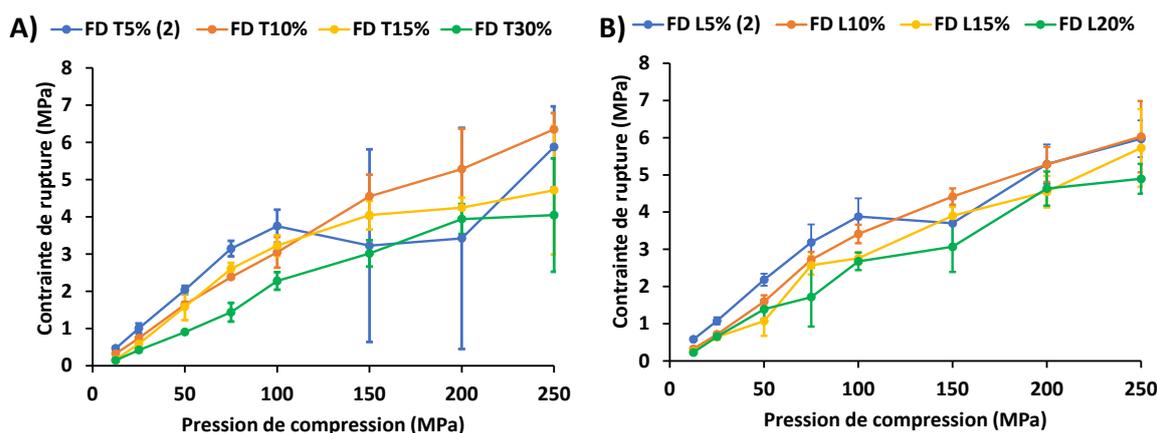


Figure 78 – Profils de tablétabilité (24 heures après compression) du FD tréhalose (A) et de FD lactose (B) à différentes concentrations. Dans la légende, (2) représente les valeurs pour les comprimés produits avec le poinçon de 11 mm de diamètre.

Pour le tréhalose et le lactose, les résultats indiquent que les comprimés de FD T5% et FD L5% présentent des contraintes de rupture légèrement supérieures à celles de tous les autres excipients plus concentrés, dans une plage de pressions de compression allant de 12,5 à 100 MPa (**Figure 78 A et B**). Ainsi, une augmentation de la concentration en excipients semble entraîner une légère diminution de la résistance à la rupture des comprimés dans cette gamme de pressions de compression. Il est à noter que pour les FD tréhalose et lactose à 10 et 15 % la résistance mécanique des comprimés est à une valeur de 1,5 MPa pour des pressions de compression appliquées de 50 MPa, ce qui reste un résultat intéressant. De plus, les résultats montrent une amélioration de la reproductibilité des mesures de résistance mécanique pour les comprimés obtenus à des pressions élevées surtout dans le cas du tréhalose sans pour autant résoudre totalement le problème de la variabilité observée à des pressions élevées pour les FD 5%. En résumé, dans la plage de pressions d'intérêt (inférieures à 75 MPa), quand la concentration en excipient augmente, les résultats montrent qu'il est nécessaire d'augmenter la pression de compression pour atteindre le même niveau de contrainte de rupture. Les comprimés de tous les lyophilisats testés conservent toutefois leurs propriétés de forte cohésion dès de faibles pressions de compression (< 50 MPa). L'augmentation de la concentration ne résout pas entièrement le problème de variabilité observé à des pressions élevées.

5.3.2.5 Le BFI (Brittle Fracture Index)

Dans la poursuite de l'étude, le test BFI a été effectué sur l'ensemble des comprimés. Comme mentionné précédemment, le BFI est un indicateur de la fragilité des comprimés. Plus le BFI est élevé, plus le matériau cèdera facilement sous l'effet d'une contrainte localisée. On peut donc

supposer qu'il sera alors plus sensible par exemple au décalottage. Les résultats antérieurs ont montré que les comprimés de FD T5% et FD L5% présentaient des valeurs de BFI très élevées (respectivement 1,90 et 1,62) pour les comprimés produits à une pression de compression relativement faible (25 MPa), ce qui témoigne d'une fragilité significative pour ce type de comprimé. Les résultats du BFI pour toutes les autres compositions de comprimés sont présentés dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 – Valeurs de BFI des différents comprimés étudiés.

Echantillon	Pression de compression	BFI
FD T5%	25 MPa	1,90 ± 0,17
FD T10%	50 MPa	2,06 ± 0,45
FD T15%	50 MPa	1,38 ± 0,10
FD T30%	50 MPa	0,72 ± 0,07
FD L5%	25 MPa	1,60 ± 0,49
FD L10%	50 MPa	2,18 ± 0,37
FD L15%	50 MPa	1,73 ± 0,15
FD L20%	50 MPa	2,02 ± 0,45

La valeur du BFI du FD T5% ($1,9 \pm 0,17$) obtenue dans le **Chapitre 4** et utilisée dans ce chapitre diffère considérablement du BFI du FD tréhalose ($1,12$) calculé dans le **Chapitre 3**. Cette disparité peut s'expliquer en examinant les contraintes de rupture des comprimés non perforés et perforés obtenues lors de ces deux manipulations distinctes. En effet, les résultats révèlent que pour le BFI de 1,9, les contraintes de rupture des comprimés non perforés et perforés étaient respectivement de $1,58 \pm 0,08$ MPa et de $0,32 \pm 0,02$ MPa. En ce qui concerne le BFI de 1,12, les contraintes de rupture trouvées étaient de $1,46 \pm 0,13$ MPa et de $0,5 \pm 0,06$ MPa respectivement pour les comprimés non perforés et perforés. En comparant ces valeurs et en tenant compte de la variabilité des mesures, elles sont malgré tout relativement proches, mais suffisantes pour entraîner une différence importante sur le calcul du BFI. En termes d'interprétation, ces différences ne changent pas le résultat en termes de comportement, un BFI supérieur à 1 indique une grande fragilité des comprimés, et de légères

variations des contraintes de rupture peuvent entraîner des écarts significatifs dans son calcul sans pour autant modifier le caractère fragile des comprimés.

Tous les échantillons ont été comprimés à une pression minimale permettant de les perforer sans les fracturer et entraîner la formation de fissures à proximité du trou. Le **Tableau 15** révèle qu'à l'exception des comprimés de FD T30%, quelle que soit la concentration des lyophilisats, tous les comprimés ont présenté des valeurs de BFI élevées (valeurs supérieures à 1), ce qui témoigne de leur grande fragilité. En revanche, les comprimés de FD T30% qui présentent une cristallinité partielle, affichent un BFI de $0,72 \pm 0,07$ (**Tableau 15**), similaire à celui des comprimés de tréhalose CCP ($0,83 \pm 0,01$) comprimés à 250 MPa. Ces résultats soulignent une fois de plus que la texture spécifique des lyophilisats amorphes est responsable du caractère fragile accru des comprimés, et que l'augmentation de la concentration en excipients dans les formulations ne modifie pas ce comportement. En revanche, lorsque le lyophilisat est partiellement cristallin, le BFI des comprimés est significativement influencé et tend vers celui de la poudre cristalline, rendant les comprimés moins fragiles. Ainsi, l'augmentation du pourcentage d'excipient dans les formulations ne semble pas modifier le caractère fragile des comprimés lorsque la poudre demeure amorphe après lyophilisation.

5.3.3 Etude de l'écoulement des poudres lyophilisées

Comme mentionné dans le **Chapitre 1**, l'écoulement d'une poudre est une caractéristique essentielle pendant le processus de compression. Pendant la compression, le remplissage de la matrice s'effectue par gravité ou de façon plus ou moins forcée, à travers une trémie d'alimentation. Ainsi, une poudre présentant un faible écoulement peut entraîner des difficultés de remplissage de la matrice lors de la fabrication de comprimés, ce qui a été le cas de nos poudres lyophilisées préparées à partir d'une solution à 5% m/v d'excipient. Pour pouvoir réaliser les comprimés, les poudres FD T5% et FD L5% étaient introduites manuellement dans la matrice de compression après broyage manuel dans un mortier. En effet, ces poudres, avaient une texture spécifique (feuilletés) et une masse volumique apparente faible qui n'étaient pas optimales pour un bon écoulement. De plus, ces poudres avaient tendance à adhérer aux parois de la trémie d'alimentation, ce qui compliquait le processus d'alimentation de la matrice et de compression. Sachant par ailleurs que ces poudres sont très hygroscopiques, la moindre augmentation de l'humidité pouvait avoir des effets sur l'apparence générale de ces poudres : elles devenaient de plus en plus collantes ce qui compliquait encore plus l'écoulement et ce qui nous a obligé à travailler en atmosphère rigoureusement contrôlée en humidité.

L'augmentation de la concentration des excipients dans les formulations, et donc l'augmentation de la masse volumique vrac de la poudre produite était à priori susceptible d'améliorer leurs propriétés d'écoulement. Pour explorer cette possibilité, une étude sur l'aptitude à l'écoulement des poudres lyophilisées générées à partir des solutions de concentration croissante en lactose a été menée à

l'aide d'une cellule de cisaillement annulaire (PFT-610, Powder Flow tester, Brookfield, Inde). L'étude n'a été réalisée que sur le lactose lyophilisé après broyage à l'aide d'un mortier, en raison de contraintes de disponibilité de quantités suffisantes de tréhalose.

L'essai de cisaillement permet de mesurer la limite de rupture sous cisaillement d'un lit de poudre après consolidation sous une contrainte normale (2.9.49. powder flow properties, European pharmacopoeia 11.5). L'essai consiste à appliquer à la poudre contenue dans la cellule une contrainte normale verticale σ puis générer une déformation de cisaillement en appliquant au couvercle de la cellule un mouvement de rotation horizontal par rapport à la base de la cellule contenant la poudre consolidée, à vitesse constante. Il en résulte une contrainte de cisaillement horizontale τ au sein du lit de poudre. Ces mesures permettent de tracer le lieu de rupture puis les cercles de Mohr (cercles de consolidations) qui permettent d'obtenir σ_1 (la contrainte de consolidation) et σ_c (la résistance à la compression). Cet essai est détaillé dans la pharmacopée européenne (monographie 2.9.49, caractérisation des propriétés rhéologiques des poudres par cisaillement).

La fonction d'écoulement peut être utilisée pour caractériser l'écoulement d'une poudre en utilisant le facteur d'écoulement (ou indice d'écoulement) ff_c (**équation 25**).

$$ff_c = \frac{\sigma_1}{\sigma_c} \text{ Équation 25}$$

Où σ_1 représente la contrainte de consolidation (kPa) et σ_c représente la résistance en compression (kPa).

Plus la valeur de l'indice d'écoulement est élevée, meilleur est l'écoulement de la poudre. L'échelle représentée dans le **Tableau 16** permet d'évaluer l'aptitude à l'écoulement de la poudre.

Les résultats de l'étude d'écoulement sur les FD L5, 10, 15 et 20% sont représentés sur le diagramme (σ_1, σ_c), avec les frontières des classes d'aptitude à l'écoulement, affichées par des droites qui représentent chacune une valeur constante de l'indice d'écoulement ff_c (**Figure 79**).

Les fonctions d'écoulement obtenues pour tous les lyophilisats de lactose sont similaires et se situent toutes à l'interface entre une poudre très cohésive et cohésive (**Figure 79**). Ces résultats indiquent que les poudres présentent un mauvais écoulement, et que la modification du pourcentage d'excipient dans les solutions de lyophilisation n'a eu aucun impact sur l'écoulement.

Tableau 16 – Echelle de classification du comportement en écoulement des poudres.

Facteur d'écoulement	Comportement en écoulement de la poudre
$ff_c < 1$	Poudre ne s'écoulant pas
$1 < ff_c < 2$	Poudre très cohésive
$2 < ff_c < 4$	Poudre cohésive
$4 < ff_c < 10$	Poudre s'écoulant facilement
$ff_c > 10$	Matériaux s'écoulant librement

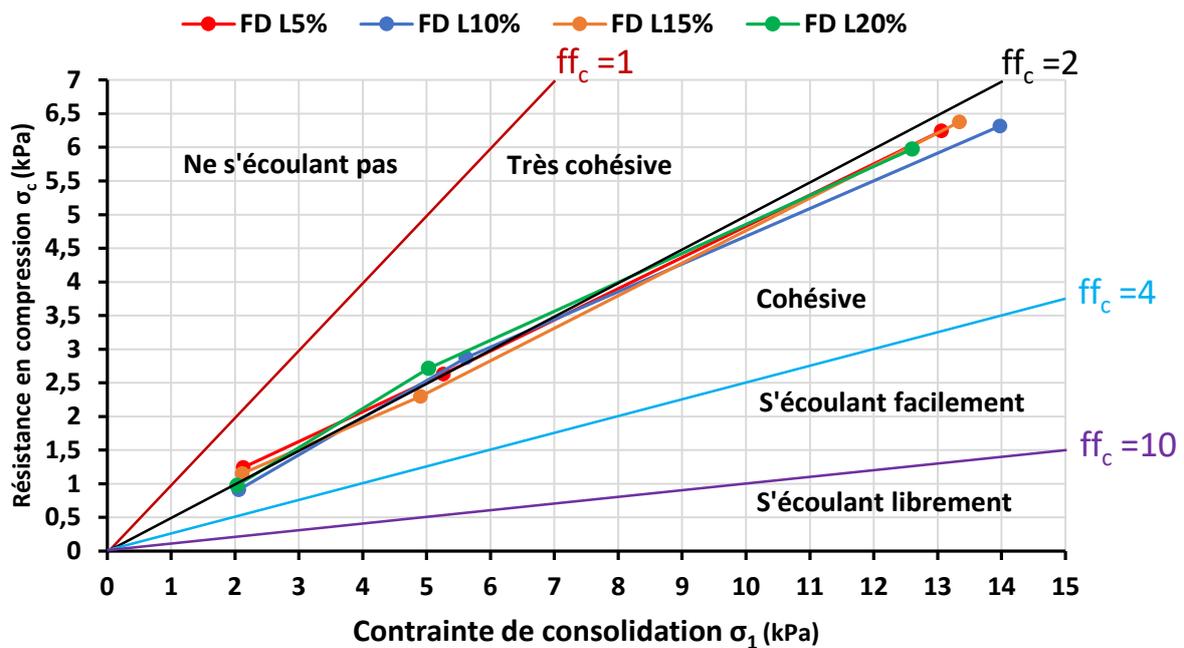


Figure 79 – Représentation des fonctions d'écoulement du FD L5, 10, 15 et 20% et des droites de l'indice d'écoulement constant ($ff_c=1$ en rouge, $ff_c=2$ en noir, $ff_c=4$ en bleu, $ff_c=10$ en violet).

5.4 Conclusion

Dans cette section, nous avons examiné les propriétés mécaniques du tréhalose et du lactose lyophilisés mais en faisant varier les concentrations des solutions de lyophilisation. Les analyses physico-chimiques ont révélé que les échantillons demeuraient amorphes après lyophilisation, à l'exception du FD T30% qui présentait une cristallinité partielle. De plus, la modification de la concentration en excipient a affecté la texture des lyophilisats (épaisseur des feuillets), leur masse volumique pycnométrique et leur surface spécifique.

Ces modifications physico-chimiques n'ont pas eu de répercussions significatives sur le comportement en compression. Les courbes de compressibilité, de recouvrement élastique et d'énergie plastique n'ont été que légèrement modifiées en fonction de la concentration en excipients. Les courbes de tabléabilité ont révélé qu'une augmentation de la concentration en excipient entraînait une légère diminution de la contrainte de rupture et une amélioration de la reproductibilité des mesures à des pressions élevées. Ces résultats indiquent que, dans la plage de pression d'intérêt (25 à 75 MPa), la résistance à la rupture n'a pas été significativement impactée. Cette amélioration de la reproductibilité des mesures à des pressions élevées permettrait donc d'élargir l'intervalle de pressions pouvant être utilisé pour la compression notamment dans de futures applications industrielles. De plus, les calculs de BFI ont montré que les comprimés demeuraient fragiles même après l'augmentation de la concentration en excipients dans les formulations. Par ailleurs, l'étude de l'écoulement des lyophilisats a révélé que l'augmentation de la concentration en excipient n'avait pas permis d'améliorer l'écoulement.

Toutefois, cette partie de l'étude n'est pas vaine, car elle ouvre à des possibilités d'utiliser des solutions plus ou moins concentrées en cryoprotecteurs pour la réalisation de comprimés. Ces résultats pourront être utilisés dans l'avenir s'il s'avère nécessaire de réaliser des systèmes plus ou moins enrichis en cryoprotecteurs. De plus, bien que l'ajustement de la concentration dans les formulations n'ait pas suffi à améliorer les propriétés d'écoulement des poudres, d'autres stratégies peuvent être envisagées pour atteindre l'objectif fixé. Par exemple, l'ajout d'une étape de granulation sèche après lyophilisation ou le mélange des poudres lyophilisées avec des excipients pour compression directe pourraient être des solutions à envisager pour améliorer les propriétés d'écoulement des poudres lyophilisées. Au moment de l'écriture de ce mémoire, des essais en ce sens sont entrepris mais les résultats sont trop préliminaires pour être développés.

L'objectif principal de cette partie était de modifier les formulations pour améliorer les propriétés d'écoulement des lyophilisats et éliminer le remplissage manuel de la matrice de compression. Etant donné que l'écoulement des poudres lyophilisées n'a pas été amélioré et que les propriétés mécaniques n'ont pas été significativement modifiées par rapport aux lyophilisats issus d'une solution contenant 5% (m/v) d'excipient, il a été choisi de garder cette composition pour incorporer une

biomolécule dans les poudres lyophilisées. La prochaine étape consistera à étudier l'impact de la lyophilisation et de la compression sur l'activité biologique des biomolécules avec les formulations initiales contenant 5% (m/v) d'excipient dans la solution de lyophilisation.

Chapitre 6. Etude de l'effet des procédés de lyophilisation et de compression sur l'activité biologique d'une protéine modèle : la lactate déshydrogénase

SOMMAIRE

6.1	Introduction.....	192
6.2	Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 6	194
6.3	Résultats et discussions	195
6.3.1	Influence du tréhalose sur l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation et compression.....	195
6.3.2	Influence du lactose sur l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation et compression.....	198
6.3.3	Influence du mannitol sur l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation et compression.....	200
6.3.4	Lyophilisation de la LDH en présence de tréhalose à différentes concentrations	201
6.4	Conclusion sur l'effet de la lyophilisation et de la compression sur l'activité de la LDH	203
6.5	Etude de stabilité	204
6.5.1	Analyse de l'activité enzymatique de la LDH en solution	204
6.5.2	Etude de la stabilité de la LDH après lyophilisation et compression.....	205
6.6	Conclusion sur l'étude de stabilité	207

6.1 Introduction

Comme déjà discuté, notre étude vise à produire des comprimés à partir de poudres lyophilisées contenant des biomolécules tout en préservant leur activité biologique. Cet objectif est d'autant plus important actuellement que certaines protéines, telles que la semaglutide, la plecanatide et la desmopressine, ont déjà été approuvées pour être administrées par voie orale sous forme de comprimés. De plus, d'autres protéines sont actuellement en phase II ou III d'études cliniques (Haddadzadegan et al., 2022).

Ainsi, après avoir étudié les caractéristiques physico-chimiques de différents excipients lyophilisés (tréhalose, lactose, mannitol et saccharose) et leur comportement lors de la compression, il est nécessaire à ce stade d'incorporer une protéine modèle dans nos formulations afin d'évaluer l'effet des différents procédés sur son activité biologique.

La protéine modèle choisie pour notre étude sera une enzyme, la lactate déshydrogénase (LDH). En se basant sur les résultats des caractérisations effectuées dans les **chapitres 3, 4 et 5**, les trois excipients qui ont été retenus sont le tréhalose, le lactose et le mannitol. Le saccharose a été exclu de notre étude en raison de la variabilité élevée des résultats observée en compression pour la poudre lyophilisée. Les résultats du **Chapitre 5** ont montré qu'une augmentation du pourcentage d'excipient dans les formulations n'affectait pas significativement les propriétés mécaniques des poudres et n'était pas suffisante pour améliorer leurs propriétés d'écoulement. Par conséquent, les formulations utilisées dans ce chapitre seront identiques à celles des **chapitres 3 et 4**, à savoir, des formulations avec une concentration à 5% m/v en excipient.

La lyophilisation des biomolécules a déjà été largement étudiée dans la littérature (Al-Hussein and Gieseler, 2012; Bedu-Addo, 2004; Busignies et al., 2020; Hsein et al., 2022; Kawai and Suzuki, 2007; Oori et al., 2018; Schersch et al., 2010). Ces études ont montré que la préservation de l'activité et de la structure d'une biomolécule peut dépendre de divers facteurs tels que les paramètres de formulation (types et quantité d'excipients), le type de la protéine choisie, ainsi que les paramètres du cycle de lyophilisation choisi.

De plus, il a été démontré dans la littérature que la compression pouvait avoir une influence sur l'activité biologique des biomolécules. Klukkert et al. ont montré que la compression entre 40 et 382 MPa induisait des changements conformationnels dans la structure tridimensionnelle de la trypsine et avait donc un impact délétère sur l'activité enzymatique de cette dernière (Klukkert et al., 2015). En revanche, Wei et al. ont démontré que l'activité enzymatique du lysozyme était entièrement conservée, même après une compression à 200 ou 300 MPa (Wei et al., 2019). Une autre étude visant à développer des anticorps thérapeutiques sous forme de comprimés à partir d'une poudre lyophilisée (contenant 100 mg d'anticorps, du saccharose, du polysorbate 80 et de l'inuline) a montré que, dans les conditions opératoires de l'étude (non spécifiées dans la publication), la compression

n'avait aucun effet sur les fonctions biologiques de l'anticorps (Maurer et al., 2016). En terme de stabilité, cette étude révèle qu'après 16 mois de stockage à température ambiante, plus de 80 % de l'activité biologique de l'anticorps était maintenue (Maurer et al., 2016). Cependant, une autre étude menée par Lu et al. visant à étudier l'effet de la compression sur l'activité biologique d'anticorps a démontré que l'application de pressions de compression entre 50 et 350 MPa, induisait une diminution significative (entre 7 et 43%) de l'activité biologique des anticorps (Lu et al., 2021). En revanche, la diminution d'activité s'est avérée aléatoire et non dépendante de la pression (par exemple, une perte d'activité biologique plus importante a été retrouvée quand la poudre a été comprimée à 50 MPa que quand elle a été comprimée à 350 MPa).

Une autre étude menée par Eriksson et al. a démontré que l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, après lyophilisation en présence de 10 % m/v de tréhalose ou d'inuline et après compression à 110 MPa, était préservée. Sans excipient, la phosphatase alcaline perdait 95 % de son activité après lyophilisation, mais l'ajout de tréhalose ou d'inuline permettait la préservation de toute son activité même après compression (Eriksson et al., 2002).

Les études citées ci-dessus montrent une conservation de l'activité biologique des biomolécules étudiées ou une perte de l'activité après lyophilisation et compression. Pour compléter ces recherches, ce chapitre examinera donc l'influence du processus de lyophilisation et de la compression de la poudre lyophilisée sur l'activité enzymatique de la LDH (lactate déshydrogénase). Nous ferons varier plusieurs paramètres, notamment les paramètres de formulation (utilisation de divers excipients), les paramètres du cycle de lyophilisation et les paramètres de compression (variation de la pression de compression), afin de déterminer si la LDH peut conserver son activité enzymatique dans toutes les conditions explorées. Ce chapitre vise donc à étudier les parties suivantes :

- 1) L'étude de l'effet des cycles de lyophilisation « conservateur » et « agressif » sur l'activité enzymatique de la LDH.
- 2) L'étude de l'influence de la formulation (utilisation de tréhalose, lactose et mannitol) sur la conservation de l'activité enzymatique après lyophilisation et compression.
- 3) L'étude de l'influence de l'augmentation de la concentration de la LDH dans les formulations sur l'activité enzymatique de cette dernière.
- 4) L'étude de la stabilité des lyophilisats et des comprimés contenant de la LDH après stockage à différentes températures sur plusieurs mois.

6.2 Matériels et méthodes spécifiques au chapitre 6

Les différents excipients utilisés dans cette partie sont été le tréhalose cristallin (Biohale, Kyoto, Japon), le lactose cristallin (Supertab 30 Gr, BFE Pharma, Coch, Allemagne) et le mannitol (Cooper, Melun, France). La lactate déshydrogénase (LDH) (Lactate dehydrogenase, Porcine Heart, EMD millipore corporation, Temecula, Californie, Etats-Unis) a été choisie comme protéine modèle. Le dosage de la LDH a été réalisé à l'aide du kit de dosage CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega corporation, Madison, WI, Etats-Unis). L'activité enzymatique dans ce chapitre sera exprimée en pourcentage d'activité enzymatique par rapport à l'activité théorique indiquée par le fournisseur avant tout procédé de séchage et de compression.

L'influence des paramètres du procédé de lyophilisation sur l'activité de la protéine modèle a été étudiée en utilisant deux cycles de lyophilisation : un cycle « conservateur » et un cycle « agressif » (cf. paragraphe **2.2.1.1**). Les systèmes granulaires lyophilisés ont été obtenus par la lyophilisation de 1 ml de solution à 5% m/v de chacun des trois excipients dans des flacons en verre de 10 ml, partiellement bouchés par des bouchons en caoutchouc et placés sur la même étagère du lyophilisateur. En plus du choix de l'excipient, l'influence des paramètres de formulation a été évaluée en faisant varier la concentration en protéine dans les échantillons de 35 µg/ml à 1 mg/ml. Toutes les conditions expérimentales ont été réalisées en triplicat.

Le contenu de chaque flacon a été utilisé pour produire un comprimé d'une masse d'environ 45 mg. Le remplissage de la matrice a été effectué manuellement. Les comprimés ont été obtenus en utilisant des poinçons Euro B, ronds plats, de 6 mm de diamètre, lubrifiés en externe par du stéarate de magnésium (Peter Greven, Bad Münstereifel, Nordrhein-Westfalen, Allemagne).

6.3 Résultats et discussions

6.3.1 Influence du tréhalose sur l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation et compression

Les études dans la littérature montrent que la LDH peut être lyophilisée à partir de concentrations très faibles (12,8 µg/ml) (Iwai et al., 2007) jusqu'à des concentrations relativement élevées (2,5 mg/ml) (Izutsu and Kojima, 2002). Dans le cadre de notre étude, il a été décidé dans un premier temps de choisir une concentration relativement faible de LDH (35 µg/ml) pour initier nos expériences. L'influence de la température d'étagère lors de la sublimation a tout d'abord été étudiée en réalisant deux cycles de lyophilisation, un cycle « conservateur » et un cycle « agressif ». La température d'étagère appliquée lors de la dessiccation primaire était respectivement de -20 et + 25 °C pour ces deux cycles.

Lors du processus de lyophilisation des biomolécules, il est généralement préconisé de programmer la température d'étagère de manière à maintenir la température du produit pendant la dessiccation primaire environ 2 à 3 °C en dessous de la température de transition vitreuse (T_g'). Ceci est fait dans le but d'éviter le collapse du lyophilisat et de garantir la stabilité des biomolécules (Tang and Pikal, 2004). Cependant, des résultats contradictoires ont été relevés dans des études plus récentes. Par exemple, une recherche menée par Schersch et al. a conclu que le collapse n'avait aucun effet sur la stabilité des biomolécules après un cycle de lyophilisation « agressif » (Schersch et al., 2010). De même, une autre étude réalisée par Depaz et al. a montré qu'une température de produit plus élevée que la T_g' pendant la dessiccation primaire ne conduisait pas systématiquement au collapse des lyophilisats et n'avait aucun impact apparent sur la biomolécule lyophilisée dans ces conditions (Depaz et al., 2016).

Dans le cadre de notre propre étude, lors de la mise en œuvre de nos deux cycles de lyophilisation, il est apparu que la température du produit restait inférieure à la T_g' pendant plusieurs heures pendant la dessiccation primaire, que la température d'étagère soit réglée à -20 °C ou à +25 °C (cf. paragraphe **2.2.1.1**). Par la suite, une fois la glace partiellement sublimée, la température du produit dépassait la T_g' , mais aucun collapse n'a été détecté à la fin de la lyophilisation pour les deux types de cycles étudiés.

Les résultats du dosage de l'activité enzymatique de la LDH après les deux cycles de lyophilisation et après compression sont présentés dans la **Figure 80**.

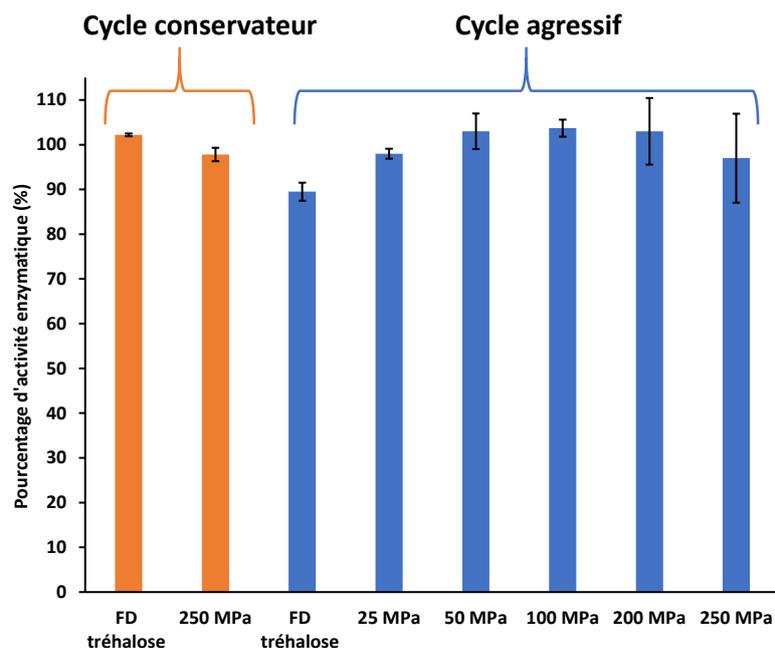


Figure 80 – Evaluation du pourcentage d'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation à l'aide d'un cycle conservateur ou d'un cycle agressif et après compression des poudres lyophilisées.

Les résultats montrent une préservation complète de l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation avec un cycle « conservateur ».

Cette observation diffère des conclusions de Kawai et al., qui ont constaté une perte de 40% de l'activité de la LDH après un cycle de lyophilisation impliquant une congélation dans l'azote liquide, suivi d'une dessiccation primaire à -25 °C en présence de 100 mg de tréhalose dans des formulations de 1 ml contenant 100 µg de LDH (Kawai and Suzuki, 2007).

Dans cette étude, les auteurs ont également étudié l'impact de la congélation par immersion dans l'azote liquide sur l'activité enzymatique de la LDH. Cette étude a montré que la congélation de la LDH sans ajout d'excipients a entraîné une perte de 20 % de son activité après décongélation. En revanche, l'ajout d'un excipient dans les formulations a permis de conserver l'intégralité de son activité enzymatique après décongélation (Kawai and Suzuki, 2007). La diminution de l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation dans cette étude pourrait donc être attribuée aux étapes de dessiccation primaire et secondaire, plutôt qu'à l'étape de congélation.

De plus, les résultats obtenus par Jiang et Nail diffèrent nettement de ceux de notre étude (Jiang et Nail, 1998). En effet, la LDH a été lyophilisée sans ajout d'excipients, en utilisant un cycle de lyophilisation « conservateur ». Leur cycle comprenait une congélation des formulations à -45 °C pendant 6 heures, suivie d'une dessiccation primaire à -30 °C pendant 24 heures et d'une dessiccation secondaire à 25 °C pendant 4 heures. Leur analyse a révélé que l'activité enzymatique de la LDH

dépendait de la concentration en LDH dans la formulation (Jiang and Nail, 1998). À une concentration de 20 µl/ml, la LDH avait perdu 50 % de son activité, tandis qu'à 100 µl/ml, elle n'en avait perdu que 20 %. Ces résultats suggèrent que lors de la lyophilisation de protéines sans ajout d'excipients, l'activité enzymatique est d'avantage maintenue lorsque la concentration de la protéine dans la solution est élevée (Jiang and Nail, 1998).

Ces deux études soulignent l'importance de deux paramètres dans le processus de lyophilisation. Premièrement, la congélation par immersion dans l'azote liquide doit être évitée, car même après lyophilisation en présence de tréhalose, la LDH perd 40 % de son activité (Kawai and Suzuki, 2007). En comparant le cycle de lyophilisation de cette étude à ceux utilisés dans notre recherche, il est intéressant de constater que dans notre cas, la congélation sur étagères suivie d'une dessiccation, qu'elle soit conservatrice ou agressive, a permis de préserver l'intégralité de l'activité enzymatique de la LDH. En revanche, dans leur étude, l'immersion dans l'azote liquide suivie d'une dessiccation conservatrice a entraîné une perte de 40 % de l'activité de la LDH. Il est donc probable qu'une immersion dans l'azote liquide avant l'étape de dessiccation ne soit pas appropriée pour la préservation de l'activité de la LDH.

Deuxièmement, les résultats de la deuxième étude soulignent l'importance d'utiliser un excipient lors de la lyophilisation d'une biomolécule, même dans des conditions conservatrices. En effet, dans des conditions de lyophilisation similaires à celles de notre étude, une perte d'activité enzymatique de la LDH entre 20 et 50 % a été observée dans toutes les formulations ne contenant pas d'excipients (Jiang and Nail, 1998), alors que dans nos conditions, la LDH a conservé 100 % de son activité après un cycle de lyophilisation « conservateur » en présence de tréhalose.

Concernant la compression des lyophilisats contenant de la LDH, nos résultats indiquent que même à une pression de compression très élevée (250 MPa), la LDH conserve toute son activité enzymatique (**Figure 80**). Dans la littérature, les effets de la compression sur les molécules biologiques ont déjà été étudiés. Par exemple, Klukkert et al. ont observé que la compression directe à des pressions entre 40 et 382 MPa de la trypsine bovine sous forme lyophilisée, avait un effet néfaste sur la protéine et entraînait une diminution de 1 à 7% de son activité enzymatique (Klukkert et al., 2015). Une autre étude portant également sur la compression directe des protéines a montré que leur activité pouvait être préservée, mais que la compression pouvait conduire à l'agrégation des protéines, même à de faibles pressions de compression (de l'ordre de 25 MPa) (Wei et al., 2019). Ainsi, il est possible que la préservation de l'activité biologique dépende du type de protéine et du choix des paramètres des procédés de lyophilisation et de compression.

Pour explorer d'avantage ce résultat, l'influence des paramètres du procédé lors de la lyophilisation a été évaluée en utilisant le cycle « agressif ». De plus, l'influence de la pression de compression a été évaluée en appliquant des pressions allant de 25 à 250 MPa.

Les résultats obtenus montrent une diminution de 10% de l'activité de la LDH après sa lyophilisation avec le cycle agressif (**Figure 80**). Cependant, après compression, quel que soit la pression appliquée (de 25 à 250 MPa), aucune diminution de l'activité enzymatique n'est observée par rapport à la condition lyophilisée.

Afin de vérifier la significativité de la perte de 10%, le coefficient de variation (CV) a été calculé sur les triplicats des différents échantillons étudiés. Les valeurs de CV ont atteint à plusieurs reprises la valeur de 10%. Cette variabilité est souvent observée pour les méthodes de dosage biologique. En se basant sur les valeurs de CV, il est raisonnable de considérer qu'il existe une marge de variabilité pouvant atteindre 10% dans les dosages, et qu'une perte de 10% reste dans la plage acceptable pour garantir la préservation totale de l'activité de la protéine.

Ces résultats confirment que la lyophilisation en présence de tréhalose, qu'elle soit effectuée avec un cycle « conservateur » ou « agressif », ainsi que la compression, n'ont aucun effet néfaste sur l'activité enzymatique de la LDH. En se basant sur ces résultats, il a été décidé de continuer la suite des expérimentations avec le cycle agressif afin de réduire significativement la durée des cycles de lyophilisation.

6.3.2 Influence du lactose sur l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation et compression

L'étude de l'influence des paramètres de formulation a été poursuivie en utilisant cette fois le lactose en tant qu'excipient de lyophilisation. Le choix du lactose permet d'évaluer l'influence de l'utilisation d'un sucre réducteur comme cryo et lyoprotecteur. En effet, le lactose, en tant que sucre réducteur, peut générer des instabilités de la protéine au cours et/ou après la lyophilisation en raison de possibles réactions de glycation (réaction de Maillard). C'est la raison pour laquelle il est généralement exclu des formulations contenant des protéines thérapeutiques.

Les mêmes conditions de formulation que celles décrites pour le tréhalose ont été appliquées en utilisant uniquement le cycle « agressif » pour la lyophilisation. Après lyophilisation, des comprimés ont été produits à différentes pressions (25 à 250 MPa). L'activité enzymatique de tous les échantillons (lyophilisats et comprimés) a ensuite été mesurée. Les résultats de cette étude sont présentés sur la **Figure 81**.

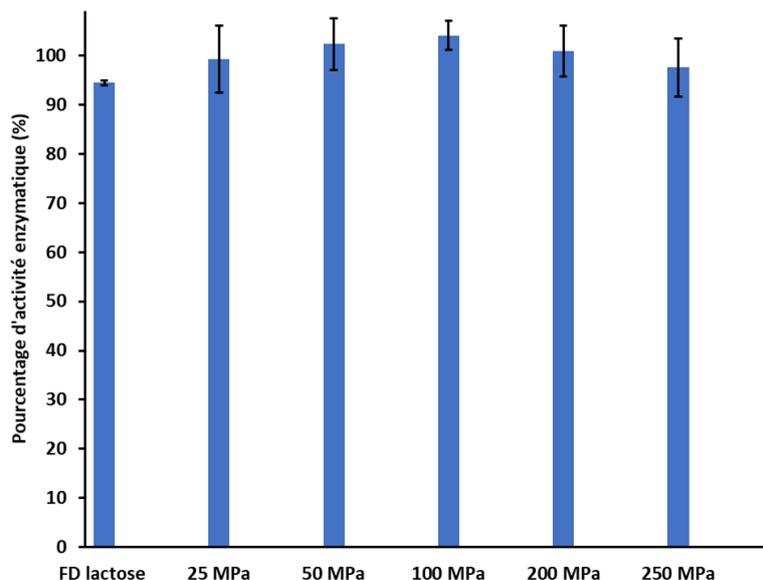


Figure 81 – Evaluation du pourcentage de l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation (cycle agressif) en présence de lactose et après compression de la poudre lyophilisée (FD lactose) à différentes pressions.

Les résultats montrent que 95% de l'activité enzymatique de la LDH a été conservée après lyophilisation en présence de lactose et que 100% de son activité est conservée après compression des lyophilisats. Ce résultat est similaire à celui obtenu avec le tréhalose. Comme pour le tréhalose, une certaine variabilité des mesures est observée (les coefficients de variations calculés varient entre 0,5 et 6 %). En tenant compte de cette variabilité, il est possible de conclure que l'activité de la LDH après lyophilisation en présence de lactose est entièrement préservée et que la compression des lyophilisats n'entraîne aucune perte d'activité.

Cependant, des études antérieures ont montré qu'une lyophilisation en présence de lactose pur peut entraîner une perte d'activité de la LDH allant de 40% (Kawai and Suzuki, 2007) à 60% (Steven J Prestrelski et al., 1993a). Dans ces deux études, la congélation a été réalisée par immersion à l'azote liquide. Il est possible, une fois de plus, que ce paramètre ne soit pas optimal pour conserver l'activité de la LDH. Pour confirmer l'efficacité du lactose en tant que stabilisateur de l'activité de la LDH, une étude de stabilité sur plusieurs mois a été réalisée en comparant le lactose et le tréhalose en tant qu'excipients de formulation. Les résultats de cette étude sont présentés à la fin de ce chapitre.

6.3.3 Influence du mannitol sur l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation et compression

Pour compléter l'étude de l'influence des paramètres de formulation sur l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation et compression, le mannitol a été sélectionné comme excipient. Le choix du mannitol avait pour but d'évaluer l'influence de l'utilisation d'un excipient maintenu cristallin après lyophilisation. Il était attendu qu'un effet sur l'activité de la LDH soit observé après lyophilisation car selon la littérature, la présence d'un agent de charge cristallin après lyophilisation peut influencer la stabilité de la molécule d'intérêt (Bedu-Addo, 2004).

Dans une étude, Izutsu et Kojima ont étudié l'effet de la cristallinité d'excipients sur la stabilité des protéines lors de leur lyophilisation (Izutsu and Kojima, 2002). Leur formulation se composait de solutions aqueuses de 200 µL de mannitol contenant une combinaison de protéines (2,5 mg/ml de LDH et 10 mg/ml d'autres protéines (l'albumine sérum bovin, l'ovalbumine et la β-lactoglobuline)). La congélation a été réalisée par immersion à l'azote liquide. L'étude a montré une perte presque totale de l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation en présence de mannitol comme seul excipient de formulation (Izutsu and Kojima, 2002).

Une autre étude, portant sur la lyophilisation de la LDH (15 µg/ml) en présence de mannitol pur (50 mg/ml) ou de mannitol combiné à du saccharose, a également révélée une perte significative de l'activité enzymatique de la LDH (Al-Hussein and Gieseler, 2012). Le protocole de lyophilisation employé consistait à congeler les formulations sur des étagères à -40 °C, suivi d'une dessiccation primaire et secondaire respectivement à -35 °C et +40 °C. Les résultats ont montré qu'en présence de mannitol pur, la LDH perdait 50 % de son activité enzymatique. En revanche, pour des formulations composées de mélanges mannitol/saccharose à différentes proportions, les analyses ont révélées que l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation était plus élevée, atteignant respectivement 80 %, 85 % et 90 % pour les ratios de mannitol/saccharose de 90/10, 70/30 et 50/50 (Al-Hussein and Gieseler, 2012).

Dans le cadre de notre étude, la lyophilisation de la LDH en présence de 5% (m/v) de mannitol, en utilisant le cycle « agressif », a entraîné une perte de plus de 80% de l'activité de la LDH après lyophilisation, et une perte de plus de 95% après compression (**Figure 82**). Cette perte d'activité enzymatique en présence de mannitol était attendue après la lyophilisation, comme décrit précédemment.

Néanmoins, il est intéressant de noter que la compression entraîne une diminution significative (-75%) de l'activité enzymatique de la LDH, par rapport à sa forme lyophilisée quel que soit la pression que nous avons appliquée. Cette perte n'a pas été observée précédemment dans le cas du tréhalose et du lactose, qui sont tous les deux amorphes après lyophilisation. Ces résultats soulignent une fois

de plus que la structure amorphe des excipients joue un rôle protecteur pour les biomolécules, non seulement pendant la lyophilisation, mais également pendant la compression.

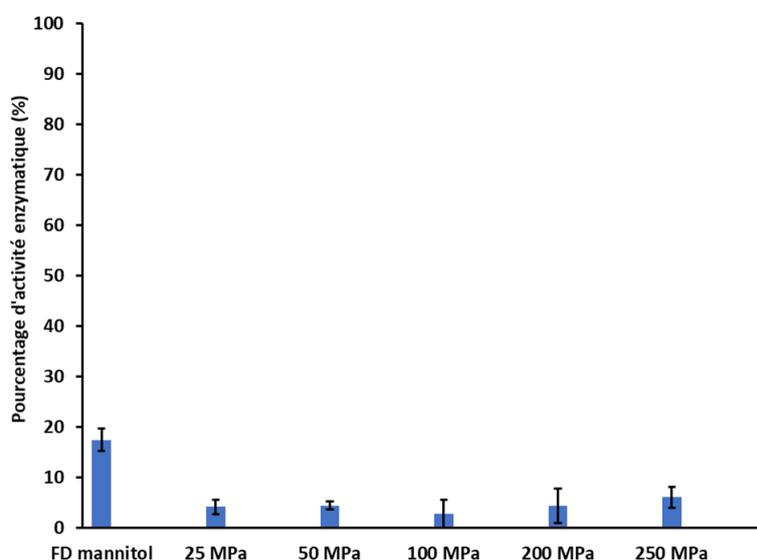


Figure 82 – Evaluation du pourcentage de l'activité enzymatique de la LDH après lyophilisation (cycle agressif) en présence de mannitol et après compression de la poudre lyophilisée (FD) à différentes pressions.

6.3.4 Lyophilisation de la LDH en présence de tréhalose à différentes concentrations

La concentration de protéine et le ratio excipient-protéine dans les formulations peuvent avoir une influence significative sur la préservation de l'activité de la protéine choisie. En effet, une augmentation de la concentration de la protéine favorise les interactions protéine-protéine ce qui peut induire une agrégation (Tang and Pikal, 2004). Le choix de la concentration de protéine est donc très important lors de l'optimisation des paramètres de formulation. Afin de déterminer la plage de concentrations en protéine à évaluer dans notre étude, une revue bibliographique a été réalisée. Cette revue montre que les formulations à base de protéines thérapeutiques, que ce soit pour des produits en développement ou commercialisés, peuvent contenir des quantités variables de protéines, allant de plusieurs microgrammes jusqu'à plusieurs milligrammes (Haddadzadegan et al., 2022). Il est possible qu'à l'état solide, les stress associés à la lyophilisation, à la compression, et même à l'augmentation de la concentration de protéines, induisent une agrégation ou un changement de conformation pouvant désactiver la protéine.

En ce qui concerne l'utilisation de la LDH comme protéine modèle, les études dans la littérature montrent que la LDH peut être lyophilisée à partir de concentrations très faibles (12,8 µg/ml) (Iwai et al., 2007) jusqu'à des concentrations relativement élevées (2,5 mg/ml) (Izutsu and Kojima, 2002).

C'est pourquoi la concentration de 35 µg/ml a été utilisée dans la 1^{ère} partie de ce chapitre. Ainsi, suite à l'évaluation de l'effet des excipients sur l'activité enzymatique de la LDH, il est nécessaire d'explorer des formulations plus concentrées en LDH afin d'évaluer l'impact de l'augmentation de la concentration de la protéine sur son activité après lyophilisation et compression.

En raison de la quantité limitée de LDH disponible pour notre étude, uniquement deux concentrations différentes ont été étudiées. La première choisie était dix fois supérieure à celle utilisée dans la partie précédente, soit une concentration de LDH de 350 µg/ml, et la seconde était de 1 mg/ml. L'activité enzymatique de la LDH dans les lyophilisats et les comprimés obtenus à ces différentes concentrations a été mesurée en triplicat. Les résultats de cette analyse sont présentés sur la **Figure 83**. Les graphiques montrent que quel que soit la concentration de LDH utilisée, son activité enzymatique est préservée après lyophilisation et après compression à la fois à faible et à haute pression (25 et 250 MPa respectivement). Par conséquent, la concentration de la protéine dans le cadre de l'intervalle étudié (de 35 à 1000 µg/ml) n'a pas d'effet sur l'activité après les procédés de séchage et de compression. Ce résultat contredit l'interprétation de Tang et Pikal, soutenant qu'une augmentation de la concentration des protéines entraîne une diminution de leur activité biologique (Tang and Pikal, 2004). De plus, une autre étude portant sur l'activité enzymatique de diverses protéines, dont la LDH, à différentes concentrations (entre 5 et 100 µl/ml) après lyophilisation sans l'ajout d'excipient a montré que l'activité enzymatique des protéines après lyophilisation dépend de la concentration et du type de protéine. Selon cette étude, une concentration en protéine plus élevée limite la perte d'activité enzymatique après la dissolution des lyophilisats (Jiang and Nail, 1998). Il est important de noter que dans cette étude, les auteurs ont lyophilisé des biomolécules sans ajouter d'excipient, ce qui explique la dépendance de la conservation de l'activité enzymatique à la concentration de la biomolécule. En revanche, nos résultats montrent qu'en présence de tréhalose ou de lactose, la LDH conserve son activité, quelle que soit la concentration étudiée (35 µl/ml, 350 µl/ml ou 1 mg/ml). Ce résultat souligne encore une fois l'importance de l'ajout d'un excipient pour préserver l'activité biologique des biomolécules.

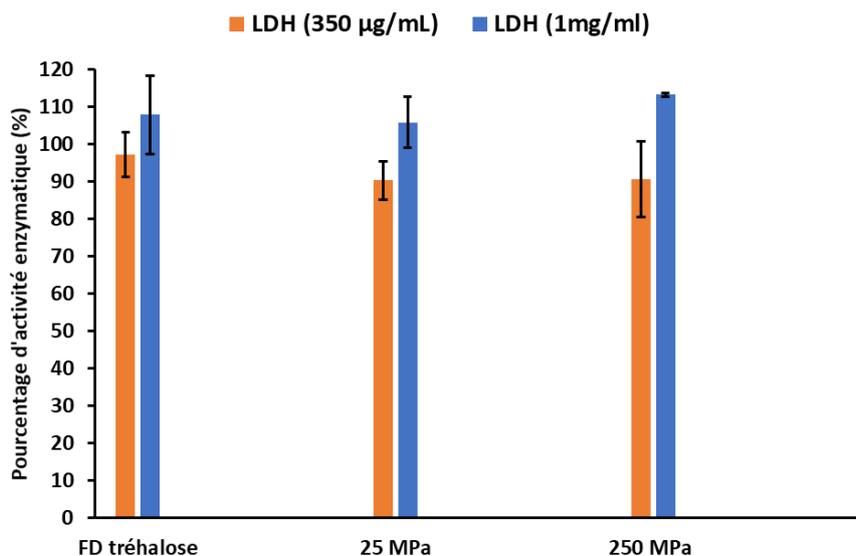


Figure 83 – Evaluation du pourcentage de l'activité enzymatique de la LDH à différentes concentrations (350 µl/ml et 1 mg/ml) après lyophilisation (cycle agressif) en présence de tréhalose et après compression de la poudre lyophilisée à différentes pressions (25 et 250 MPa).

6.4 Conclusion sur l'effet de la lyophilisation et de la compression sur l'activité de la LDH

Dans cette section, nous avons examiné l'impact de plusieurs paramètres de la formulation sur l'activité enzymatique de la LDH qui a été choisie comme protéine modèle. Tout d'abord, nous avons évalué l'effet du cycle de lyophilisation, conservateur ou agressif, sur cette activité enzymatique. Nos résultats démontrent qu'avec un cycle agressif, il est possible de préserver intégralement l'activité enzymatique de la LDH.

Par la suite nous avons étudié l'effet des excipients de formulation sur la préservation de l'activité enzymatique de la protéine. En utilisant un cycle agressif, nous avons observé que le tréhalose et le lactose avaient la capacité de stabiliser la protéine et de maintenir son activité après lyophilisation. En revanche, la présence de mannitol lors de la lyophilisation entraînait la perte quasi-totale de l'activité de la LDH.

Par la suite, dans le cas du tréhalose et du lactose, nous avons démontré que l'activité de la LDH est préservée quelle que soit la pression (25 – 250 MPa). Ces résultats confirment que le tréhalose et le lactose sont des excipients appropriés pour la lyophilisation et la compression de la LDH.

Enfin, nous avons constaté qu'une concentration plus élevée de LDH dans les formulations n'avait aucun impact sur son activité après lyophilisation et compression dans l'intervalle de concentration testée, 35 à 1000 µg/ml (1 mg/ml).

Il convient de noter que tous les dosages de l'activité enzymatique ont été effectués immédiatement après la lyophilisation et la compression. Par conséquent, il était nécessaire de réaliser une analyse de stabilité de l'activité enzymatique de la LDH après ces procédés. Les résultats des tests de stabilité seront exposés dans ce qui suit.

6.5 Etude de stabilité

En tenant compte de tous les résultats précédents, il a été décidé de réaliser une étude de stabilité afin d'évaluer l'influence des procédés sur le long terme. Les paramètres de cette étude de stabilité ont été choisis comme suit :

- 1- Les excipients utilisés sont le tréhalose et le lactose, car ils préservent intégralement l'activité enzymatique après lyophilisation et compression sur toute la gamme de pressions.
- 2- Le pourcentage d'excipient dans la formulation a été fixé à 5% m/v, car cette quantité permet la conservation de l'activité enzymatique dans un premier temps, comme démontré précédemment. En plus, dans le **Chapitre 5**, nous avons démontré qu'une augmentation du pourcentage d'excipient dans la solution à lyophiliser n'avait pas de plus-value en termes d'amélioration des propriétés mécanique et d'écoulement de la poudre.
- 3- La concentration de la protéine est fixée à 35 µg/ml, car une augmentation de cette concentration n'a eu aucun effet sur son activité biologique.
- 4- La pression de compression de tous les échantillons est fixée à 50 MPa, car cette pression permet d'obtenir des comprimés présentant une résistance mécanique suffisante, conformément aux résultats des chapitres précédents.
- 5- L'analyse de stabilité est réalisée sur des lyophilisats et des comprimés afin de comparer l'effet de la mise en forme de la LDH sur sa stabilité.
- 6- Les échantillons sont conservés dans des flacons en verre et scellés sous air sec dans une boîte à gant maintenue à 10% d'humidité pour limiter l'influence de l'humidité sur la stabilité.
- 7- La stabilité de la LDH formulée sous forme de lyophilisats et de comprimés est évaluée pendant 6 mois (à ces échéances : 7 jours, 15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois, 4 mois et 6 mois) après conservation à différentes températures (+4, +25, +30 et +40 °C). Il est à noter que l'analyse à 6 mois n'avait pas encore été réalisée au moment de la soumission du manuscrit.

6.5.1 Analyse de l'activité enzymatique de la LDH en solution

Dans le but de démontrer l'importance de la lyophilisation par rapport à une solution de LDH non lyophilisée dans la préservation de l'activité enzymatique, il a été décidé dans un premier temps de dissoudre la LDH brute et d'analyser son activité enzymatique tout de suite après dissolution. L'activité obtenue étant considérée comme le maximum d'activité de la LDH. Dans un second temps,

la LDH en solution a été stockée à 25°C pendant 24 heures, puis l'analyse de son activité enzymatique a été réalisée.

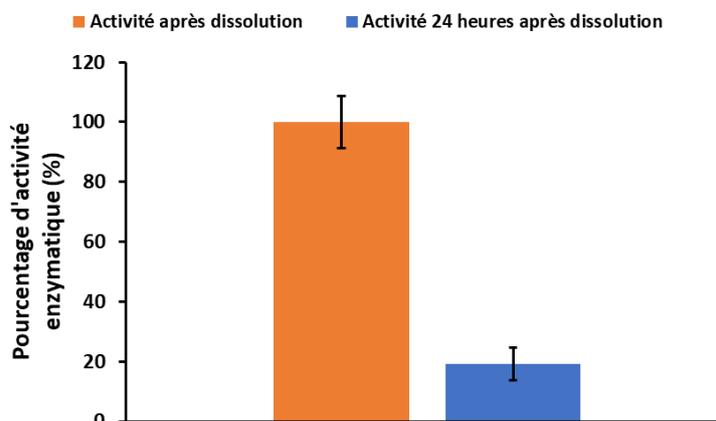


Figure 84 - Evaluation du pourcentage de l'activité enzymatique de la LDH tout de suite après dissolution et 24 heures après dissolution et stockage à 25 °C.

Les résultats de cet essai sont représentés sur la **Figure 84**. Le graphique montre que la LDH en solution, stockée 24 heures à 25°C, perd 80% de son activité par rapport à la LDH dosée immédiatement après dissolution. Ce résultat prouve que la LDH en solution est instable à température ambiante, d'où la nécessité de son stockage à très faible température. De plus, cette perte d'activité dès 24 heures après sa dissolution, justifie l'intérêt de la démarche de lyophilisation et de compression des biomolécules dans le but de pouvoir les conserver à température ambiante.

6.5.2 Etude de la stabilité de la LDH après lyophilisation et compression

Pour cette étude de stabilité, l'activité enzymatique mesurée dans les échantillons reconstitués a été comparée à la valeur théorique indiquée par le fournisseur, considéré comme étant 100% de l'activité enzymatique de la protéine.

Les résultats de stabilité de la LDH lyophilisée et comprimée en présence de tréhalose ou de lactose sont présentés sur la **Figure 85**.

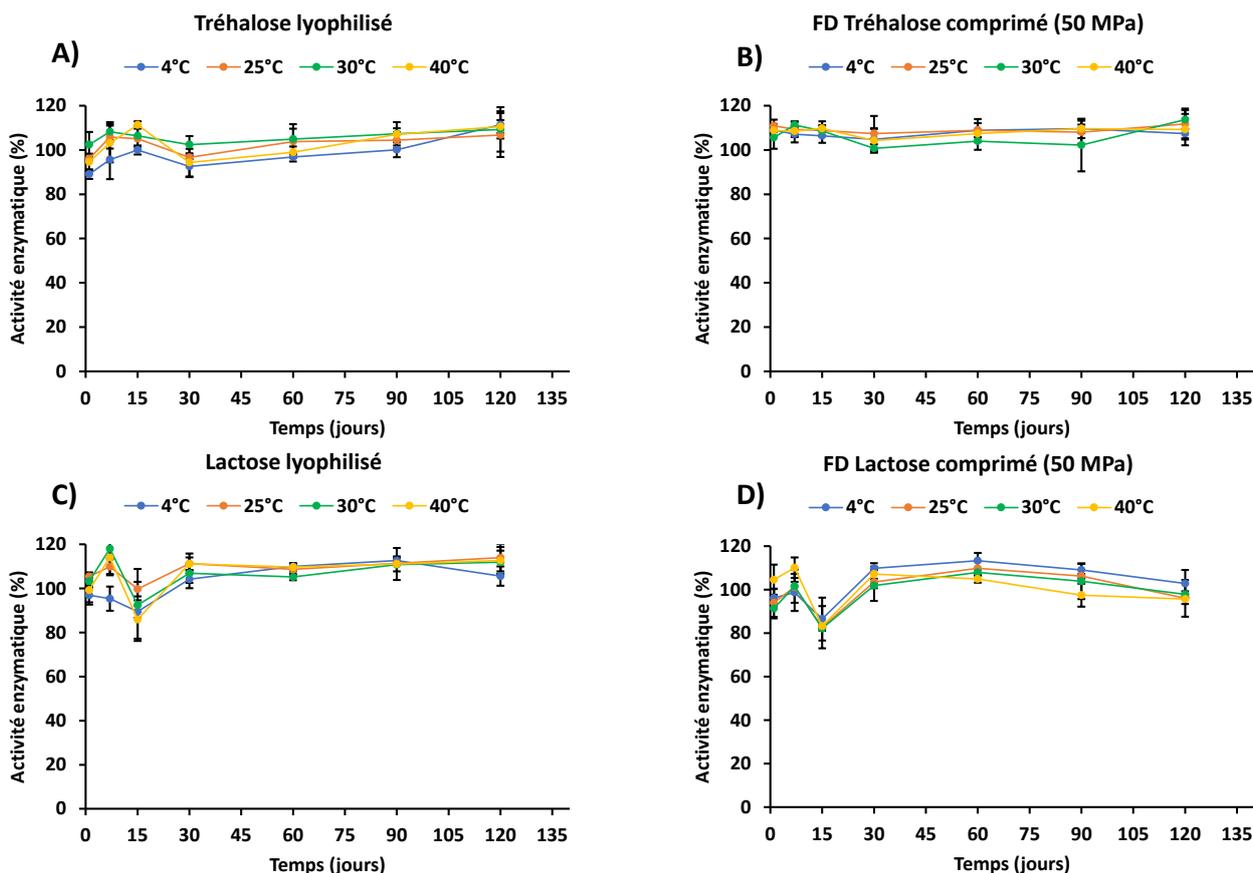


Figure 85 – Etude de stabilité menée sur plusieurs mois, à différentes températures de stockage. L'activité enzymatique de la LDH a été évaluée après lyophilisation (cycle agressif) en présence de tréhalose (A) ou de lactose (C) et après compression à 50 MPa des lyophilisats de tréhalose (B) ou de lactose (D).

D'après les résultats obtenus, on constate que, pendant les quatre premiers mois de conservation, la LDH conserve 100 % de son activité enzymatique dans les lyophilisats et les comprimés de tréhalose et de lactose, quel que soit la température de stockage. En comparant ces résultats avec ceux de l'activité enzymatique de la LDH en solution (cf. paragraphe 6.5.1), on observe que la lyophilisation est particulièrement efficace pour préserver la protéine sur plusieurs mois à des températures de stockage pouvant atteindre 40°C. De plus, ces résultats montrent que la compression des lyophilisats contenant la LDH n'altère pas non plus l'activité enzymatique de cette dernière. Ces résultats corroborent l'étude d'Eriksson et al. dans laquelle la stabilité à 20 °C et à 0 % d'humidité relative de la phosphatase alcaline lyophilisée en présence de tréhalose a été évaluée (Eriksson et al., 2002). Cette étude a montré que la phosphatase alcaline lyophilisée avec du tréhalose conservait toute son activité enzymatique dans ces conditions pendant 105 jours. Cependant, cette étude de stabilité n'a pas été réalisée sur des comprimés fabriqués à partir des lyophilisats. Eriksson et al. ont également exploré d'autres conditions de conservation, notamment le stockage à 60 °C et 0 % d'humidité relative

de la phosphatase alcaline lyophilisée en présence de tréhalose sous forme de lyophilisat et de comprimés obtenus à 110 MPa. Les résultats ont montré que la phosphatase alcaline lyophilisée avec du tréhalose conservait 80 % de son activité pendant plus de 100 jours de stockage à 60 °C, mais qu'elle perdait toute son activité enzymatique 8 jours après compression et stockage à 60 °C (Eriksson et al., 2002).

Un autre résultat intéressant est la capacité du lactose à conserver l'intégralité de l'activité enzymatique de la LDH sur plusieurs mois. En effet, bien que le lactose soit un sucre réducteur et qu'il puisse potentiellement provoquer une réaction de Maillard en présence de protéines (McSweeney and Fox, 2009), aucun changement d'aspect, de couleur ou d'activité n'a été détecté dans les lyophilisats et les comprimés de lactose lors des analyses.

6.6 Conclusion sur l'étude de stabilité

Ces résultats, en particulier la conservation de l'intégralité de l'activité enzymatique après lyophilisation, diffèrent de ceux trouvés dans la littérature. En effet, Kawai et Suzuki ont démontré que la LDH perd 40 % de son activité enzymatique juste après lyophilisation en présence de tréhalose ou de lactose (Kawai and Suzuki, 2007). Cette différence pourrait être attribuée aux paramètres de lyophilisation utilisés dans leur étude qui diffèrent des nôtres (congélation par immersion dans l'azote liquide notamment). Une autre étude a également montré une perte de 55 à 60 % de l'activité enzymatique de la LDH ou de la PFK (phosphofructokinase) après lyophilisation en présence de lactose (Steven J Prestrelski et al., 1993a). Par contre, Ohori et al. ont lyophilisé la BSA (Albumine Sérum Bovin) en présence de tréhalose et ont montré qu'elle était stable pendant 8 semaines, à 40 °C après lyophilisation (Ohori et al., 2018). En comparant ces études, il est évident que la préservation de l'activité enzymatique d'une biomolécule suite à la lyophilisation et à la compression dépend des paramètres de lyophilisation et de compression, ainsi que de la protéine étudiée.

D'après nos résultats et les études déjà cités, il apparaît que les paramètres de formulations, de lyophilisation et de compression qui ont été utilisés dans le cadre de notre étude, sont très efficaces pour la préservation de l'activité enzymatique de la LDH pendant une longue période. Comme discuté dans les chapitres précédents (cf. **chapitre 3 et 4**), les lyophilisats de tréhalose et de lactose sont amorphes après lyophilisation et présentent une texture spécifique en nid d'abeille. Cette structure est responsable des propriétés de compression des lyophilisats et pourrait expliquer en partie la conservation de l'activité enzymatique de la LDH lors de la compression.

Conclusion générale

Les travaux de recherche réalisés au cours de cette thèse ont permis d'explorer de façon exhaustive le comportement en compression de différentes poudres lyophilisées, qui étaient très peu décrites dans la littérature. L'objectif de ces caractérisations était d'étudier la faisabilité d'inclure dans ces matrices lyophilisées puis comprimées, des molécules d'intérêt thérapeutique tout en conservant leur activité biologique.

Pour mener à bien ces travaux, le tréhalose a été choisi en première intention comme excipient de lyophilisation en raison de sa capacité à préserver les propriétés biologiques des biomolécules après cryodessiccation. Les caractérisations physico-chimiques ont confirmé que le tréhalose lyophilisé conservait sa structure amorphe. Lors de la compression, les observations expérimentales réalisées ont révélé un comportement singulier du tréhalose lyophilisé (FD tréhalose) le distinguant des autres excipients pharmaceutiques couramment utilisés ou même de celui du tréhalose cristallin. La principale caractéristique de ce comportement est l'obtention de comprimés cohésifs dès de faibles pressions de compression de l'ordre de 25 MPa. De plus, alors que les tests de compressibilité et de tablétabilité du FD tréhalose ont montré des similitudes avec ceux de la cellulose microcristalline, les comprimés de FD tréhalose ont présenté un comportement fragile lors des essais de compression diamétrale, par rapport à la cellulose microcristalline, ainsi qu'un faible recouvrement élastique. Le test de BFI a permis de confirmer ce comportement fragile des comprimés obtenus, contrairement aux autres excipients évalués. Les caractérisations physico-chimiques ont également confirmé que le tréhalose lyophilisé conservait sa structure amorphe même après compression, ce qui encourage l'utilisation de la lyophilisation et de la compression en présence de tréhalose pour « protéger » et ainsi préserver l'activité enzymatique des biomolécules.

À ce stade de l'étude, les mécanismes responsables de ce comportement demeuraient encore inconnus et nécessitaient une analyse approfondie des poudres lyophilisées. L'hypothèse selon laquelle la structure amorphe du tréhalose conférerait ces propriétés a été adoptée comme base pour la poursuite des travaux. Afin de vérifier cette hypothèse, différents excipients lyophilisés, atomisés, cristallins et cristallins broyés ont été comprimés, et leurs comportements ont été examinés. Les observations ont révélé que les excipients testés qui étaient amorphes après lyophilisation présentaient des comportements similaires, comme en témoigne la comparaison entre le FD tréhalose et le FD lactose. En revanche, les excipients amorphes après atomisation ont montré des comportements différents en termes de compressibilité, de tablétabilité, de recouvrement élastique, d'énergie plastique ou encore de comportement à la rupture des comprimés. Les résultats obtenus indiquent un effet combiné de la structure amorphe et de la texture particulière de la poudre, sous forme de feuillets liés à l'opération de lyophilisation, sur ce comportement particulier lors de la

compression. Il a également été constaté que la tabléabilité dépendait uniquement de la structure physique de la poudre. En effet lorsque celle-ci était amorphe, la variabilité des mesures de contrainte de rupture augmentait très fortement lors des tests de ruptures effectués sur des comprimés générés à des niveaux de pressions de compression élevés classiquement utilisés en compression pharmaceutique. Nous avons pu montrer que la principale cause de cette variabilité était liée à l'apparition de fissures à la surface des comprimés, dont l'origine reste inconnue. Cependant, pour les comprimés obtenus à partir de poudres amorphes lyophilisées sous de faibles pressions, une contrainte de rupture suffisamment élevée (supérieure à 2 MPa) est obtenue dès l'application de pressions de compression relativement basses (50 MPa). Ces comprimés obtenus dans le domaine des pressions faibles sont cohésifs de façon reproductible et sans apparition de défauts. Cette caractéristique revêt une importance particulière dans le cadre de l'étude et d'applications futures puisqu'elle permet la production de comprimés suffisamment résistants avec une pression de compression relativement faible, en évitant ainsi d'exposer les biomolécules à un stress élevé pendant le processus de compression. De plus, ces comprimés cohésifs obtenus à pression faible sont caractérisés par des porosités relativement importantes (de l'ordre de 30 %), ce qui implique des points ou des surfaces de sollicitations pendant la phase de compression relativement limités dans le volume. Ce point est également favorable au maintien de l'intégrité de macromolécules au sein des comprimés formés. Bien que cette partie de l'étude ait élargi notre compréhension du comportement des poudres lyophilisées lors de la compression, d'avantage d'études seront avérées nécessaires pour élucider les mécanismes sous-jacents. Néanmoins, ces résultats constituent une première étape pour permettre la réalisation de comprimés à partir des lyophilisats. Malgré la démonstration de la faisabilité de former des comprimés cohésifs à faible pression, un remplissage manuel de la matrice de compression pendant cette étude a été imposé par les propriétés rhéologiques médiocres des poudres lyophilisées. Le défi consiste donc à améliorer les propriétés de la poudre pour obtenir un écoulement optimisé, soit en jouant sur une étape de formulation à développer, soit en intégrant des étapes intermédiaires de procédé entre la lyophilisation et la compression.

Initialement, l'augmentation du pourcentage d'excipient dans la formulation a été explorée dans le but d'obtenir une poudre plus dense favorisant un meilleur écoulement. Cependant, après avoir testé divers pourcentages d'excipients dans les systèmes lyophilisés, il est apparu que cette simple modification ne suffisait pas à améliorer l'écoulement de la poudre de manière significative. Néanmoins, cette partie de l'étude a permis de montrer qu'une augmentation du pourcentage d'excipient dans la formulation ne modifie pas de manière significative le comportement en compression des poudres lyophilisées, en particulier aux faibles pressions de compression. Le jeu de l'utilisation de cryoprotecteurs à des niveaux de concentration plus ou moins élevés peut donc s'avérer pertinent pour la réalisation de comprimés intégrant des molécules biologiques fragiles.

D'autres hypothèses peuvent être envisagées dans une perspective d'amélioration de l'écoulement et donc de la processabilité de la poudre lyophilisée. En effet, l'ajout d'une étape de granulation ou l'ajout d'excipients de compression directe aux poudres lyophilisées avant compression restent des pistes à explorer pour l'amélioration de l'écoulement. La granulation humide est, a priori, à éviter en raison de la sensibilité des poudres et des molécules biologiques à l'humidité et à l'étape de séchage. La granulation sèche pourrait offrir une solution viable et des essais au sein du laboratoire ont été initiés au moment de l'écriture de ce mémoire de thèse. Cependant, cette approche présente le risque de modifier le comportement en compression des nouvelles formulations et de potentiellement influencer l'activité des biomolécules pendant la compression. Par conséquent, toute modification de la formulation ou l'ajout d'un procédé supplémentaire doit être accompagné d'une caractérisation approfondie des propriétés physico-chimiques ainsi que de l'étude des propriétés en compression des systèmes développés.

Finalement, les résultats de la dernière partie de cette thèse sont extrêmement encourageants. En effet, il a été démontré que l'utilisation du tréhalose et du lactose permet de maintenir l'activité de la biomolécule modèle testée, même après lyophilisation et compression. Par opposition avec le mannitol dont la structure est cristalline après lyophilisation, c'est la structure amorphe des FD tréhalose et FD lactose qui joue un rôle important dans la conservation de l'activité biologique de la LDH. De plus, l'étude de stabilité réalisée a permis de montrer que les systèmes lyophilisés permettent la conservation de l'activité de la biomolécule pendant plusieurs mois à température ambiante et il en est de même dans le cas de la compression de ces poudres lyophilisées. Par comparaison, une protéine stockée en solution à température ambiante perd la majeure partie de son activité enzymatique dès le lendemain de sa mise en solution.

Bien que ces résultats soient prometteurs, d'autres problématiques sont également à prendre en compte quand il est question d'une administration par voie orale. En effet, les biomolécules sont instables dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal. Le pH acide de l'estomac et la présence de différentes protéases sont des obstacles à leur administration par la voie orale. Afin de préserver leur activité biologique jusqu'au moment de leur libération, une des solutions envisageables est l'enrobage des comprimés qui permettra une protection jusqu'au site de libération souhaité. La forme comprimée est la forme par excellence qui autorise la construction de systèmes à libération différée ou contrôlée, ce qui en fait un atout majeur. De plus, dans le cas où une absorption de la biomolécule est requise, de nombreuses études déjà réalisées ou actuellement en cours visent à développer des stratégies d'amélioration de la biodisponibilité principalement via l'utilisation de promoteurs d'absorption et/ou d'inhibiteurs enzymatiques. En perspective, des études ultérieures pourraient donc consister à enrober les comprimés et/ou à optimiser la formulation afin d'améliorer la biodisponibilité des biomolécules en fonction de l'effet thérapeutique recherché (action locale ou

systemique) puis à tester les différents comprimés obtenus *in vitro* afin d'explorer la libération et la conservation de l'activité biologique des biomolécules dans des milieux simulant le tube digestif.

Bibliographie

- Adler, M., Lee, G., 1999. Stability and surface activity of lactate dehydrogenase in spray-dried trehalose. *J. Pharm. Sci.* 88, 199–208. <https://doi.org/10.1021/js980321x>
- Adolfsson, Å., Nyström, C., 1996. Tablet strength, porosity, elasticity and solid state structure of tablets compressed at high loads. *Int. J. Pharm.* 132, 95–106.
- Alcoutlabi, M., Martinez-Vega, J., 1999. A modified fractional model to describe the viscoelastic behavior of solid amorphous polymers: The effect of physical aging. *J. Macromol. Sci.* 38, 991–1007.
- Al-Hussein, A., Gieseler, H., 2012. The Effect of Mannitol Crystallization in Mannitol–Sucrose systems on LDH Stability during Freeze-Drying. *J. Pharm. Sci.* 101, 2534–2544. <https://doi.org/10.1002/jps.23173>
- Armstrong, N., 1997. Selection of excipients for direct compression tablet formulations. *Pharm. Technol. Eur.* 9, 24–31.
- Assegehegn, G., Brito-de la Fuente, E., Franco, J.M., Gallegos, C., 2019. The Importance of Understanding the Freezing Step and Its Impact on Freeze-Drying Process Performance. *J. Pharm. Sci.* 108, 1378–1395. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.039>
- Bachmann, H., 1995. *Vibration problems in structures: practical guidelines*. Springer Science & Business Media.
- Bagster, R.H.D., Crooks, M., 1977. Flow studies on directly compressible tablet vehicles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 3, 475–487.
- Beckett, S.T., Francesconi, M.G., Geary, P.M., Mackenzie, G., Maulny, A.P.E., 2006. DSC study of sucrose melting. *Carbohydr. Res.* 341, 2591–2599. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.07.004>
- Bedu-Addo, F.K., 2004. Understanding lyophilization formulation development. *Pharm. Technol.* 20, 10–19.
- Bjelošević, M., Zvonar Pobirk, A., Planinšek, O., Ahlin Grabnar, P., 2020. Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation. *Int. J. Pharm.* 576, 119029. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119029>
- Bolhuis, G., Lerk, C., 1977. Film forming of tablet lubricants during the mixing process of solids. *Acta Pharm Technol* 23, 13–20.
- Bookwala, M., DeBoyace, K., Buckner, I.S., Wildfong, P.L., 2020. Predicting density of amorphous solid materials using molecular dynamics simulation. *AAPS PharmSciTech* 21, 1–11.
- Bourduche, F., Sanchez-Ballester, N.M., Bataille, B., Lefèvre, P., Sharkawi, T., 2020. Structure-property relationship of amorphous maltitol as tableting excipient. *AAPS PharmSciTech* 21, 1–12.
- Broadhead, J., Rouan, S.E., Hau, I., Rhodes, C., 1994. The effect of process and formulation variables on the properties of spray-dried β -galactosidase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 458–467.
- Brown, G.M., Levy, H.A., 1973. Further refinement of the structure of sucrose based on neutron-diffraction data. *Acta Crystallogr. B* 29, 790–797. <https://doi.org/10.1107/S0567740873003353>
- « BÜCHI Labortechnik | Buchi.com ». Consulté le: 26 septembre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.buchi.com/fr>

- Busignies, V., Arruda, D.C., Charrueau, C., Ribeiro, M.C.S., Lachagès, A.-M., Malachias, A., Finet, S., Rehman, A.U., Bigey, P., Tchoreloff, P., Escriou, V., 2020. Compression of Vectors for Small Interfering RNAs Delivery: Toward Oral Administration of siRNA Lipoplexes in Tablet Forms. *Mol. Pharm.* 17, 1159–1169. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b01190>
- Byeong S. Chang, Gail Reeder & John F Carpenter, 1996. Development of a Stable Freeze-dried Formulation of Recombinant Human Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Pharm. Res.* 13, 243–249. <https://doi.org/10.1023/A:1016043114998>
- Cameron, P. (Ed.), 2013. *Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice*. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/b14360>
- Cares-Pacheco, M.G., Vaca-Medina, G., Calvet, R., Espitalier, F., Letourneau, J. –J., Rouilly, A., Rodier, E., 2014. Physicochemical characterization of d-mannitol polymorphs: The challenging surface energy determination by inverse gas chromatography in the infinite dilution region. *Int. J. Pharm.* 475, 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.029>
- Carlin, B.A., 2008. Direct compression and the role of filler-binders, in: *Pharmaceutical Dosage Forms-Tablets*. CRC Press, pp. 189–232.
- Carpenter, J.F., Chang, B.S., Garzon-Rodriguez, W., Randolph, T.W., 2002. Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Theory and Practice, in: Carpenter, J.F., Manning, M.C. (Eds.), *Rational Design of Stable Protein Formulations, Pharmaceutical Biotechnology*. Springer US, Boston, MA, pp. 109–133. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0557-0_5
- Cesàro, A., De Giacomo, O., Sussich, F., 2008. Water interplay in trehalose polymorphism. *Food Chem.* 106, 1318–1328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.082>
- Chang, L. (Lucy), Shepherd, D., Sun, J., Tang, X. (Charlie), Pikal, M.J., 2005. Effect of sorbitol and residual moisture on the stability of lyophilized antibodies: Implications for the mechanism of protein stabilization in the solid state. *J. Pharm. Sci.* 94, 1445–1455. <https://doi.org/10.1002/jps.20363>
- Chávez, B., Ledebøer, A., 2007. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Dry. Technol.* 25, 1193–1201.
- Chen, D., Maa, Y.-F., Haynes, J.R., 2002. Needle-free epidermal powder immunization. *Expert Rev. Vaccines* 1, 265–276.
- Chen, Y., Ling, J., Li, M., Su, Y., Arte, K.S., Mutukuri, T.T., Taylor, L.S., Munson, E.J., Topp, E.M., Zhou, Q.T., 2021. Understanding the Impact of Protein–Excipient Interactions on Physical Stability of Spray-Dried Protein Solids. *Mol. Pharm.* 18, 2657–2668. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00189>
- Chiou, D., Langrish, T.A.G., Braham, R., 2008. The effect of temperature on the crystallinity of lactose powders produced by spray drying. *J. Food Eng.* 86, 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.10.005>
- Craik, D.J., Fairlie, D.P., Liras, S., Price, D., 2013. The Future of Peptide-based Drugs: Peptides in Drug Development. *Chem. Biol. Drug Des.* 81, 136–147. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12055>
- Croquelois, B., Girardot, J., Kopp, J.B., Cazautets, C., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2017. Breaking pharmaceutical tablets with a hole: Reevaluation of the stress concentration factor and influence of the hole size. *Powder Technol.* 317, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.04.033>
- Croquelois, B., Girardot, J., Kopp, J.B., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2020. Quantification of tablet sensitivity to a stress concentration: Generalization of Hiestand's approach and link with the microstructure. *Powder Technol.* 369, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.05.002>
- Crowe, L.M., Reid, D.S., Crowe, J.H., 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 71, 2087–2093. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79407-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79407-9)

- Dai, Y., Meng, Q., Mu, W., Zhang, T., 2017. Recent advances in the applications and biotechnological production of mannitol. *J. Funct. Foods* 36, 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.022>
- Datta, S., Grant, D.J.W., 2004. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 42–57. <https://doi.org/10.1038/nrd1280>
- De Meyer, L., Van Bockstal, P.-J., Corver, J., Vervaet, C., Remon, J.P., De Beer, T., 2015. Evaluation of spin freezing versus conventional freezing as part of a continuous pharmaceutical freeze-drying concept for unit doses. *Int. J. Pharm.* 496, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.025>
- Depaz, R.A., Pansare, S., Patel, S.M., 2016. Freeze-Drying Above the Glass Transition Temperature in Amorphous Protein Formulations While Maintaining Product Quality and Improving Process Efficiency. *J. Pharm. Sci.* 105, 40–49. <https://doi.org/10.1002/jps.24705>
- Desbois, L., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2022. Use of jump-tests for the characterization of the viscoplastic behavior of pharmaceutical powders during compaction. *Powder Technol.* 404, 117406. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2022.117406>
- Deshmukh, K., Kovářik, T., Muzaffar, A., Ahamed, M.B., Pasha, S.K., 2020. Mechanical analysis of polymers, in: *Polymer Science and Innovative Applications*. Elsevier, pp. 117–152.
- Drapier-Beche, N., Fanni, J., Parmentier, M., 1999. Physical and Chemical Properties of Molecular Compounds of Lactose. *J. Dairy Sci.* 82, 2558–2563. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75510-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75510-4)
- Duddu, S.P., Zhang, G., Dal Monte, P.R., 1997. The relationship between protein aggregation and molecular mobility below the glass transition temperature of lyophilized formulations containing a monoclonal antibody. *Pharm. Res.* 14, 596–600.
- Eichie, F., Okor, R., Uhumwangho, M., Osakue, I., 2005. Relationship between slugging pressure and Brittle fracture tendency—a case study for Aspirin tablets. *Trop. J. Pharm. Res.* 4, 483–487.
- Eichie, F.E., Okor, R.S., 2002. Effect of acid treatment on the consolidation and plasto-elasticity of tapioca powder. *Trop. J. Pharm. Res.* 1, 45–49.
- Ejiofor, O., Esezobo, S., Pilpel, N., 1986. The plasto-elasticity and compressibility of coated powders and the tensile strengths of their tablets. *J. Pharm. Pharmacol.* 38, 1–7.
- Elkhider, N., Chan, K.A., Kazarian, S.G., 2007. Effect of moisture and pressure on tablet compaction studied with FTIR spectroscopic imaging. *J. Pharm. Sci.* 96, 351–360.
- Eriksson, H.J.C., Hinrichs, W.L.J., van Veen, B., Somsen, G.W., de Jong, G.J., Frijlink, H.W., 2002. Investigations into the stabilisation of drugs by sugar glasses: I. Tablets prepared from stabilised alkaline phosphatase. *Int. J. Pharm.* 249, 59–70. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00531-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00531-8)
- Esezobo, S., Pilpel, N., 1987. Effects of applied load and particle size on the plastoelasticity and tablet strength of some directly compressible powders. *J. Pharm. Pharmacol.* 39, 303–304.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2022). *European Pharmacopoeia* (11th ed.). Council of Europe. <https://www.edqm.eu/en/web/edqm/european-pharmacopoeia-11th-edition>
- Fan, K., Zhang, M., Mujumdar, A.S., 2019. Recent developments in high efficient freeze-drying of fruits and vegetables assisted by microwave: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 1357–1366. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1420624>
- Fell, J., Newton, J., 1970. Determination of tablet strength by the diametral-compression test. *J. Pharm. Sci.* 59, 688–691.
- Fell, J., Newton, J., 1968. The tensile strength of lactose tablets. *J. Pharm. Pharmacol.* 20, 657–659.

- Franks, F., 1998. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 221–229.
- Franks, F., Auffret, T., 2008. *Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*. royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 109–116.
- Geidobler, R., Winter, G., 2013. Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying: Fundamentals and technology review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.04.014>
- Gervasi, V., Dall Agnol, R., Cullen, S., McCoy, T., Vucen, S., Crean, A., 2018. Parenteral protein formulations: An overview of approved products within the European Union. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 131, 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.011>
- Gohel, M., Jogani, P.D., 2005. A review of co-processed directly compressible excipients. *J Pharm Pharm Sci* 8, 76–93.
- Gong, X., Sun, C.C., 2015. A new tablet brittleness index. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93, 260–266.
- Green, J.L., Angell, C.A., 1989. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *J. Phys. Chem.* 93, 2880–2882. <https://doi.org/10.1021/j100345a006>
- Gunsel, W.C., Lachman, L., 1963. Comparative evaluation of tablet formulations prepared from conventionally-processed and spray-dried lactose. *J. Pharm. Sci.* 52, 178–182.
- Guo, J., 2004. Lactose in pharmaceutical applications. *Drug Deliv.* 4, 7.
- Haddadzadegan, S., Dorkoosh, F., Bernkop-Schnürch, A., 2022. Oral delivery of therapeutic peptides and proteins: Technology landscape of lipid-based nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 182, 114097. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114097>
- Hageman, M.J., 1988. The Role of Moisture in Protein Stability. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 14, 2047–2070. <https://doi.org/10.3109/03639048809152002>
- Hancock, B.C., Carlson, G.T., Ladipo, D.D., Langdon, B.A., Mullarney, M.P., 2002. Comparison of the mechanical properties of the crystalline and amorphous forms of a drug substance. *Int. J. Pharm.* 241, 73–85.
- Hancock, B.C., Zografi, G., 1997. Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems. *J. Pharm. Sci.* 86, 1–12. <https://doi.org/10.1021/js9601896>
- Haque, M.A., Timilsena, Y.P., Adhikari, B., 2015. Spray drying. *Dry. Technol. Foods Fundam. Appl.* Nema PK Kaur BP Mujumdar Eds New India Publ. Agency India 374.
- Haque, Md.K., Roos, Y.H., 2006. Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 7, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.12.004>
- Haque, Md.K., Roos, Y.H., 2005. Crystallization and X-ray diffraction of spray-dried and freeze-dried amorphous lactose. *Carbohydr. Res.* 340, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.11.026>
- He, X., Seceast, P.J., Amidon, G.E., 2007. Mechanistic study of the effect of roller compaction and lubricant on tablet mechanical strength. *J. Pharm. Sci.* 96, 1342–1355.
- Heckel, R., 1961a. An analysis of powder compaction phenomena. *Trans Met. Soc AIME* 221, 1001–1008.
- Heckel, R., 1961b. Density-pressure relationships in powder compaction. *Trans Met. Soc AIME* 221, 671–675.
- Hedoux, A., 2015. Lyophilisation de produits pharmaceutiques et biopharmaceutiques. *Médicam. Prod. Pharm.* <https://doi.org/10.51257/a-v1-pha2026>

- Her, L.-M., Nail, S.L., 1994. Measurement of glass transition temperatures of freeze-concentrated solutes by differential scanning calorimetry. *Pharm. Res.* 11, 54–59.
- Hersey, J.A., Rees, J., 1970. The effect of particle size on the consolidation of powders during compaction. *Part. Size Anal.* 33–41.
- Hiestand, E., Wells, J., Peot, C., Ochs, J., 1977. Physical processes of tableting. *J. Pharm. Sci.* 66, 510–519.
- Hottot, A., Vessot, S., Andrieu, J., 2007. Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 46, 666–674. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.09.003>
- Hottot, A., Vessot, S., Andrieu, J., 2004. A direct characterization method of the ice morphology. Relationship between mean crystals size and primary drying times of freeze-drying processes. *Dry. Technol.* 22, 2009–2021.
- Hsein, H., Auffray, J., Noel, T., Tchoreloff, P., 2022. Recent advances and persistent challenges in the design of freeze-drying process for monoclonal antibodies. *Pharm. Dev. Technol.* 27, 942–955. <https://doi.org/10.1080/10837450.2022.2131818>
- Hsein, H., Madi, C., Mazel, V., Tchoreloff, P., Busignies, V., 2023. Tableting properties of freeze-dried trehalose: physico-chemical and mechanical investigation. *Int. J. Pharm.* 123598. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123598>
- Hulse, W.L., Forbes, R.T., Bonner, M.C., Getrost, M., 2009a. Influence of protein on mannitol polymorphic form produced during co-spray drying. *Int. J. Pharm.* 382, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.007>
- Hulse, W.L., Forbes, R.T., Bonner, M.C., Getrost, M., 2009b. The characterization and comparison of spray-dried mannitol samples. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35, 712–718. <https://doi.org/10.1080/03639040802516491>
- ICH guide lines, 2010. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, in: Tietje, C., Brouder, A. (Eds.), *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*. Brill | Nijhoff, pp. 1041–1053. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897>
- Ilić, I., Govedarica, B., Srčić, S., others, 2013. Deformation properties of pharmaceutical excipients determined using an in-die and out-die method. *Int. J. Pharm.* 446, 6–15.
- Imamura, K., Maruyama, Y., Tanaka, K., Yokoyama, T., Imanaka, H., Nakanishi, K., 2008. True Density Analysis of a Freeze-Dried Amorphous Sugar Matrix. *J. Pharm. Sci.* 97, 2789–2797. <https://doi.org/10.1002/jps.21202>
- Iwai, J., Ogawa, N., Nagase, H., Endo, T., Loftsson, T., Ueda, H., 2007. Effects of various cyclodextrins on the stability of freeze-dried lactate dehydrogenase. *J. Pharm. Sci.* 96, 3140–3143. <https://doi.org/10.1002/jps.20847>
- Iwuagwu, M., Onyekweli, A., 2003. The brittle fracture tendency of reworked paracetamol tablets. *W Afr J Pharm* 17, 56–65.
- Izutsu, K., 2018. Applications of freezing and freeze-drying in pharmaceutical formulations. *Surviv. Strateg. Extreme Cold Desiccation Adapt. Mech. Their Appl.* 371–383.
- Izutsu, K., Kojima, S., 2002. Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 1033–1039. <https://doi.org/10.1211/002235702320266172>
- Jennings, T., 1999. *Lyophilisation: Introduction and basic principles*. Denver.

- Jiang, S., Nail, S.L., 1998. Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 249–257. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00007-1)
- Jivraj, M., Martini, L.G., Thomson, C.M., 2000. An overview of the different excipients useful for the direct compression of tablets. *Pharm. Sci. Technol. Today* 3, 58–63. [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(99\)00237-0](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(99)00237-0)
- Jovanović, N., Bouchard, A., Hofland, G.W., Witkamp, G.-J., Crommelin, D.J., Jiskoot, W., 2006. Distinct effects of sucrose and trehalose on protein stability during supercritical fluid drying and freeze-drying. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 336–345.
- Kaialy, W., Hussain, T., Alhalaweh, A., Nokhodchi, A., 2014. Towards a More Desirable Dry Powder Inhaler Formulation: Large Spray-Dried Mannitol Microspheres Outperform Small Microspheres. *Pharm. Res.* 31, 60–76. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1132-2>
- Kasper, J.C., Friess, W., 2011. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78, 248–263. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.010>
- Kaur, P., Elsayed, A., Subramanian, J., Singh, A., 2021. Encapsulation of carotenoids with sucrose by co-crystallization: Physicochemical properties, characterization and thermal stability of pigments. *LWT* 140, 110810. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110810>
- Kaur, V., Mehara, N., 2016. A review on: Importance of superdisintegrants on immediate release tablets. *Int. J. Res. Sci. Innov.* 3, 39–43.
- Kawai, K., Suzuki, T., 2007. Stabilizing Effect of Four Types of Disaccharide on the Enzymatic Activity of Freeze-dried Lactate Dehydrogenase: Step by Step Evaluation from Freezing to Storage. *Pharm. Res.* 24, 1883–1890. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9312-6>
- Kawakita, K., Tsutsumi, Y., 1965. An empirical equation of state for powder compression. *Jpn. J. Appl. Phys.* 4, 56.
- Kett, V., McMahon, D., Ward, K., 2005. Thermoanalytical techniques for the investigation of the freeze drying process and freeze-dried products. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 6, 239–250.
- « Kilian Tablet Press Machines - Romaco ». Consulté le: 26 septembre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.romaco.com/products/tableting>
- Kinch, M.S., 2015. An overview of FDA-approved biologics medicines. *Drug Discov. Today* 20, 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.003>
- Klukkert, M., van de Weert, M., Fanø, M., Rades, T., Leopold, C.S., 2015. Influence of Tableting on the Conformation and Thermal Stability of Trypsin as a Model Protein. *J. Pharm. Sci.* 104, 4314–4321. <https://doi.org/10.1002/jps.24672>
- Konstantinidis, A.K., Kuu, W., Otten, L., Nail, S.L., Sever, R.R., 2011. Controlled nucleation in freeze-drying: Effects on pore size in the dried product layer, mass transfer resistance, and primary drying rate. *J. Pharm. Sci.* 100, 3453–3470.
- Kramer, M., Sennhenn, B., Lee, G., 2002. Freeze-drying using vacuum-induced surface freezing. *J. Pharm. Sci.* 91, 433–443.
- Kuentz, M., Leuenberger, H., 1999. Pressure susceptibility of polymer tablets as a critical property: A modified heckel equation. *J. Pharm. Sci.* 88, 174–179. <https://doi.org/10.1021/js980369a>
- Lammert, A.M., Schmidt, S.J., Day, G.A., 1998. Water activity and solubility of trehalose. *Food Chem.*, vol. 61, n° 1-2, p. 139-144, doi: 10.1016/S0308-8146(97)00132-5.
- Lerk, C.F., 1993. Consolidation and compaction of lactose. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 19, 2359–2398.

- Leuenberger, H., Rohera, B.D., 1986. Fundamentals of powder compression. I. The compactibility and compressibility of pharmaceutical powders. *Pharm. Res.* 3, 12–22.
- Littringer, E.M., Mescher, A., Schroettner, H., Achelis, L., Walzel, P., Urbanetz, N.A., 2012. Spray dried mannitol carrier particles with tailored surface properties – The influence of carrier surface roughness and shape. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.05.001>
- Littringer, E.M., Noisternig, M.F., Mescher, A., Schroettner, H., Walzel, P., Griesser, U.J., Urbanetz, N.A., 2013. The morphology and various densities of spray dried mannitol. *Powder Technol.* 246, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.05.004>
- Liu, J., 2006. Physical Characterization of Pharmaceutical Formulations in Frozen and Freeze-Dried Solid States: Techniques and Applications in Freeze-Drying Development. *Pharm. Dev. Technol.* 11, 3–28. <https://doi.org/10.1080/10837450500463729>
- Lu, W., Wang, S., Lin, R., Yang, X., Cheng, Z., Liu, W., 2022. Unveiling the importance of process parameters on droplet shrinkage and crystallization behaviors of easily crystalline material during spray drying. *Dry. Technol.* 40, 326–336.
- Lu, Y., Wang, C., Jiang, B., Sun, C.C., Hoag, S.W., 2021. Effects of compaction and storage conditions on stability of intravenous immunoglobulin – Implication on developing oral tablets of biologics. *Int. J. Pharm.* 604, 120737. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120737>
- Luyet, B., 1958. Pattern of ice formation in some aqueous solutions. *Biodynamica* 8, 1–6.
- Maa, Y.-F., Costantino, H.R., Nguyen, P.-A., Hsu, C.C., 1997. The effect of operating and formulation variables on the morphology of spray-dried protein particles. *Pharm. Dev. Technol.* 2, 213–223.
- Maa, Y.-F., Nguyen, P.-A., Sweeney, T., Shire, S.J., Hsu, C.C., 1999. Protein inhalation powders: spray drying vs spray freeze drying. *Pharm. Res.* 16, 249–254.
- Maas, S.G., Schaldach, G., Littringer, E.M., Mescher, A., Griesser, U.J., Braun, D.E., Walzel, P.E., Urbanetz, N.A., 2011. The impact of spray drying outlet temperature on the particle morphology of mannitol. *Powder Technol.* 213, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2011.06.024>
- Madi, C., Hsein, H., Busignies, V., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2024. Tableting behavior of freeze and spray-dried excipients in pharmaceutical formulations. *Int. J. Pharm.* 656, 124059. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124059>
- Masters, K., 2004. Applying spray drying to customized powder manufacture. *Chin. J. Chem. Eng.* 12, 744.
- Maurer, J.M., Hofman, S., Schellekens, R.C., Tonnis, W.F., Dubois, A.O., Woerdenbag, H.J., Hinrichs, W.L., Kosterink, J.G., Frijlink, H.W., 2016. Development and potential application of an oral ColoPulse infliximab tablet with colon specific release: A feasibility study. *Int. J. Pharm.* 505, 175–186.
- Maury, M., Murphy, K., Kumar, S., Shi, L., Lee, G., 2005. Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 565–573. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.10.002>
- Mazel, V., Tchoreloff, P., 2023. Indices for the brittleness of pharmaceutical tablets: A reassessment. *Int. J. Pharm.* 645, 123364. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123364>
- Mazel, V., Tchoreloff, P., 2022. Lamination of pharmaceutical tablets: classification and influence of process parameters. *J. Pharm. Sci.* 111, 1480–1485.
- Mazel, V., Tchoreloff, P., 2020. Applicability of impulse excitation technique as a tool to characterize the elastic properties of pharmaceutical tablets: Experimental and numerical study. *Int. J. Pharm.* 590, 119892. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119892>

- McCormick, D., 2005. Evolutions in direct compression. *Pharm. Technol.* 2003 29, 52–62.
- McSweeney, P., Fox, P.F. (Eds.), 2009. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5>
- Megarry, A.J., Booth, J., Burley, J., 2011. Amorphous trehalose dihydrate by cryogenic milling. *Carbohydr. Res.* 346, 1061–1064. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.011>
- Mehmood, Y., Farooq, U., 2015. Excipients Use in Parenteral and Lyophilized Formulation Development. *Open Science Journal of pharmacy and pharmacology*. Vol. 3, No. 3. 19–27.
- Mensink, M.A., Frijlink, H.W., Van Der Voort Maarschalk, K., Hinrichs, W.L.J., 2017. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 114, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.024>
- Meynard, J., Amado-Becker, F., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2022a. Characterization of the viscoelasticity of pharmaceutical tablets using impulse excitation technique. *Int. J. Pharm.* 613, 121410. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121410>
- Meynard, J., Amado-Becker, F., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2022b. On the complexity of predicting tablet capping. *Int. J. Pharm.* 623, 121949. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121949>
- Meynard, J., Amado-Becker, F., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2021. Use of impulse excitation technique for the characterization of the elastic anisotropy of pharmaceutical tablets. *Int. J. Pharm.* 605, 120797. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120797>
- Moore, E.B., Molinero, V., 2011. Structural transformation in supercooled water controls the crystallization rate of ice. *Nature* 479, 506–508. <https://doi.org/10.1038/nature10586>
- Mumenthaler, M., Hsu, C.C., Pearlman, R., 1994. Feasibility study on spray-drying protein pharmaceuticals: recombinant human growth hormone and tissue-type plasminogen activator. *Pharm. Res.* 11, 12–20.
- Nail, S.L., Jiang, S., Chongprasert, S., Knopp, S.A., 2002. Fundamentals of freeze-drying. *Dev. Manuf. Protein Pharm.* 281–360.
- Nakamura, H., Sugino, Y., Watano, S., 2012. In-Die Evaluation of Capping Tendency of Pharmaceutical Tablets Using Force-Displacement Curve and Stress Relaxation Parameter. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 60, 772–777. <https://doi.org/10.1248/cpb.60.772>
- Ohuri, R., Akita, T., Yamashita, C., 2018. Effect of temperature ramp rate during the primary drying process on the properties of amorphous-based lyophilized cake, Part 2: Successful lyophilization by adopting a fast ramp rate during primary drying in protein formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 130, 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.06.010>
- Ohtake, S., Kita, Y., Arakawa, T., 2011. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 1053–1073. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.011>
- Okor, R., Eichie, F., Ngwa, C., 1998. Correlation between tablet mechanical strength and brittle fracture tendency. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 4, 511–513.
- Omar, A.M.E., Roos, Y.H., 2007. Water sorption and time-dependent crystallization behaviour of freeze-dried lactose–salt mixtures. *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.12.006>
- Onyekweli, A., Okore, V., Iwuagwu, M., 2004. The plastoelasticity of acid treated Tapioca. *W Afr J Pharm* 18, 31–36.
- Otsuka, M., Fukui, Y., Otsuka, K., Ozaki, Y., 2006. Comparative evaluation of bioactivity change of crystalline trypsin during compression by chemoinformatics and 2-D Fourier-transform infrared spectroscopy. *The Analyst* 131, 1116. <https://doi.org/10.1039/b604299f>

- Parker, A., Rigby-Singleton, S., Perkins, M., Bates, D., Le Roux, D., Roberts, C.J., Madden-Smith, C., Lewis, L., Teagarden, D.L., Johnson, R.E., others, 2010. Determination of the influence of primary drying rates on the microscale structural attributes and physicochemical properties of protein containing lyophilized products. *J. Pharm. Sci.* 99, 4616–4629.
- Patapoff, T.W., Overcashier, D.E., 2002. The importance of freezing on lyophilization cycle development. *Biopharm* 15, 16–21.
- Patel, B.B., Patel, J.K., Chakraborty, S., Shukla, D., 2015. Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. *Saudi Pharm. J.* 23, 352–365. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.013>
- Patel, S.M., Nail, S.L., Pikal, M.J., Geidobler, R., Winter, G., Hawe, A., Davagnino, J., Rambhatla Gupta, S., 2017. Lyophilized Drug Product Cake Appearance: What Is Acceptable? *J. Pharm. Sci.* 106, 1706–1721. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.014>
- Paul, S., Chang, S.-Y., Dun, J., Sun, W.-J., Wang, K., Tajarobi, P., Boissier, C., Sun, C.C., 2018. Comparative analyses of flow and compaction properties of diverse mannitol and lactose grades. *Int. J. Pharm.* 546, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.058>
- Paul, S., Tajarobi, P., Boissier, C., Sun, C.C., 2019. Tableting performance of various mannitol and lactose grades assessed by compaction simulation and chemometrical analysis. *Int. J. Pharm.* 566, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.030>
- Persson, A.-S., Pazesh, S., Alderborn, G., 2022. Tableability and compactibility of α -lactose monohydrate powders of different particle size. I. Experimental comparison. *Pharm. Dev. Technol.* 27, 319–330. <https://doi.org/10.1080/10837450.2022.2051550>
- Petersen, A., Rau, G., Glasmacher, B., 2006. Reduction of primary freeze-drying time by electric field induced ice nucleus formation. *Heat Mass Transf.* 42, 929–938. <https://doi.org/10.1007/s00231-006-0153-3>
- Pietsch, W., 1967. Die Festigkeit von Agglomeraten. *Chem Techn* 19, 259–266.
- Pikal, M., Shah, S., Roy, M., Putman, R., 1990. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure☆. *Int. J. Pharm.* 60, 203–207. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90074-E](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90074-E)
- Pikal, M.J., 1990. Freeze-drying of proteins. Part I: process design. *BioPharm* 3, 18–27.
- Pikal, M.J., Roy, M.L., Shah, S., 1984. Mass and Heat Transfer in Vial Freeze-Drying of Pharmaceuticals: Role of the Vial. *J. Pharm. Sci.* 73, 1224–1237. <https://doi.org/10.1002/jps.2600730910>
- Pisano, R., Arsiccio, A., Nakagawa, K., Barresi, A.A., 2019. Tuning, measurement and prediction of the impact of freezing on product morphology: A step toward improved design of freeze-drying cycles. *Dry. Technol.* 37, 579–599.
- Pitt, K.G., Heasley, M.G., 2013. Determination of the tensile strength of elongated tablets. *Powder Technol., Special Issue: 5th International Granulation Workshop Granulation across the length scale 2011* 238, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2011.12.060>
- « Poinçon et matrice pour comprimés by Epmo | DirectIndustry ». Consulté le: 26 septembre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.directindustry.fr/prod/epmo/product-60334-569812.html>
- Poornachary, S.K., Parambil, J.V., Chow, P.S., Tan, R.B.H., Heng, J.Y.Y., 2013. Nucleation of Elusive Crystal Polymorphs at the Solution–Substrate Contact Line. *Cryst. Growth Des.* 13, 1180–1186. <https://doi.org/10.1021/cg301597d>
- Pramanick, S., Singodia, D., Chandel, V., 2013. Excipient Selection In Parenteral Formulation Development 45, n°3.

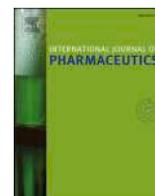
- Prestrelski, Steven J, Arakawa, T., Carpenter, J.F., 1993a. Separation of freezing-and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization: II. Structural studies using infrared spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 465–473.
- Prestrelski, S.J., Tedeschi, N., Arakawa, T., Carpenter, J.F., 1993b. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* 65, 661–671. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81120-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81120-2)
- Procopio, A., Zavaliangos, A., Cunningham, J., 2003. Analysis of the diametrical compression test and the applicability to plastically deforming materials. *J. Mater. Sci.* 38, 3629–3639.
- Rambhatla, S., Ramot, R., Bhugra, C., Pikal, M.J., 2004. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying: II. Control and characterization of the degree of supercooling. *AAPS PharmSciTech* 5, 54–62. <https://doi.org/10.1208/pt050458>
- Randolph, T.W., 1997. Phase Separation of Excipients during Lyophilization: Effects on Protein Stability. *J. Pharm. Sci.* 86, 1198–1203. <https://doi.org/10.1021/js970135b>
- Rayaprolu, B.M., Strawser, J.J., Anyarambhatla, G., 2018. Excipients in parenteral formulations: selection considerations and effective utilization with small molecules and biologics. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44, 1565–1571. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1483392>
- Richards, A.B., Krakowka, S., Dexter, L.B., Schmid, H., Wolterbeek, A.P.M., Waalkens-Berendsen, D.H., Shigoyuki, A., Kurimoto, M., 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem. Toxicol.* 40, 871–898. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00011-X)
- Remmele, L., Krishnan, S., J Callahan, W., 2012. Development of stable lyophilized protein drug products. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 471–496.
- Roberts, R., Rowe, R., 1985. The effect of punch velocity on the compaction of a variety of materials. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 377–384.
- Rodrigues, M.A., Rego, P., Geraldés, V., Connor, L.E., Oswald, I.D.H., Sztucki, M., Shalaev, E., 2021. Mannitol Crystallization at Sub-Zero Temperatures: Time/Temperature-Resolved Synchrotron X-ray Diffraction Study and the Phase Diagram. *J. Phys. Chem. Lett.* 12, 1453–1460. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c03680>
- Roe, K.D., Labuza, T.P., 2005. Glass Transition and Crystallization of Amorphous Trehalose-sucrose Mixtures. *Int. J. Food Prop.* 8, 559–574. <https://doi.org/10.1080/10942910500269824>
- Roos, Y., 1993. Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 238, 39–48. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)87004-C](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)87004-C)
- Roos, Y.H., Drusch, S., 2015. Phase transitions in foods. Academic Press. 2, 33–45.
- Roughton, B.C., Topp, E.M., Camarda, K.V., 2012. Use of glass transitions in carbohydrate excipient design for lyophilized protein formulations. *Comput. Chem. Eng.* 36, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2011.07.018>
- Rumpf, H., 1974. Die wissenschaft des agglomerierens. *Chem. Ing. Tech.* 46, 1–11.
- Rumpf, H., Sommer, K., Steier, K., 1976. Mechanismen der Haftkraftverstärkung bei der Partikelhaftung durch plastisches Verformen, Sintern und viskoelastisches Fließen. *Chem. Ing. Tech.* 48, 300–307.
- Saclier, M., Peczalski, R., Andrieu, J., 2010. Effect of ultrasonically induced nucleation on ice crystals' size and shape during freezing in vials. *Chem. Eng. Sci.* 65, 3064–3071. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.01.035>
- Saha, B.C., Racine, F.M., 2011. Biotechnological production of mannitol and its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 879–891. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2979-3>

- Schersch, K., Betz, O., Garidel, P., Muehlau, S., Bassarab, S., Winter, G., 2010. Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on pharmaceutically relevant proteins I: Stability after freeze-drying. *J. Pharm. Sci.* 99, 2256–2278. <https://doi.org/10.1002/jps.22000>
- Schneid, S.C., Gieseler, H., Kessler, W.J., Luthra, S.A., Pikal, M.J., 2011. Optimization of the secondary drying step in freeze drying using TDLAS technology. *Aaps Pharmscitech* 12, 379–387.
- Schott, H., Kwan, L.C., Feldman, S., 1982. The role of surfactants in the release of very slightly soluble drugs from tablets. *J. Pharm. Sci.* 71, 1038–1045.
- Schubert, H., 1979. Grundlagen des agglomerierens. *Chem. Ing. Tech.* 51, 266–277.
- Searles, J.A., Carpenter, J.F., Randolph, T.W., 2001. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *J. Pharm. Sci.* 90, 860–871.
- Sebhatu, T., Alderborn, G., 1999. Relationships between the effective interparticulate contact area and the tensile strength of tablets of amorphous and crystalline lactose of varying particle size. *Eur. J. Pharm. Sci.* 8, 235–242.
- Shibkov, A.A., Golovin, Yu.I., Zheltov, M.A., Korolev, A.A., Leonov, A.A., 2003. Morphology diagram of nonequilibrium patterns of ice crystals growing in supercooled water. *Phys. Stat. Mech. Its Appl.* 319, 65–79. [https://doi.org/10.1016/S0378-4371\(02\)01517-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4371(02)01517-0)
- Shotton, E., 1972. The compression of powders. *Pharm Ind* 34, 256–62.
- Simperler, A., Kornherr, A., Chopra, R., Bonnet, P.A., Jones, W., Motherwell, W.D.S., Zifferer, G., 2006. Glass Transition Temperature of Glucose, Sucrose, and Trehalose: An Experimental and in Silico Study. *J. Phys. Chem. B* 110, 19678–19684. <https://doi.org/10.1021/jp063134t>
- « Spray Dryers ». Consulté le: 26 septembre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.gea.com/en/products/dryers-particle-processing/spray-dryers/>
- Stange, U., Scherf-Clavel, M., Gieseler, H., 2013. Application of Gas Pycnometry for the Density Measurement of Freeze-Dried Products. *J. Pharm. Sci.* 102, 4087–4099. <https://doi.org/10.1002/jps.23723>
- Su, W., Zhang, Y., Liu, J., Ma, M., Guo, P., Liu, X., Wang, H., Li, C., 2020. Molecular Dynamic Simulation of D-Mannitol Polymorphs in Solid State and in Solution Relating With Spontaneous Nucleation. *J. Pharm. Sci.* 109, 1537–1546. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.01.012>
- Sun, C.C., Hou, H., Gao, P., Ma, C., Medina, C., Alvarez, F.J., 2009. Development of a high drug load tablet formulation based on assessment of powder manufacturability: moving towards quality by design. *J. Pharm. Sci.* 98, 239–247.
- Sundaramurthi, P., Suryanarayanan, R., 2010. Trehalose Crystallization During Freeze-Drying: Implications On Lyoprotection. *J. Phys. Chem. Lett.* 1, 510–514. <https://doi.org/10.1021/jz900338m>
- Surana, R., Pyne, A., Suryanarayanan, R., 2004. Effect of Preparation Method on Physical Properties of Amorphous Trehalose. *Pharm. Res.* 21, 1167–1176. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000033003.17251.c3>
- Tang, X. (Charlie), Pikal, M.J., 2004. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharm. Res.* 21, 191–200. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016234.73023.75>
- Tchoreloff, P., 2024. La lyophilisation : Couple produit/procédé, cours dispensé à l'Université de Bordeaux.

- Thomas, L. S. Shumway, et L. D. Hansen, « Quantitative X-Ray Diffraction Determination of α -Lactose Monohydrate and β -Lactose in Chocolate », *J. Food Sci.*, vol. 74, n° 7, sept. 2009, doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01256.x.
- Tomar, M., Kumar, S.A., Raj, S.A., 2017. EFFECT OF MOISTURE CONTENT OF EXICIPIENT (MICROCRYSTALLINE CELLULOSE) ON DIRECT COMPRESSIBLE SOLID DOSAGE FORMS. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* Vol. 8, 282-88, doi: 10.13040/IJPSR0975-8232.8(1).282-88.
- Turba, E., Rumpf, H., 1964. Zugfestigkeit von Preßlingen mit vorwiegender Bindung durch van der Waals-Kräfte und ihre Beeinflussung durch Adsorptionsschichten. *Chem. Ing. Tech.* 36, 230–240.
- Uhumwangho, M., Okor, R., 2004. Anomalous effect of compression pressure on the brittle fracture tendency of α -cellulose tablets. *Int. J. Pharm.* 284, 69–74.
- United States Pharmacopeia. (2021). *USP <1062> Tablet compression characterization*. <https://www.usp.org>
- Van Groenou, A.B., 1981. Compaction of ceramic powders. *Powder Technol.* 28, 221–228.
- Vanhoorne, V., Almey, R., De Beer, T., Vervaet, C., 2020. Delta-mannitol to enable continuous twin-screw granulation of a highly dosed, poorly compactable formulation. *Int. J. Pharm.* 583, 119374. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119374>
- Vanhoorne, V., Van Bockstal, P.-J., Van Snick, B., Peeters, E., Monteyne, T., Gomes, P., De Beer, T., Remon, J.P., Vervaet, C., 2016. Continuous manufacturing of delta mannitol by cospray drying with PVP. *Int. J. Pharm.* 501, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.001>
- Vollenbroek, J., Hebbink, G.A., Ziffels, S., Steckel, H., 2010. Determination of low levels of amorphous content in inhalation grade lactose by moisture sorption isotherms. *Int. J. Pharm.* 395, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.04.035>
- Wang, D.Q., Hey, J.M., Nail, S.L., 2004. Effect of Collapse on the Stability of Freeze-Dried Recombinant Factor VIII and α -amylase. *J. Pharm. Sci.* 93, 1253–1263. <https://doi.org/10.1002/jps.20065>
- Wang, W., 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 203, 1–60.
- Wei, Y., Wang, C., Jiang, B., Sun, C.C., Middaugh, C.R., 2019. Developing Biologics Tablets: The Effects of Compression on the Structure and Stability of Bovine Serum Albumin and Lysozyme. *Mol. Pharm.* 16, 1119–1131. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01118>
- Whiteman, M., Yarwood, R., 1988. The evaluation of six lactose-based materials as direct compression tablet excipients. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 14, 1023–1040.
- Williams, R., McGinity, J., 1988. The use of tableting indices to study the compaction properties of powders. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 14, 1823–1844.
- Wilson, N.E., Mutukuri, T.T., Zemlyanov, D.Y., Taylor, L.S., Topp, E.M., Zhou, Q.T., 2020. Surface composition and formulation heterogeneity of protein solids produced by spray drying. *Pharm. Res.* 37, 1–11.
- Wilson, N.E., Topp, E.M., Zhou, Q.T., 2019. Effects of drying method and excipient on structure and stability of protein solids using solid-state hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (ssHDX-MS). *Int. J. Pharm.* 567, 118470.
- Wünsch, I., Finke, J., John, E., Juhnke, M., Kwade, A., 2019. A Mathematical Approach to Consider Solid Compressibility in the Compression of Pharmaceutical Powders. *Pharmaceutics* 11, 121. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030121>

- Wünsch, I., Michel, S., Finke, J.H., John, E., Juhnke, M., Kwade, A., 2021. How can single particle compression and nanoindentation contribute to the understanding of pharmaceutical powder compression? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 165, 203–218. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.009>
- Yang, Z., Zhu, W., Yu, D., Bo, Y., Li, J., 2019. Enhanced carbon and nitrogen removal performance of simultaneous anammox and denitrification (SAD) with mannitol addition treating saline wastewater: Enhanced carbon and nitrogen removal performance. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94, 377–388. <https://doi.org/10.1002/jctb.5781>
- Yan-Ying Lee, Jian X Wu, Mingshi Yang, Paul M Young, Frans van den Berg, Jukka Rantanen, 2011. Particle size dependence of polymorphism in spray-dried mannitol. *Eur. J. Pharm. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.06.002>
- Yohannes, B., Abebe, A., 2021. Determination of tensile strength of shaped tablets. *Powder Technol.* 383, 11–18.
- Yoshinari, T., 2003. The improved compaction properties of mannitol after a moisture-induced polymorphic transition. *Int. J. Pharm.* 258, 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00157-1)
- Yost, E., Mazel, V., Sluga, K.K., Nagapudi, K., Muliadi, A.R., 2022. Beyond Brittle/Ductile Classification: Applying Proper Constitutive Mechanical Metrics to Understand the Compression Characteristics of Pharmaceutical Materials. *J. Pharm. Sci.* 111, 1984–1991. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.01.004>
- Yu, L., Huang, J., Jones, K.J., 2005. Measuring Free-Energy Difference between Crystal Polymorphs through Eutectic Melting. *J. Phys. Chem. B* 109, 19915–19922. <https://doi.org/10.1021/jp053653g>
- Zhang, Q., Ames, J.M., Smith, R.D., Baynes, J.W., Metz, T.O., 2009. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J. Proteome Res.* 8, 754–769.
- Zhang, Y., Law, Y., Chakrabarti, S., 2003. Physical properties and compact analysis of commonly used direct compression binders. *AAPS PharmSciTech* 4, 489–499. <https://doi.org/10.1208/pt040462>
- « 2.9.49. Powder flow properties... - European Pharmacopoeia 11.5 ». Consulté le: 26 septembre 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://pheur.edqm.eu/app/11-5/content/11-5/20949E.htm?highlight=on&terms=2.9.49>

Annexes



Tableting properties of freeze-dried trehalose: Physico-chemical and mechanical investigation

Hassana Hsein^{*}, Charbel Madi, Vincent Mazel, Pierre Tchoreloff, Virginie Busignies

Univ. Bordeaux, Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie, CNRS, Arts et Metiers Institute of Technology, Bordeaux INP, INRAE, I2M Bordeaux, Talence, F-33400, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Freeze-drying
Trehalose
Tablet
Compaction behavior
Mechanical properties

ABSTRACT

Freeze-drying of biopharmaceutical products is the method of choice in order to improve their stability and storage conditions. Such freeze-dried products are usually intended for parenteral route administration. However, many biopharmaceutical materials administered by parenteral route are used to treat local diseases particularly in the gastro-intestinal tract. Therefore, many studies concentrate nowadays their effort on developing alternative dosage forms to deliver biopharmaceutical molecules by the oral route. Tablets are the most popular solid pharmaceutical dosage form used for oral administration since they present many advantages, but poor informations are available on the possibility of tableting freeze-dried powders. In this study, we evaluate the compaction behavior of freeze-dried trehalose powder since trehalose is one of the most used cryo and lyoprotectant for the lyophilisation of biopharmaceutical entities. Results show that freeze-dried trehalose powder can be tableted while remaining amorphous and the obtained compacts present very specific properties in terms of compressibility, tableability, brittleness and viscoelasticity compared to the crystalline trehalose and compared to classical pharmaceutical excipients.

1. Introduction

Biopharmaceutical molecules represent nowadays a major therapeutic class and their use gained lots of attention in the last decades since they cover a large panel of therapeutic indications such as cancer, auto-immune disorders, neurological diseases or metabolic disorders (Kesik-Brodacka, 2018). Indeed, the COVID 19 pandemic has boosted the biopharmaceutical market with the development of vaccines and monoclonal antibodies against SARS CoV2 virus (Jaworski, 2021).

Biopharmaceutical active substances such as therapeutic proteins, vaccines or cell and gene therapies are usually obtained and prepared in liquid dosage forms intended for parenteral administration. However, one major challenge in using biopharmaceutical molecules refers to their complex and sensitive macromolecular structure making them prone to physicochemical instabilities such as hydrolysis, deamidation, aggregation or degradation when formulated as aqueous solution (Butreddy et al., 2021). Therefore, dry solid state may be preferred in order to improve their stability. Amongst the different drying strategies, freeze-drying is the method of choice. Freeze-dried drug delivery systems present better biological stability and allow for better shipping,

storage and handling conditions (Liu & Zhou, 2021; Sharma et al., 2021). Process control of freeze-drying implies both the choice of formulation and process parameters and is essential to preserve biopharmaceutical molecules and to achieve the required product quality attributes (Hsein et al., 2022). Formulation strategies mainly consist in adding cryo and lyoprotectors such as sucrose and trehalose, surfactants such as polysorbate 20 or 80, polyols such as mannitol or glycine, or choosing buffer salts to adjust the pH (Bjelošević et al., 2020). Amongst these excipients, the non-reducing sugar trehalose is the most widely used as stabilizer both in commercial biopharmaceutical products and in research papers. The stabilization mechanisms of trehalose during freeze-drying are generally explained by the water replacement theory and by the formation of amorphous material limiting molecular mobility (Ohtake & Wang, 2011; Olsson et al., 2016).

Moreover, obtaining dry products opens the way to the development of other dosage forms than those dedicated to the parenteral administration. Then, developing oral route for biopharmaceutics has been the goal of many studies in the last decades although it still remains highly challenging since the absorption of such hydrophilic and high molecular weight molecules is very limited (Haddadzadegan et al., 2022; Homayun

^{*} Corresponding author: Univ. Bordeaux, Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie, CNRS, Arts et Metiers Institute of Technology, Bordeaux INP, INRAE, I2M Bordeaux, Talence, F-33400, France.

E-mail address: hassana.hsein@u-bordeaux.fr (H. Hsein).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123598>

Received 12 October 2023; Received in revised form 9 November 2023; Accepted 9 November 2023

Available online 11 November 2023

0378-5173/© 2023 Published by Elsevier B.V.

et al., 2019; Madani et al., 2020; Olorunsola et al., 2023; Vass et al., 2019). However, the oral administration of these molecules for the local treatment of some gastrointestinal pathologies may be an interesting option. Nevertheless, this administration will require additional formulation steps to protect the biomolecules from degradation by gastric acidity and by the gastrointestinal tract proteases (Choonara et al., 2014; Homayun et al., 2019). For oral administration, tablets are the most popular solid pharmaceutical dosage form since they present many advantages such as being easy to take and improving patient compliance. Other advantages from industrial standpoint, are the low cost of production and above all, the absence of cold chain requirements and sterility issues (Zhong et al., 2018). However, producing a tablet by powder compaction from a freeze-dried (FD) solid requires additional knowledge and very little information is available about the tableting behavior of these powders. Therefore, the aim of this study is to investigate by a systematic approach, the compaction behavior of FD trehalose and finally, to conclude on a possible use in tablet formulations. Then, a detailed analysis of the physico-chemical and mechanical properties of FD trehalose tablets is carried out and discussed in comparison with crystalline trehalose and traditional pharmaceutical excipients commonly used in direct compression processes.

2. Material and methods

2.1. Materials

Trehalose dihydrate used for freeze-drying was generously given by DFE Pharma (Goch, Germany) and the one used for direct compression was generously given by Nagase (Kyoto, Japan). Three other excipients were used to make tablets: anhydrous calcium phosphate (ACP) (Anhydrous Emcompress®, JRS Pharma, Rosenberg, Germany), granulated lactose monohydrate (GLac) (Tabletose® 80, Meggle, Wasserburg, Germany) and microcrystalline cellulose (MCC) (Vivapur® 12, JRS Pharma Rosenberg, Germany). Magnesium stearate (Ligamed MF-2-V) was obtained from Peter Greven (Bad Münstereifel, Nordrhein-Westfalen, Germany).

2.2. Freeze-drying

Freeze-drying was performed using a Cryotec® pilot freeze-dryer (Montpellier, France). To perform lyophilization, 6 mL of trehalose solutions (5 % w/v in water) were filled in 20 mL glass tubing vials, partially stoppered with rubber stopper and placed on the same shelf of the freeze-dryer. The freeze-drying cycle was carried out as follow, using thermocouples to monitor the product temperature all over the freeze-drying process:

- The freezing step started by cooling shelves to 5 °C with a cooling rate of -1 °C/min and held at 5 °C for 30 min. Shelves were then cooled again to -5 °C with a cooling rate of -1 °C/min and held at -5 °C for 30 min. This step was followed by a final cooling ramp down to -50 °C with a cooling rate of -1 °C/min. The final temperature of -50 °C was held for 2 h.

- During the primary drying step, shelves were heated to -20 °C at +1 °C/min heating rate and the chamber pressure was decreased to 0.1 mbar. Shelves temperature was hold to -20 °C until the convergence of the pressure values of pirani and capacitance manometers gauges was observed.

- To perform the secondary drying step, shelves temperatures were raised to +25 °C at +0.1 °C/min ramp rate then held isothermally for 12 h at a chamber pressure of 0.06 mbar.

At the end of the freeze-drying cycle, vials were closed under vacuum in the freeze dryer before unloading.

2.3. Tableting

Tableting was performed using a “Styl’One” evolution tableting press

(Medelpharm, Beynost, France) which is a single station press. The press is equipped with force sensor (accuracy 10 N) and the displacements of the punches are monitored with an accuracy of 0.01 mm.

Before compression, FD cakes (one vial corresponded to one tablet) were gently ground with a mortar and a pestle. All sample preparation steps were performed in 2 min to limit water uptake and all tablets were produced in a room where the relative humidity was set between 45 and 55 % RH with a temperature of 22 °C.

Two kinds of flat-faced euro B punches were used. One set was round with a diameter of 10 mm diameter. The other was a special set that made it possible to obtain a so-called flattened disc geometry (Mazel et al., 2016). The tablets obtained with this geometry had a diameter of 11 mm with a flat end of 30°. For all the experiments the compressed powder was put manually in the die. An external lubrication system using magnesium stearate was used to lubricate the punches and the die. Compression pressures from 12.5 MPa to 250 MPa were applied to make tablets (250 mg) using the force-driven mode of Analis software. FD powders were compacted at a low and a high compression speeds corresponding to cycle times around 2 s and 70 ms respectively. The other excipients were only compacted at the low speed for comparison purposes.

2.4. Physico-chemical characterizations

2.4.1. Residual moisture content of FD samples

Residual moisture content in the samples was evaluated by Karl Fisher Titration method using a titrator compact 20S (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) with anhydrous methanol as the sample solvent (extra dry methanol (99.9 %, Acroseal®)). Cakes were dispersed in 6 mL of anhydrous methanol and then 1 mL was titrated with Riedel-de Haen Hydranal Composite 2 reagent (Hoechst Celanese Corp., Germany) until the endpoint was reached. Experiments were carried out in triplicate and the water content in % w/w was expressed as mean ± SD.

2.4.2. Thermal behavior

DSC experiments were performed in 40 µL aluminum crucibles hermetically sealed using a DSC3 instrument (Mettler Toledo, Switzerland) equipped with a refrigerated cooling system (RCS). The glass transition temperatures of the maximally freeze-concentrated solution (T_g) was determined on 30 µL of liquid formulations by applying the following cycle: a temperature decrease from 25 to -50 °C at -1 °C/min, followed by an isotherm at -50 °C for 10 min and finally heating of the sample from -50 °C to 25 °C at +10 °C/min. For the determination of the glass temperature (T_g) of solid samples (lyophilized samples and tablets) about 5 to 10 mg of the samples were placed in the crucibles and sealed. DSC was then carried out by an initial isotherm at 10 °C followed by a ramp of temperature from 10 to 220 °C at a rate of +10 °C/min. In all experiments, an empty aluminum crucible crimped in the same manner as the sample pans was used as reference. T_g and T_g' correspond to the midpoint of the glass transition in the heating scan of each DSC experiment.

2.4.3. Scanning electron microscopy

The morphologies of FD samples and tablets were studied by scanning electron microscopy (SEM) using the analyze mode (Hitachi TM3000, Japan). For FD samples, a sharp blade was used to cut a thin slice along the cylindrical axis of the cake. For tablets, samples were either directly fixed to aluminium stubs with double-sided carbon tape or broken diametrically in order to respectively visualize the external and internal morphologies of the tablets.

2.4.4. DRX

The FD samples and tablets were analyzed with a benchtop powder X-ray diffractometer (MiniFlex2, Rigaku, Japan) with Cu K α radiation (30 kV, 15 mA). Each scan was performed in the 2 θ range from 0 to 60° with a scan speed of 5°/min.

2.5. Compaction behavior

2.5.1. Tablet's porosity and elastic recovery

Porosities (in-die and out-of-die) and elastic recovery (% ERT) were calculated using equations (1) and (2) respectively.

$$\epsilon = 1 - \frac{\rho_{\text{apparent}}}{\rho_{\text{pycno}}} \quad (1)$$

$$\text{ERT}(\%) = \frac{V_f - V_{\text{min}}}{V_{\text{min}}} \times 100 \quad (2)$$

Apparent density (ρ_{apparent}) was calculated from tablet's volume (minimal volume under pressure, V_{min} for in-die determination or final volume of tablets, V_f for out-of-die measurement). Powder's pycnometric densities (ρ_{pycno}) were evaluated using a helium pycnometer (Accupyc II 1340, Micromeritics, Mérignac) with a 1 cm³ cell and a cycle of 20 purges and 20 measurements.

2.5.2. Heckel parameter

In die data were then used to apply Heckel model, in order to determine Heckel parameter (P_y). P_y was obtained from the plot of the natural logarithm of the reciprocal of in-die porosity as a function of compression pressure (Heckel, 1961; Hersey & Rees, 1970). On this plot, a linear regression was performed on its linear part where R^2 was greater than 0.99.

P_y was used to estimate the strain-rate sensitivity (SRS) which makes it possible to characterize the influence of compaction speed on material deformation (Roberts & Rowe, 1985). The equation of SRS index is:

$$\text{SRS} = \frac{P_{y2} - P_{y1}}{P_{y2}} \times 100 \quad (3)$$

where P_{y1} and P_{y2} are the mean yield pressure for compression cycle of 2000 ms and 70 ms, respectively.

2.5.3. Tablets' mechanical properties

Diametral compression tests were performed using a TA.HD plus texture analyzer (Stable microsystems, Surrey, United Kingdom) at a constant speed of 0.1 mm.s⁻¹ and an acquisition frequency of 500 Hz. The tests were performed in triplicate for each condition (compaction pressure and formulation). The tensile strengths (σ) of the tested tablets were then calculated as follows (Fell and Newton, 1970):

$$\sigma(\text{MPa}) = \frac{2F}{\pi Dh} \quad (4)$$

with F the force (N) required to break the tablet diametrically, h and D the tablet's thickness and diameter (mm).

Tablets' brittle fracture index (BFI) were determined using the tablets with the flattened geometry to evaluate the deformation behavior under breakage and the sensitivity to a stress concentration (Croquelois et al., 2017; Hiestand et al., 1977). This approach consists in comparing the apparent tensile strength of a tablet with and without a hole at its center. Holes of 1 mm of diameter were introduced at the center of the tablet using a drill as described elsewhere (Croquelois et al., 2017). The BFI was calculated using the following equation:

$$\text{BFI} = 0.5 \left(\frac{\sigma}{\sigma_h} - 1 \right) \quad (5)$$

where σ and σ_h are the apparent tensile strengths of tablets without and with a centered hole, respectively.

Finally, in order to characterize the viscoelasticity of the tablets, the damping ratio (ζ_A) was determined using impulse excitation tests following the methodology presented by Meynard et al., 2021.

3. Results and discussion

3.1. Freeze-dried trehalose powder properties

The freeze-drying cycle used in this work was performed at a shelf temperature of -20 °C during primary drying. It is well accepted that the shelf temperature should be adapted to maintain, a product temperature (T_p) below the product's critical formulation temperature (T_c) during the steady state of the primary drying, in order to avoid collapse. Moreover, it is classically accepted that T_c is few degrees above T_g in the case of an amorphous formulation (Tang & Pikal, 2004). T_g of the trehalose formulation used in this work was observed at -29 °C. This value is consistent with those found in the literature (Bjelošević et al., 2020; Wang, 2000). A shelf temperature of -20 °C combined with a chamber pressure of 0.1 mbar resulted in a T_p of -30 °C at the steady state of the primary drying. This value is lower than T_g and correlates with the cake appearance, since elegant cakes (Fig. 1) with a slight shrinkage at the bottom of the vials but without any sign of collapse were obtained (Awotwe Otoo et al., 2014).

Cake morphology was also observed by SEM in order to visualize the internal structure. SEM images showed geometrical prism shaped cells of various sizes similar to a sponge-like matrix (Fig. 2a). The variability in pores dimensions between cells is related to the heterogeneity in the ice crystal sizes formed during freezing. In fact, the shelves ramped freezing method used in this study results in uncontrolled nucleation temperature leading to heterogeneous ice crystals formation. The described foam structure may correspond to "open-celled" foam structures or to "close-celled" with an outlet passageway through which water vapors escape during drying (Liu, 2006). SEM images also showed the presence of holes in the walls between adjacent cells (diameter between 5 and 10 μm). Parker et al (2010) observed the presence of such holes for a sucrose containing protein formulation in both conservative and aggressive freeze-drying cycles (Parker et al., 2010). Therefore, the presence of holes may correspond to local dry layer low resistance which would allow water vapor flow through the wall cells during drying (Searles et al., 2001).

FD trehalose cakes were further characterized in order to study their physico-chemical properties. The residual moisture content of FD trehalose measured by Karl Fischer titration method was determined at 0.52 ± 0.06 %. This value is coherent for future applications since a residual moisture content lower than 1 % is often required for the stabilization of biopharmaceutics (Schneid et al., 2011) due to the observation that many degradation reactions are slowed down below this level (Horn et al., 2018). However, overdrying may lead to protein destabilization. Therefore, the process parameters of the freeze-drying cycle can be optimized as a function of the optimal residual moisture stability of the incorporated biomolecule (Schneid et al., 2011; Hsein et al., 2022).

DRX and DSC techniques were used to analyze the physical state and the chemical structure of trehalose FD powders. DRX showed a crystalline state for trehalose before freeze-drying and an amorphous state at the end of the freeze-drying process (Fig. 3). The amorphous state of trehalose after freeze-drying is consistent with the literature and is the main reason for using trehalose as a highly efficient stabilizers during



Fig. 1. Macroscopic aspect of freeze-dried trehalose cake.

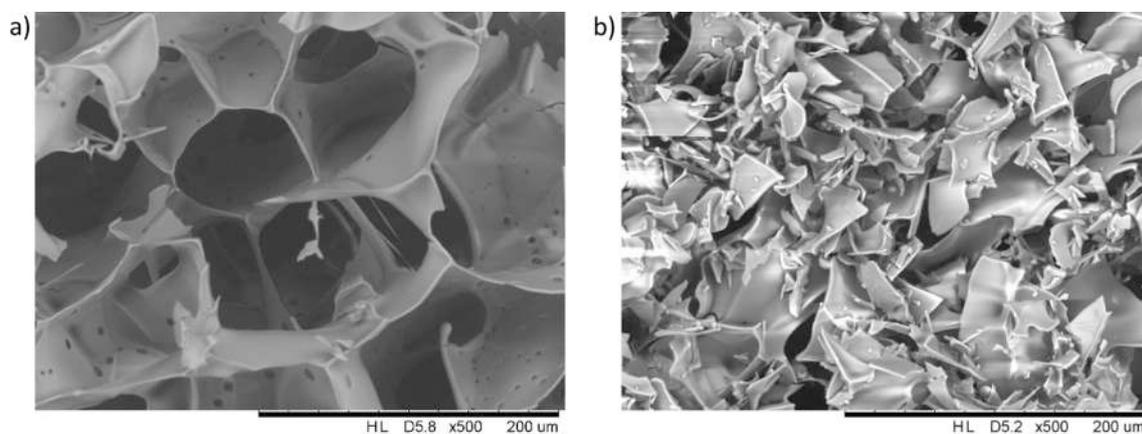


Fig. 2. SEM images of freeze-dried trehalose cakes (a) with sample preparation conserving the sponge like structure, (b) with sample preparation disrupting the freeze-dried cake structure (500× magnification).

the lyophilization process of biological molecules and the following storage (Crowe et al., 1996; Sundaramurthi & Suryanarayanan, 2010).

The DRX results were consolidated by DSC measurements which showed a glass transition temperature for FD trehalose powder ($T_g = 103 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$), a feature of an amorphous material. This characteristic has to be taken into consideration for FD bioproducts since the glass transition temperatures are related to the physical stability of an amorphous formulation and determine the storage temperature and stability. Below the T_g , biopharmaceuticals should be stable due to limited molecular mobility and high viscosity while above T_g , the molecular mobility increases, thus decreasing stability during storage. It is often suggested that the FD amorphous product should be kept at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ below its T_g during the storage (even if this rule of thumb must be taken with precaution because storage temperature also depends on the formulation) (Duddu et al., 1997; Liu, 2006). In fact, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ below the T_g is often estimated to be the Kauzmann temperature. It is assumed that below the Kauzmann temperature, any translational molecular mobility is completely inhibited. It means that for a given formulation, the biological is optimally vitrified and there also optimally stabilized. Moreover, since water acts as plasticizer, the T_g value decreases when water content increases. That is the reason why, all vials were closed under vacuum in the freeze dryer chamber and opened just before tableting.

Finally, in the conditions of the chosen freeze-drying cycle, FD trehalose presented a pycnometric density of $1.496 \pm 0.009 \text{ g.cm}^{-3}$ while the crystalline trehalose had a true density of $1.513 \pm 0.005 \text{ g.cm}^{-3}$. This slight decrease in true density due to amorphization is an expected result (Bookwala et al., 2020) and was also observed by (Bourduche et al., 2020) for maltitol and by (Stange et al., 2013) for sucrose as well as by (Hancock et al., 2002) for a drug substance.

3.2. Physico-chemical properties of FD trehalose tablets

The tablets obtained from FD trehalose powder presented interesting physico-chemical characteristics. First, the DRX and DSC results showed that trehalose remained amorphous after compaction but a decrease in T_g values was observed (T_g in the range of 65 to $78 \text{ }^\circ\text{C}$ as a function of tested tablet). The decrease in T_g value is most probably due to water uptake during the sample grinding and during the die filling and tableting (tablet moisture content around 4% as determined by Karl Fischer titration method). A better control of environmental conditions e.g. lower ambient humidity could probably help maintaining higher T_g values if necessary for improving long term stability. The absence of crystallization regardless of the applied pressure is an important indicator which is of great interest for future applications when biomolecules such as proteins will be added to the formulation. These results are in accordance with the results obtained by Eriksson et al

(2002) who demonstrated that FD trehalose remained amorphous after tableting when compacts were conserved at $20 \text{ }^\circ\text{C}/0\% \text{ RH}$. In addition, they showed that the activity of alkaline phosphatase used as a model protein was only conserved when trehalose tablets remained amorphous (storage at $20 \text{ }^\circ\text{C}/0\% \text{ RH}$). A significant or total loss of the protein activity was observed when crystallization occurred respectively for tablets stored at $60 \text{ }^\circ\text{C}/0\% \text{ RH}$ or when FD samples were preconditioned at 33% or 45% RH before tableting (Eriksson et al., 2002).

3.3. Compaction behavior of freeze-dried trehalose powders

3.3.1. Compressibility

Compaction behavior of FD trehalose powders was first evaluated by studying the compressibility profiles. In order to study these properties, the moisture content of the FD powder was an important parameter to take into consideration. Since water acts as a plasticizer, the T_g value of amorphous FD trehalose decreases when water content increases which compromise the physical stability of the produced tablets. In addition, it is established that moisture may influence the compaction behavior of powder and tablets properties such as tablet strength and dissolution rate (Elkhider et al., 2007). Therefore, all vials were closed under vacuum and were stored for maximum two days before tableting. In addition, FD cakes were gently ground using a mortar and a pestle and then quickly filled manually in the die.

Compressibility of FD trehalose was evaluated by plotting the evolution of porosity as a function of applied pressure in-die and out-of-die. Out-of-die compressibility profile (Fig. 4) shows a reduction of porosity to 50% at an applied pressure of 12.5 MPa and to nearly 1% at 250 MPa . As expected, in-die compressibility profile showed lower porosity values reaching -1% at 250 MPa since in-die profile includes tablet elastic deformation (Ilić et al., 2013). We can note that this profile is specific of trehalose in the amorphous FD form. Indeed, in-die and out-of die compressibility profiles showed that crystalline trehalose presents significantly lower porosity values specifically for compaction pressures from 12.5 to 100 MPa indicating that trehalose in the crystalline form is more compressible than the FD amorphous form at low pressures. In parallel to compressibility, the internal morphology of the tablets was observed with SEM (Fig. 5a–h). SEM images of broken FD trehalose tablets showed randomly oriented sheets for applied pressures from 12.5 to 75 MPa indicating that the sheet structure of FD powders was conserved after tableting. High porosity inside the tablets was also observed in this range of pressures and the visible porosity decreased with increasing pressure. These observations consolidate the values obtained for out-of-die porosity as a function of axial pressure presented on Fig. 4. It should be noted that above a pressure of 100 MPa , the morphology changes and one can observe that particles start to merge

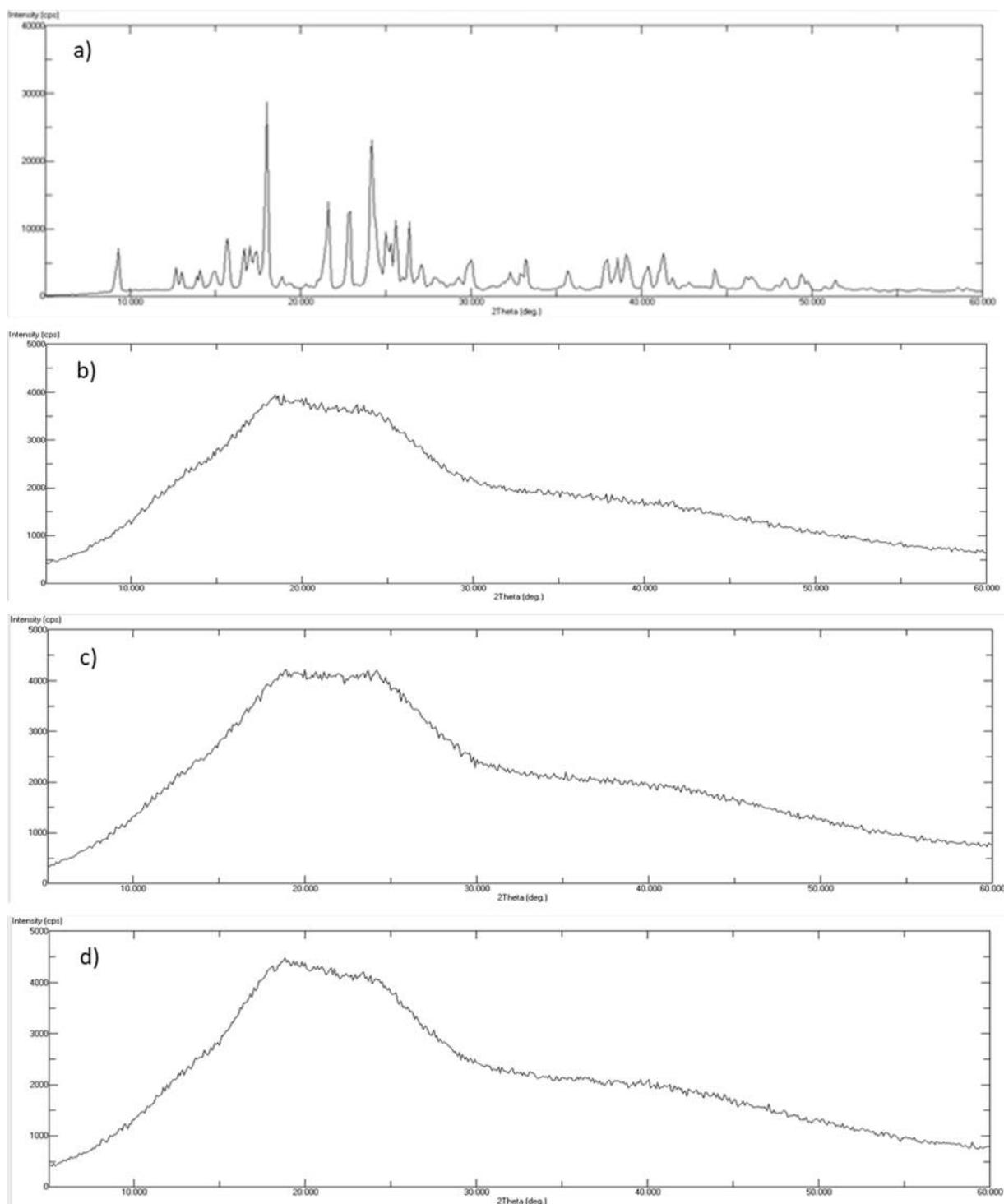


Fig. 3. DRX diffractograms of trehalose powder before freeze-drying (a), FD trehalose powder (b), FD trehalose tablets obtained at compaction pressure of 50 MPa (c) and 150 MPa (d).

resulting in a decrease in tablet's porosity. The preservation of the FD powder morphology inside the tablet as shown in Fig. 5 in addition to the amorphous solid state of tableted FD trehalose (paragraph 3.2) can be an asset for the protection of the structure of incorporated biomolecules.

In a second step, FD trehalose compressibility profile was compared to classical pharmaceutical excipients exhibiting different deformation mechanisms and to some amorphous excipients. Chosen classical pharmaceutical excipients were microcrystalline cellulose, anhydrous calcium phosphate, and granulated lactose monohydrate. FD trehalose

exhibited out-of die compressibility profile quite similar to microcrystalline cellulose while crystalline trehalose's compressibility profile was closer to lactose (Fig. 4).

To understand the influence of the compression speed on compressibility for FD trehalose, the strain rate sensitivity was calculated. Results showed a SRS value of 20 % suggesting a sensitivity to compaction speed observed for a plastic deformation mechanism (Roberts & Rowe, 1985). This value of SRS was the highest between the tested excipients, characterized by SRSs of 12.8, 12.7, 5.5 and 3.5 for crystalline trehalose, MCC, Lac and aCP respectively. It was also

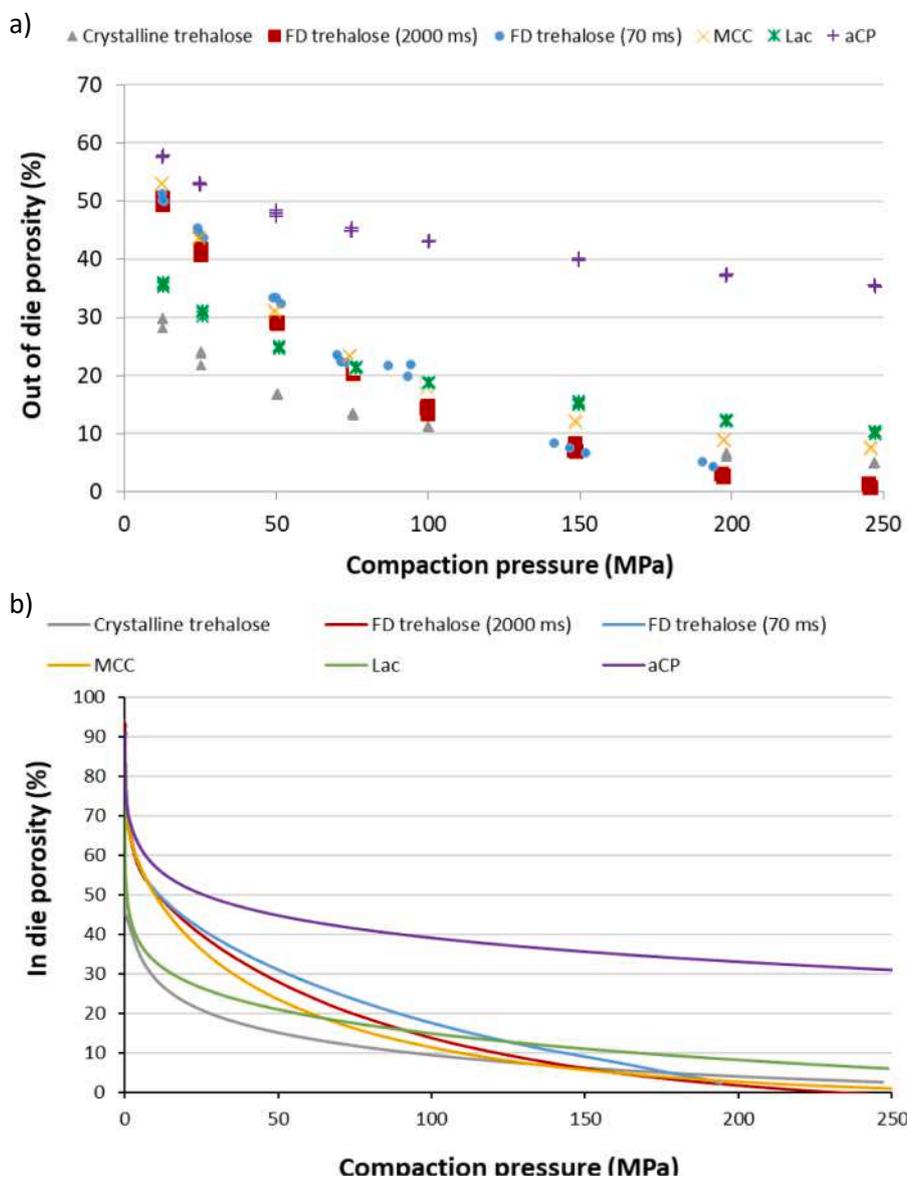


Fig. 4. Out-of-die and in-die compressibility profiles showing the evolution of the out-of-die (a) and the in-die porosity (b) as a function of applied axial compaction pressure. For FD (freeze-dried) trehalose, 2000 ms and 70 ms refer to tableting cycle time, MCC refers to microcrystalline cellulose, Lac refers to lactose monohydrate and aCP refers to anhydrous calcium phosphate.

interesting to observe the differences between the in-die compressibility curves obtained at the two different speeds for FD trehalose. In fact, the curves were superimposed at low pressures, separated at intermediate pressures but tend to overlap again around 200 MPa, which correspond to a pressure where the porosity of the tablet is very low. This kind of behavior is coherent with a viscoplastic behavior (Desbois et al., 2022).

3.3.2. Plastic energy

The plastic energy considered is the total energy given to the powder during the compaction cycle (i.e the total area under the curve force vs thickness). The values were directly calculated by the Analis software. As recommended by Wünsch et al. (Wünsch et al., 2021), the energy was normalized by the volume of solid compacted which makes it possible to compare products with different pycnometric densities. This energy is one of the signature of the compaction behavior of a product and it was also recently suggested that a low plastic energy could be related with problems like capping (Meynard et al., 2022; Nakamura et al., 2012). Of course, the plastic energy depends on the pressure used so comparison must be done for tablets made under the same pressure. The values of the

compaction energies obtained for the different products for tablets made at 150 MPa are presented in Table 1. Whereas crystalline trehalose had a low plastic energy, similar to Lac, FD trehalose had the highest plastic energy of all the studied products. As previously in the case of compressibility, the freeze-drying process has a huge impact on the plastic energy of trehalose.

3.3.3. Tableability

The tableability profiles were studied by measuring the tensile strength of tablets obtained at different pressures. Tensile strength (TS) is a crucial tablet property since tablets should reach the patient intact, without any mechanical damage such as breaking, chipping or capping (Yohannes & Abebe, 2021). It is generally considered that tablet TS higher than 1.7 MPa will be sufficient to ensure adequate mechanical resistance to maintain the physical integrity of the tablet throughout the whole process of production, from compaction to packaging. TS as low as 1 MPa could be adequate for small-scale production where the tablets aren't exposed to significant mechanical forces (McCormick, 2005; Pitt & Heasley, 2013). As shown in Fig. 6, FD trehalose tablets can be

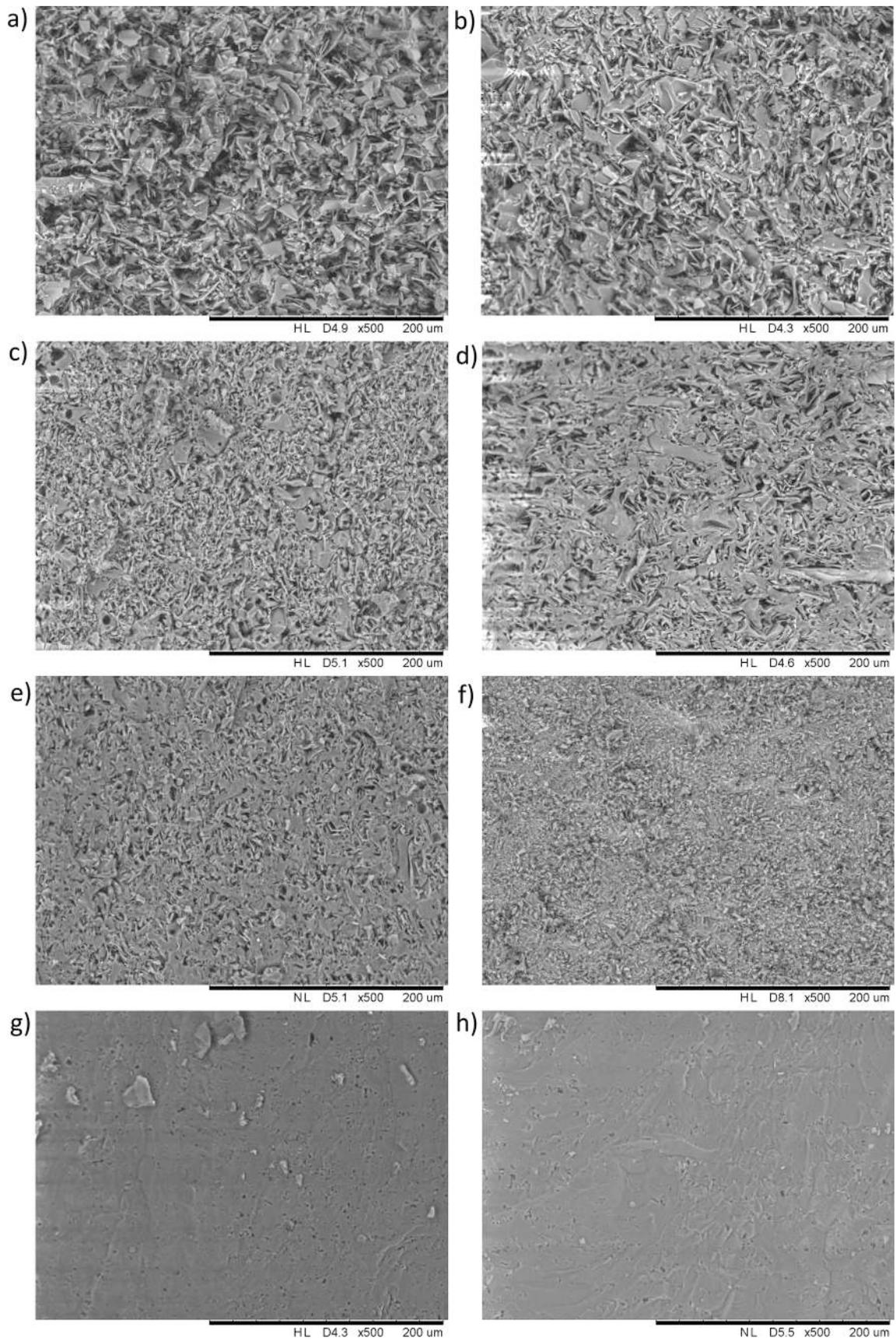


Fig. 5. SEM images of freeze-dried trehalose tablets obtained at 12.5, 25, 50, 75, 100, 150, 200 and 250 MPa respectively (a–h) showing their internal structure (500× magnification).

Table 1

Plastic energy during the compaction cycle (at 150 MPa) for the tested excipients.

Plastic energy ($J.cm^{-3}$)				
FD trehalose	Crystalline trehalose	MCC	Lac	aCP
45.6 ± 0.4	16.4 ± 0.2	38.5 ± 0.1	18.7 ± 0.0	37.1 ± 0.5

obtained under very low compaction pressures with TS of 1.5 MPa and 2.8 MPa for compaction pressure of 25 MPa and 50 MPa respectively. The comparison with the other products studied showed that the tableability profile is very different from crystallized trehalose. On the contrary it is very close to the one of MCC.

Nevertheless, the behavior of FD trehalose tablets under the test is very different from the one obtained for MCC tablets, both obtained under a compaction pressure of 50 MPa, as shown in Fig. 7. It is well-known that under diametral compression MCC tablets behave in a

rather ductile manner, i.e. that the tablet does not behave as an elastic solid until the failure (Gong & Sun, 2015; Mazel & Tchoreloff, 2023; Procopio et al., 2003). This can be observed from the force displacement curves obtained during the test. MCC tablet did not present sudden failure but rather a slow rounding of the curve (Fig. 7). On the contrary FD trehalose presented curves that corresponds to a brittle failure, i.e. to a failure in the elastic domain (Fig. 7). In addition, the FD trehalose tablets obtained under high compression pressures (higher than 75 or 150 MPa depending on the compression speed) exhibited a non conventional breakage pattern during the diametral compression test. In fact, not all tablets broke diametrically which led to a decrease in TS as the compression pressure increased and to significant variability in the results obtained.

The tableability behavior was specific to trehalose in the amorphous FD form since crystalline trehalose necessitated the application of a high compaction pressures in order to obtain compacts with sufficient TS (tablet strength of 1.44 ± 0.02 MPa and 1.79 ± 0.04 MPa at 150 MPa

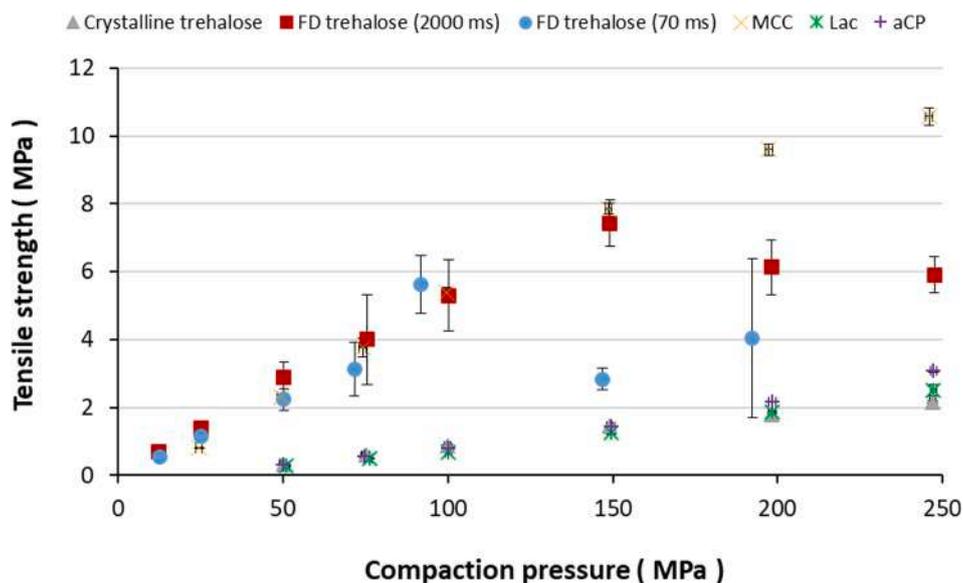


Fig. 6. Tableability profiles showing the evolution of tensile strength as a function of applied axial compaction pressure. For FD (freeze-dried) trehalose, 2000 ms and 70 ms refer to tableting cycle time, MCC refers to microcrystalline cellulose, Lac refers to lactose monohydrate and aCP refers to anhydrous calcium phosphate.

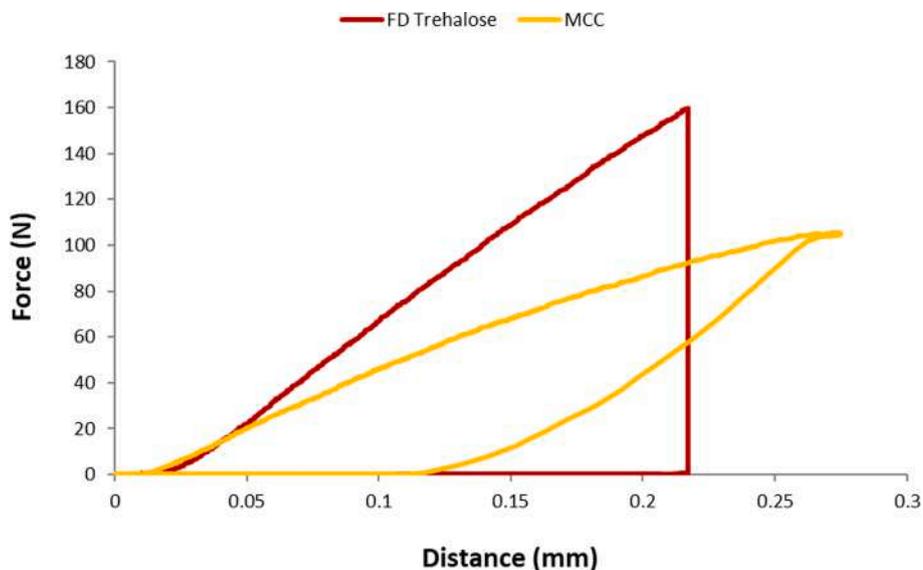


Fig. 7. Force displacement curves obtained during the diametral compression test for FD (freeze-dried) trehalose and MCC (microcrystalline cellulose) tablets obtained at 50 MPa compaction pressure.

and 200 MPa compaction pressure respectively). This difference can be either due to the amorphous state of trehalose or to the specific texture of the FD powder. Indeed, Bourduche et al. (2020) demonstrated that amorphous maltitol presented good cohesion at low compaction pressure unlike to crystalline maltitol (Bourduche et al., 2020).

Finally, the impact of the compaction speed on tabletability profiles was evaluated for some compaction pressure values (25 to 250 MPa for 2 % speed and 25 to 200 MPa for 100 % speed). Considering the variability of the TS obtained it was difficult to see a real difference on the results obtained at low pressures up to 100 MPa. For the two kinetic conditions, trehalose FD showed an extremely cohesive behavior in this range of low compaction pressures. Nevertheless, for high speed compression, TS dropped sharply at 150 MPa and at 200 MPa and lamination was observed on the tablets. To counterbalance this lamination effect, tests have been carried out by adding a precompression step. It was found that using a precompression made it was possible to avoid lamination. This defects might thus be classified as lamination type I according to the classification proposed by Mazel et al. (Mazel & Tchoreloff, 2022) i.e. to a lamination due to air entrapment. The drop in TS at 150 MPa could therefore be due to internal defect that are related to air entrapment most probably linked to the sheet texture of the FD powders.

3.3.4. Brittle fracture index

The brittle Fracture index was introduced by Hiestand to characterize the ability of a material to relieve stresses at points of stress concentration and is supposed to be linked with the brittleness of the tablet (Hiestand et al., 1977; Mazel & Tchoreloff, 2023). FD trehalose BFI was determined by testing tablets obtained at the pressure of interest, 25 MPa (tensile strength about 1.5 MPa), and gave a value of 1.12 indicating a high propensity to brittle fracture. This is coherent with the brittleness behavior observed in the previous part of the failure curves. This value is among the highest values that can be found in the literature (Meynard et al., 2022; Okor et al., 1998). It should be noted that MCC tablets obtained under the same pressure gave a very low BFI (Table 2) which is well-reported in the literature and is also coherent with its ductile failure behavior. No comparison can be done with other excipients compressed at 25 MPa compaction pressure, since obtained tablets at 25 MPa are too friable and no hole can be done into the tablets. In order to compare the FD trehalose BFI to the other excipients (crystalline trehalose, Lac and aCP), BFI was measured on tablets prepared at 150 MPa compaction pressure. It can be noted that the BFI normally increases with the pressure (Croquelois et al., 2020). Results showed (Table 2) that BFI values for MCC, Lac and aCP are far below the values of 1.12 obtained for FD trehalose. The BFI value of the FD trehalose was also significantly increased compared to the crystalline form. Then, trehalose in the FD form was the only tested excipient which presented a so high brittleness.

The brittleness of FD trehalose tablets was also observed during the failure test through the failure patterns observed using high speed camera. One example is given in Fig. 8. As it can be seen the central fracture, which is expected in diametral compression test, was present but other failure were also seen and tablets finally failed with multiple fracture pattern. This observation gave a visual confirmation of the high brittleness of the tablets and could also explain the variability observed

Table 2
Brittle fracture index (BFI) of tested excipients at different compaction pressure.

	Compaction pressure (MPa)	BFI
FD trehalose	25	1.12
Crystalline Trehalose	150	0.20
MCC	25	0.09
	150	0.18
Lac	150	0.23
aCP	150	0.18

in the tensile strength measurement of the FD trehalose tablets obtained at high compression pressures.

3.3.5. Elastic recovery

Elastic recovery of tablets is also an important feature used in compaction characterization. Indeed, a high elastic recovery is often linked with adverse phenomena like capping or chipping (Hiestand et al., 1977). The elastic recovery as a function of applied axial pressure is presented in Fig. 9 for FD, crystalline trehalose, MCC, aCP and Lac. Below 150 MPa, results obtained on FD trehalose tablets showed that the elastic recovery decreased with increasing compaction pressure (from 6 % at 12.5 MPa to 2 % at 150 MPa) and that these values were dependent on the speed of the compression cycle. Then no changes were observed between 150 and 250 MPa. This behavior was different from the one observed for the other products studied. MCC also presented an initial decrease of the elastic recovery, but the values are much higher than those of FD trehalose. It should be pointed out that crystalline trehalose presented a very low elastic recovery around 2 % which is similar to the one obtained for FD trehalose at high pressures (above 150 MPa). These results may be also linked with the differences observed on the in-die versus out-of die compressibility curves.

3.3.6. Viscoelasticity

Viscoelasticity, is one of the components of the strain rate sensitivity. It is also well-known that amorphous products are usually more prone to present viscoelasticity (Alcoutabi & Martinez-vega, 1999; Deshmukh et al., 2020). This property was studied by measuring the damping ratio based on impulse excitation technique (Meynard et al., 2021). Results are shown in Fig. 10. Whereas crystalline trehalose presented low viscoelasticity like Lac and aCP, FD trehalose gave rise to a viscoelastic behavior with a damping ratio similar to the one of MCC. This increase in the viscoelastic behavior after freeze-drying can be attributed to the amorphization and might also partially explain the influence of compaction speed on the compressibility and the elastic recovery of FD trehalose.

4. Conclusion

This study demonstrated that FD trehalose powder is characterized by a specific and interesting compaction behavior which is different from the other classical excipients. FD trehalose compressibility and tabletability results have shown a behavior that seems to be similar to the one of MCC. The large value of the SRS and the presence of a significant viscoelastic behavior seems to point toward the same direction. Nevertheless, contrary to MCC tablet which behave like a ductile material during breaking tests, the tablets obtained for FD trehalose were very brittle which can be seen from the failure profile obtained during diametral compression but also by considering the BFI value which was very high even compared with results found in the literature.

Another point that differentiate strongly FD trehalose from MCC was the elastic recovery obtained after compression. The elastic recovery of FD trehalose tablets decreased with the pressure and reached values around 2 % which are very low. It is also interesting to note that the amorphous structure of FD trehalose was not affected by the compaction process.

Interestingly, FD trehalose exhibited also a compaction behavior very different from its crystalline form.

This behavior is likely to be linked with the amorphous state of the FD trehalose but also to the microstructure obtained. Nevertheless, further is needed to understand this link.

Finally, this study is to our knowledge, the first one presenting a complete evaluation of the compaction behavior of FD trehalose and demonstrating that it is possible to tablet FD trehalose powder at low compaction pressures which can be of great interest for biopharmaceutical applications since this will limit the mechanical stress undergone by the molecules.

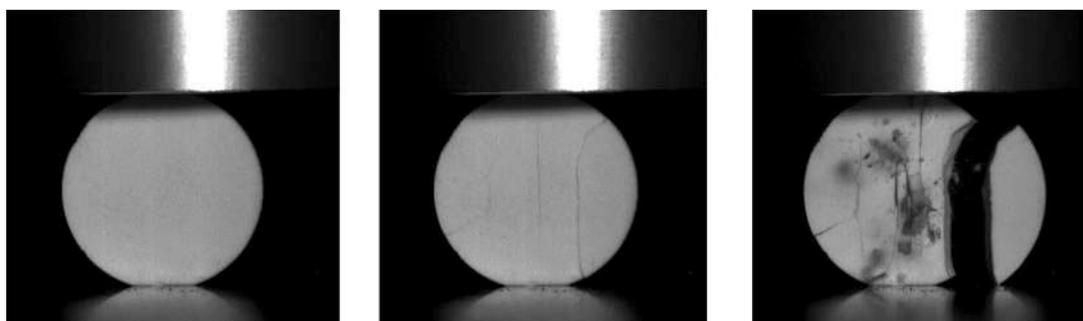


Fig. 8. Different failure patterns observed on freeze-dried trehalose tablets (50 MPa) during the diametral compression test showing the high propensity to brittle fracture.

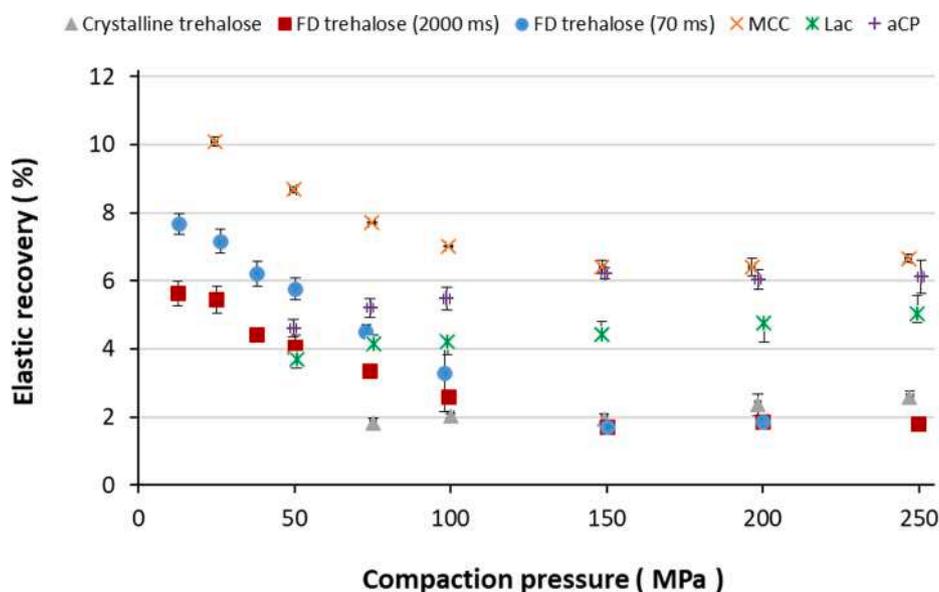


Fig. 9. Evolution of the elastic recovery as a function of axial compaction pressure (for each compaction pressure, mean \pm SD, n = 3). For FD (freeze-dried) trehalose, 2000 ms and 70 ms refer to tableting cycle time, MCC refers to microcrystalline cellulose, Lac refers to lactose monohydrate and aCP refers to anhydrous calcium phosphate.

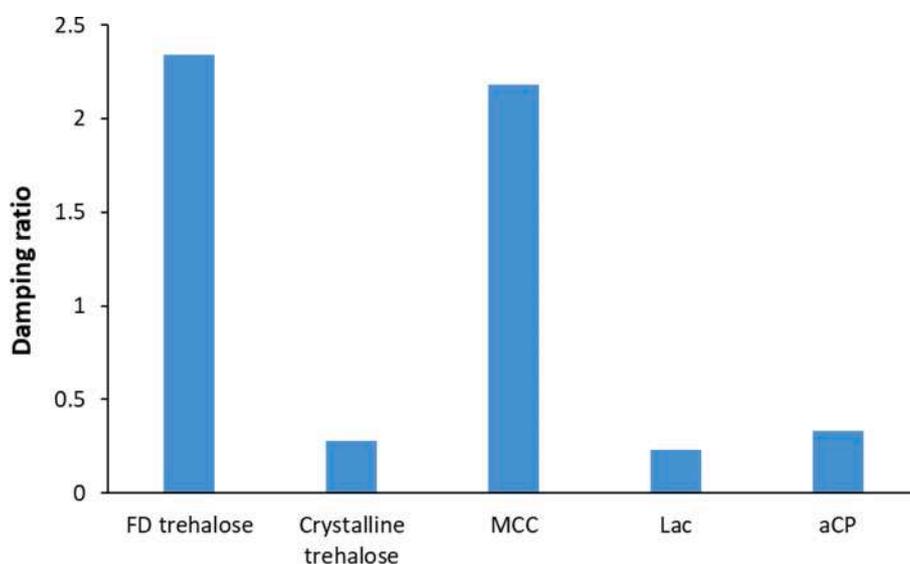


Fig. 10. Damping ratio determined on trehalose and other tested excipients at 150 MPa compaction pressure. FD trehalose refers to freeze-dried trehalose, MCC refers to microcrystalline cellulose, Lac refers to lactose monohydrate and aCP refers to anhydrous calcium phosphate.

CRedit authorship contribution statement

Hassana Hsein: Conceptualization, Investigation, Methodology, Project administration, Visualization, Supervision, Validation, Writing – original draft. **Charbel Madi:** Investigation, Validation. **Vincent Mazel:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Project administration, Visualization, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Pierre Tchoreloff:** Validation, Supervision, Writing – review & editing. **Virginie Busignies:** Investigation, Validation, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

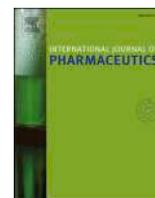
Data availability

The data that has been used is confidential.

References

- Alcoutlabi, M., Martinez-vega, J.J., 1999. A modified fractional model to describe the viscoelastic behavior of solid amorphous polymers: The effect of physical aging. *J. Macromol. Sci. Part B* 38, 991–1007. <https://doi.org/10.1080/00222349908248154>.
- Awotwe Otoo, D., Agarabi, C., Khan, M.A., 2014. An integrated process analytical technology (PAT) approach to monitoring the effect of supercooling on lyophilization product and process parameters of model monoclonal antibody formulations. *J. Pharm. Sci.* 103, 2042–2052. <https://doi.org/10.1002/jps.24005>.
- Bjelosevic, M., Zvonar Pobirk, A., Planinsek, O., Ahlin Grabnar, P., 2020. Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation. *Int. J. Pharm.* 576, 119029 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119029>.
- Bookwala, M., DeBoyace, K., Buckner, I.S., Wildfong, P.L.D., 2020. Predicting density of amorphous solid materials using molecular dynamics simulation. *AAPS PharmSciTech* 21, 96. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-1632-4>.
- Bourduche, F., Sanchez-Ballester, N.M., Bataille, B., Lefevre, P., Sharkawi, T., 2020. Structure-property relationship of amorphous maltitol as tableting excipient. *AAPS PharmSciTech* 21, 281. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01824-8>.
- Butreddy, A., Janga, K.Y., Ajjarapu, S., Sarabu, S., Dudhipala, N., 2021. Instability of therapeutic proteins - An overview of stresses, stabilization mechanisms and analytical techniques involved in lyophilized proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 167, 309–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.188>.
- Choonara, B.F., Choonara, Y.E., Kumar, P., Bijjukumar, D., du Toit, L.C., Pillay, V., 2014. A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules. *Biotechnol. Adv.* 32, 1269–1282. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.006>.
- Croquelois, B., Girardot, J., Kopp, J.B., Cazautets, C., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2017. Breaking pharmaceutical tablets with a hole: Reevaluation of the stress concentration factor and influence of the hole size. *Powder Technol.* 317, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.04.033>.
- Croquelois, B., Girardot, J., Kopp, J.B., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2020. Quantification of tablet sensitivity to a stress concentration: Generalization of Hiestand's approach and link with the microstructure. *Powder Technol.* 369, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.05.002>.
- Crowe, L.M., Reid, D.S., Crowe, J.H., 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 71, 2087–2093. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79407-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79407-9).
- Desbois, L., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2022. Use of jump-tests for the characterization of the viscoplastic behavior of pharmaceutical powders during compaction. *Powder Technol.* 404, 117406 <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2022.117406>.
- Deshmukh, K., Kovarik, T., Muzaffar, A., Basheer Ahmed, M., Khadheer Pasha, S.K., 2020. Chapter 4 - Mechanical analysis of polymers, in: AlMaadeed, M.A.A., Ponnamma, D., Carignano, M.A. (Eds.), *Polymer Science and Innovative Applications*. Elsevier, pp. 117–152. [10.1016/B978-0-12-816808-0.00004-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816808-0.00004-4).
- Duddu, S.P., Zhang, G., Dal Monte, P.R., 1997. The relationship between protein aggregation and molecular mobility below the glass transition temperature of lyophilized formulations containing a monoclonal antibody. *Pharm. Res.* 14, 596–600. <https://doi.org/10.1023/a:1012196826905>.
- Eriksson, H.J.C., Hinrichs, W.L.J., van Veen, B., Somsen, G.W., de Jong, G.J., Frijlink, H. W., 2002. Investigations into the stabilisation of drugs by sugar glasses: I. Tablets prepared from stabilised alkaline phosphatase. *Int. J. Pharm.* 249, 59–70. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00531-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00531-8).
- Gong, X., Sun, C.C., 2015. A new tablet brittleness index. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93, 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.04.007>.
- Haddadzadegan, S., Dorkoosh, F., Bernkop-Schnürch, A., 2022. Oral delivery of therapeutic peptides and proteins: Technology landscape of lipid-based nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 182, 114097 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114097>.
- Hancock, B.C., Carlson, G.T., Ladipo, D.D., Langdon, B.A., Mullarney, M.P., 2002. Comparison of the mechanical properties of the crystalline and amorphous forms of a drug substance. *Int. J. Pharm.* 241, 73–85. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00133-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00133-3).
- Heckel, R.W., 1961. Density-pressure relationship in powder compaction. *Trans. Met. Soc. AIME* 221, 671–675.
- Hersey, J.A., Rees, J.E., 1970. The effect of particle size on the consolidation of powders during compaction. *Particle Size Analysis* 33–41.
- Hiestand, E.N., Wells, J.E., Peot, C.B., Ochs, J.F., 1977. Physical processes of tableting. *J. Pharm. Sci.* 66, 510–519.
- Homayun, B., Lin, X., Choi, H.-J., 2019. Challenges and recent progress in oral drug delivery systems for biopharmaceuticals. *Pharmaceutics* 11, 129. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030129>.
- Horn, J., Schanda, J., Friess, W., 2018. Impact of fast and conservative freeze-drying on product quality of protein-mannitol-sucrose-glycerol lyophilizates. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 127, 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.03.003>.
- Hsein, H., Auffray, J., Noel, T., Tchoreloff, P., 2022. Recent advances and persistent challenges in the design of freeze-drying process for monoclonal antibodies. *Pharm. Dev. Technol.* 1–43. <https://doi.org/10.1080/10837450.2022.2131818>.
- Ilić, I., Govedarica, B., Šibanc, R., Dreu, R., Srčić, S., 2013. Deformation properties of pharmaceutical excipients determined using an in-die and out-die method. *Int. J. Pharm.* 446, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.001>.
- Jaworski, J.P., 2021. Neutralizing monoclonal antibodies for COVID-19 treatment and prevention. *Biomed J* 44, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.11.011>.
- Kesik-Brodacka, M., 2018. Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 65, 306–322. <https://doi.org/10.1002/bab.1617>.
- Liu, J., 2006. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development. *Pharm. Dev. Technol.* 11, 3–28. <https://doi.org/10.1080/10837450500463729>.
- Liu, B., Zhou, X., 2021. Freeze-Drying of Proteins. In: Wolkers, W.F., Oldenhof, H. (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer, US, New York, NY, pp. 683–702. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_37.
- Madani, F., Hsein, H., Busignies, V., Tchoreloff, P., 2020. An overview on dosage forms and formulation strategies for vaccines and antibodies oral delivery. *Pharm. Dev. Technol.* 25, 133–148. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1689402>.
- Mazel, V., Guerard, S., Croquelois, B., Kopp, J.B., Girardot, J., Diarra, H., Busignies, V., Tchoreloff, P., 2016. Reevaluation of the diametral compression test for tablets using the flattened disc geometry. *Int. J. Pharm.* 513, 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.088>.
- Mazel, V., Tchoreloff, P., 2022. Lamination of Pharmaceutical Tablets: Classification and Influence of Process Parameters. *J. Pharm. Sci.* 111, 1480–1485. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.10.025>.
- Mazel, V., Tchoreloff, P., 2023. Indices for the brittleness of pharmaceutical tablets: A reassessment. *Int. J. Pharm.* 645, 123364 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123364>.
- Mccormick, D., 2005. Evolutions in direct compression. *Pharm. Technol.* (2003) 29, 52–62.
- Meynard, J., Amado-Becker, F., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2021. Use of impulse excitation technique for the characterization of the elastic anisotropy of pharmaceutical tablets. *Int. J. Pharm.* 605, 120797 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120797>.
- Meynard, J., Amado-Becker, F., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2022. On the complexity of predicting tablet capping. *Int. J. Pharm.* 623, 121949 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121949>.
- Nakamura, H., Sugino, Y., Watano, S., 2012. In-Die Evaluation of Capping Tendency of Pharmaceutical Tablets Using Force-Displacement Curve and Stress Relaxation Parameter. *Chem. Pharm. Bull.* 60, 772–777. <https://doi.org/10.1248/cpb.60.772>.
- Ohtake, S., Wang, Y.J., 2011. Trehalose: Current Use and Future Applications. *J. Pharm. Sci.* 100, 2020–2053. <https://doi.org/10.1002/jps.22458>.
- Okor, R.S., Eichie, F.E., Ngwa, C.N., 1998. Correlation Between Tablet Mechanical Strength and Brittle Fracture Tendency. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 4, 511–513. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb00665.x>.
- Olunisola, E.O., Udoh, I.E., Ekott, M.B., Alozie, M.F., Davies, K.G., 2023. Biopharmaceutics and clinical outcomes of emerging dosage forms of insulin: A systematic review. *Diabetes Epidemiology and Management* 9, 100120. <https://doi.org/10.1016/j.deman.2022.100120>.
- Olsson, C., Jansson, H., Swenson, J., 2016. The role of trehalose for the stabilization of proteins. *J. Phys. Chem. B* 120, 4723–4731. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b02517>.
- Parker, A., Rigby-Singleton, S., Perkins, M., Bates, D., Le Roux, D., Roberts, C.J., Madden-Smith, C., Lewis, L., Teagarden, D.L., Johnson, R.E., Ahmed, S.S., 2010. Determination of the influence of primary drying rates on the microscale structural attributes and physicochemical properties of protein containing lyophilized products. *J. Pharm. Sci.* 99, 4616–4629. <https://doi.org/10.1002/jps.22185>.
- Pitt, K.G., Hoesley, M.G., 2013. Determination of the tensile strength of elongated tablets. *Powder Technology, Special Issue: 5th International Granulation Workshop Granulation across the length scale 2011*, 238, pp. 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2011.12.060>.
- Procopio, A.T., Zavaliangos, A., Cunningham, J.C., 2003. Analysis of the diametral compression test and the applicability to plastically deforming materials. *J. Mater. Sci.* 38, 3629–3639. <https://doi.org/10.1023/A:1025681432260>.

- Roberts, R.J., Rowe, R.C., 1985. The effect of punch velocity on the compaction of a variety of materials. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1985.tb03019.x>.
- Schneid, S.C., Gieseler, H., Kessler, W.J., Luthra, S.A., Pikal, M.J., 2011. Optimization of the secondary drying step in freeze drying using TDLAS technology. *AAPS PharmSciTech* 12, 379–387. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9600-7>.
- Searles, J.A., Carpenter, J.F., Randolph, T.W., 2001. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *J. Pharm. Sci.* 90, 860–871. <https://doi.org/10.1002/jps.1039>.
- Sharma, A., Khamar, D., Cullen, S., Hayden, A., Hughes, H., 2021. Innovative Drying Technologies for Biopharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 609, 121115 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121115>.
- Stange, U., Scherf-Clavel, M., Gieseler, H., 2013. Application of gas pycnometry for the density measurement of freeze-dried products. *J. Pharm. Sci.* 102, 4087–4099. <https://doi.org/10.1002/jps.23723>.
- Sundaramurthi, P., Suryanarayanan, R., 2010. Trehalose Crystallization During Freeze-Drying: Implications On Lyoprotection. *J. Phys. Chem. Lett.* 1, 510–514. <https://doi.org/10.1021/jz900338m>.
- Tang, X., Pikal, M.J., 2004. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm. Res.* 21, 191–200. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000016234.73023.75>.
- Vass, P., Démuth, B., Hirsch, E., Nagy, B., Andersen, S.K., Vigh, T., Verreck, G., Csontos, I., Nagy, Z.K., Marosi, G., 2019. Drying technology strategies for colon-targeted oral delivery of biopharmaceuticals. *J. Control. Release* 296, 162–178. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.023>.
- Wang, W., 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 203, 1–60. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00423-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00423-3).
- Wünsch, I., Michel, S., Finke, J.H., John, E., Juhnke, M., Kwade, A., 2021. How can single particle compression and nanoindentation contribute to the understanding of pharmaceutical powder compression? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 165, 203–218. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.009>.
- Yohannes, B., Abebe, A., 2021. Determination of tensile strength of shaped tablets. *Powder Technol.* 383, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.01.014>.
- Zhong, H., Chan, G., Hu, Y., Hu, H., Ouyang, D., 2018. A Comprehensive map of FDA-approved pharmaceutical products. *Pharmaceutics* 10, E263. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040263>.



Tableting behavior of freeze and spray-dried excipients in pharmaceutical formulations

Charbel Madi^{a,b}, Hassana Hsein^{a,b,*}, Virginie Busignies^{a,b}, Pierre Tchoreloff^{a,b}, Vincent Mazel^{a,b}

^a Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, I2M, UMR 5295, F-33400, Talence, France

^b Arts et Metiers Institute of Technology, CNRS, Bordeaux INP, Hesam Université, I2M, UMR 5295, F-33400 Talence, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Freeze-drying
Spray-drying
Trehalose
Lactose
Mannitol
Mechanical properties

ABSTRACT

Most of biopharmaceuticals, in their liquid form, are prone to instabilities during storage. In order to improve their stability, lyophilization is the most commonly used drying technique in the pharmaceutical industry. In addition, certain applications of biopharmaceutical products can be considered by oral administration and tablets are the most frequent solid pharmaceutical dosage form used for oral route. Thus, the tableting properties of freeze-dried products used as cryo and lyoprotectant could be a key element for future pharmaceutical developments and applications. In this study, we investigated the properties that might play a particular role in the specific compaction behavior of freeze-dried excipients. The tableting properties of freeze-dried trehalose, lactose and mannitol were investigated and compared to other forms of these excipients (spray-dried, commercial crystalline and commercial crystalline milled powders). The obtained results showed a specific behavior in terms of compressibility, tableting and brittleness for the amorphous powders obtained after freeze-drying. The comparison with the other powders showed that this specific tableting behavior is linked to both the specific texture and the physical state (amorphization) of these freeze-dried powders.

1. Introduction

The pharmaceutical industry is witnessing a growing interest in developing tablets containing biopharmaceutical molecules, including monoclonal antibodies, proteins, and RNA. Since the discovery of insulin in 1921 (Vecchio et al., 2018), therapeutic peptides and proteins have become a major focus of research, leading to significant therapeutic innovations (Haddadzadegan et al., 2022). Traditionally administered through parenteral routes, biomolecules face stability challenges in liquid form, often requiring low-temperature storage. Alternative administration routes like oral or buccal are gaining attention due to advantages such as better patient compliance and improved drug delivery. Tablets, the most common oral dosage form, are preferred despite biomolecules being initially in liquid form. Various drying techniques, such as freeze-drying, are explored to obtain solid forms for tablet production.

In order to stabilize the biomolecules during the drying processes, formulations should contain cryo and lyoprotectants like sucrose and trehalose (non-reducing sugars) or lactose (a reducing sugar);

surfactants like polysorbate 20 and polysorbate 80; bulking agents like mannitol (a polyol) or glycine (an amino acid) and buffer salts to adjust the pH and the tonicity (Bjelošević et al., 2020). Currently, tableting properties of such freeze-dried (FD) excipients have not been extensively described in the literature. Since development of oral route for biopharmaceutics could be the goal of many studies, it is important to investigate the behavior of these products, during and after compaction.

The mechanical properties of a powder can be changed depending on many factors. For example, Persson et al. have demonstrated that the compaction end point parameters, the compactibility and tableting rate parameters increased with the decrease in particle size of α -lactose monohydrate (Persson et al., 2022). Tomar et al. have found that moisture content may affect the physical and chemical properties of the product during compaction, and their results showed that in order to obtain satisfactory hardness for tablets, temperature and humidity must be maintained in a specific limit (Tomar et al., 2017). Since FD excipients have a particular particle size and shape, a specific residual moisture and could be amorphous or crystalline, it is important to consider those aspects in a study on their tableting and mechanical properties.

* Corresponding author.

E-mail address: hassana.hsein@u-bordeaux.fr (H. Hsein).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124059>

Received 19 November 2023; Received in revised form 26 March 2024; Accepted 26 March 2024

Available online 28 March 2024

0378-5173/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

Hsein et al. investigated the physico-chemical and mechanical tableting properties of freeze-dried trehalose and showed that the latter presents very specific properties in terms of compressibility and tableting ability in comparison with crystalline trehalose (Hsein et al., 2023). Compressibility profiles highlighted that FD trehalose is less compressible than crystalline trehalose at low pressures, and more compressible when pressure increases. On tableting profiles of FD trehalose, it was observed that tablets with high tensile strength (1.5 MPa) could be obtained under very low pressures (25 MPa). The authors also demonstrated that FD trehalose has a high propensity to brittle fracture and that its brittleness was among the highest when compared to classical pharmaceutical excipients found in the literature (Hiestand et al., 1977; Hsein et al., 2023; Meynard et al., 2022). Therefore, our study aims to identify the critical factors influencing these behaviors. Following the changes observed in physical structure and texture of FD trehalose compared to native crystalline trehalose powder, we conducted experiments with other FD and crystalline excipients, including lactose (amorphous after freeze-drying) and mannitol (crystalline even after freeze-drying). By comparing these excipients, we sought to understand the impact of physical structure on the tableting properties of FD powders. Additionally, spray-drying was performed on all three excipients to create amorphous trehalose and lactose, as well as crystalline mannitol, with distinct spherical particle textures. These differences in texture aimed to elucidate the effect of powder texture on tableting properties while keeping the physical structure constant. Lastly, we ground the crystalline powders to assess the influence of texture on tableting properties.

2. Material and methods

Three excipients were used for freeze-drying, spray-drying, milling and for direct compression. Trehalose dihydrate (Biohale) and lactose (Supertab 30 Gr) were obtained from DFE Pharma (Goch, Germany), mannitol from Cooper (Melun, France) and magnesium stearate (Ligamed MF-2-V) from Peter Greven (Bad Münstereifel, Nordrhein-Westfalen, Germany).

2.1. Powder manufacturing processes

2.1.1. Freeze-drying

Freeze-dried samples were produced using a cryotec® pilot freeze-dryer (Montpellier, France). 6 mL of aqueous solutions of trehalose dihydrate, lactose or mannitol (5 % w/v in water) were put in a 20 mL vial and transferred in the freeze-dryer. The volume of the solution corresponds to a height of 15 mm. For each of the excipients, a total of 90 vials were freeze-dried at once. Thermocouples were used during freeze-drying cycles to monitor the shelves and product temperatures and all cycles (Fig. A1 supplementary data) were carried out as follow:

Freezing step: the samples were frozen by a cooling ramp of $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, from 25°C to -50°C . The final temperature of -50°C was held for 1 h 30 min to make sure that all the samples were frozen.

Primary drying: at the end of the freezing step, the shelves temperature was risen to 25°C at a rate of $+1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and the chamber pressure was decreased to 0.1 mbar. This temperature setpoint was held until the pressure values of capacitance and pirani manometers gauges came together. Then, the primary drying time was dependent on the number of vials placed in the chamber. The primary drying time for all three excipients and the total cycle time were respectively always around 21 h and 28 h.

Secondary drying: At the end of the primary drying step, a temperature of 25°C and a chamber pressure of 0.1 mbar were maintained for 3 to 4 h. Afterwards samples were sealed under vacuum, and then stored at ambient temperature. For all three excipients, cakes had the same global aspect: a height of 1.5 cm with no sign of collapse (Fig. A2 supplementary data).

2.1.2. Spray-drying

Aqueous solutions of trehalose dihydrate, lactose or mannitol (10 % w/v) were spray-dried (SD) on a Büchi laboratory spray dryer (Büchi Mini Spray Dryer B-191, Buchegg, Switzerland). The liquid feed rate was 8.2 mL/min, the atomizing-air flow was $0.7\text{ m}^3/\text{h}$ and the aspiration vacuum was around 40 mbar. T_{inlet} was set on 110°C based on the work of Adler and Lee (Adler and Lee, 1999), where trehalose was spray-dried in the presence of lactate dehydrogenase using different process conditions (T_{inlet} of 110°C was found to be the optimal process condition to preserve enzymatic activity). During the spray-drying, T_{outlet} could not be controlled but it could be measured. For a T_{inlet} of 110°C , T_{outlet} was around 60°C for all the three excipients used. The yield obtained using this process was dependent on the excipient used (powder present on the wall surface of the cyclone was not considered as part of the yield), and will be presented in the results section.

2.1.3. Milling

Crystalline trehalose, lactose and mannitol were ground using a vibration mill (Restsch vibration mill MM 2000, Düsseldorf, Germany), in dry conditions. 6 g of crystalline powder were introduced with one grinding steel ball (20 mm \varnothing) in the steel grinding jar (nominal volume of 25 mL) and ground for 8 min at a vibrational frequency of 26.6 Hz (1600 RPM).

2.1.4. Tablet manufacturing

All tablets were manufactured on a compaction simulator Styl'One Evolution (Medelpharm, Beynost, France) which is a single station press equipped with displacement and force sensors associated with the upper and lower punches (accuracy 10 N).

For each of the three excipients, FD, SD, commercial crystalline powder (CCP) and commercial crystalline milled powder (CCMP) were compressed. SD powders, CCP and CCMP were directly compressed without prior preparation. FD cakes were gently ground using a mortar and a pestle to obtain a powder (each FD vial was intended to form one tablet and contained approximately 250 mg of powder) prior to compression, in a room where relative humidity was maintained between 30 and 40 %.

The compactions were done in a room where the temperatures were between 23°C and 25°C with a relative humidity between 30 % and 40 %. 250 mg of powder was weighted and then set manually in the die, as fast as possible to limit water uptake. The default cycle of the machine was used at the lowest speed possible (which corresponds to a cycle time around 2 s). Furthermore, an external lubrication system using magnesium stearate was used to lubricate the punches and the die.

Two types of euro B punches were used in this work. Except for the determination of brittle fracture index, flat-faced round punches with a 10 mm diameter were used. As developed previously in (Mazel et al., 2016), brittle fracture index was obtained from flattened disc geometry tablets (punches with a flattened geometry, Fig. A3 in supplementary data). The range of compaction pressure used for all experiments was from 12.5 MPa to 250 MPa. Depending on the tensile strength obtained with the different products, the lowest compaction pressure chosen was the one giving a tablet with a sufficient cohesion to be handled.

2.2. Physico-chemical characterization of the powders

2.2.1. Karl fisher titration

The residual water content of FD and SD samples was measured by the Karl Fisher titration method using a titrator compact 20S (Mettler Toledo; Greifensee, Switzerland). Anhydrous methanol (extra dry methanol, 99 %, Acroseal®) was used to dissolve the samples. Before titration, a blank measurement on methanol was done. FD cakes were directly dispersed in 6 mL methanol in their original vials. 1 mL of the mixture was added into the reaction vessel, and the water content of the samples was obtained at the end of the titration after subtracting the blank's water content. Since all the SD powder was collected in the same

vial, samples were weighted (10–20 mg), and directly added to the reaction vessel, without dispersing in methanol. Water content was also obtained at the end of the titration. Each experiment was carried out in triplicate and water content was expressed in % w/w.

2.2.2. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC measurements were performed on all powders (FD, SD, CCP and CCMP) using a DSC3 instrument (Mettler Toledo, Switzerland) equipped with a refrigerated cooling system (RCS). About 10 mg of powders were weighted and sealed in a 100 μ L aluminum pan in a hermetically sealed glove box (relative humidity = 7 %, temperature = 25 $^{\circ}$ C) and were heated from 10 $^{\circ}$ C to 230 $^{\circ}$ C at a heating rate of 10 $^{\circ}$ C/min. During all of the experiments, an empty aluminum pan similar to those containing the sample was used as a reference.

2.2.3. X-ray diffraction (XRD)

Diffraction patterns of all samples were assessed using a benchtop powder X-ray diffractometer (MiniFlex2, Rigaku, Japan) with Cu K α radiation (30 kV, 15 mA). Each scan was performed in the 2θ range from 0 to 60 $^{\circ}$ with a step size of 0.1 $^{\circ}$ and a scan speed of 5 $^{\circ}$ /min.

2.2.4. Scanning electron microscopy (SEM)

The morphology of all powders (FD powders, SD powders, CCP and CCMP) and tablets were studied by SEM using a tabletop microscope (Hitachi TM3000, Japan). A sharp blade was used to cut thin slices of the FD samples. The cut FD samples, intact tablets, tablets broken diametrically and all other powders (SD, CCP et CCMP) were then fixed to aluminum stubs with double-sided carbon tapes in order to visualize their morphology.

2.2.5. Particle sizing

The size distributions of SD powders, CCP and CCMP were measured using a laser diffraction particle size analyzer (Mastersizer 3000, Malvern Panalytical, United Kingdom). Air injection pressures were adjusted from 2 to 3 bar depending on the analyzed powder.

2.2.6. Density measurements

Pycnometric density (ρ_{pycno}) of all powders was measured using a helium pycnometer (AccuPyc II 1340, Micromeritics, Norcross, GA, USA) in triplicates, with a 1 cm^3 cell using ten purges followed by ten measurements. Cycle and purge fill pressures were both set at 19.5 psig and the end equilibration rate was set at 0.0050 psig/min.

2.2.7. Specific surface area (SSA) measurements

Five-point Brunauer, Emmett and Teller (BET) measurements were done using a Surface Area and Porosity Analyzer instrument (ASAP 2020, Micromeritics, Norcross, USA). Sample outgazing was performed at a temperature of 60 $^{\circ}$ C until a pressure of 10 $^{-3}$ mmHg was reached. The measurements were performed at a relative nitrogen pressure range P/P $_0$ from 0.05 to 0.2 (5 values of P/P $_0$) and at a temperature of – 196 $^{\circ}$ C. For all measurements, it was controlled that the R 2 value of the BET linear fit was higher than 0.999 and the specific surface area was calculated according to the BET equation. For FD samples, multiple cakes were combined (6–8) to achieve total area >1 m^2 for accurate measurements. For all other powders (SD powder, CCP and CCMP), a sufficient quantity was weighted for accurate analysis. All samples were rapidly prepared in a low relative humidity room (30 %). Each measurement was carried out in triplicate.

2.3. Tablet characterization

2.3.1. Porosity and elastic recovery

In-die and out-of die porosities were calculated using Eq. (1):

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{\text{apparent}}}{\rho_{\text{pycno}}} \quad (1)$$

where ρ_{apparent} is the apparent density calculated using the tablet's volume.

For in-die porosity, ρ_{apparent} was calculated using V_{min} , the minimal volume under pressure measured directly with the compaction simulator. In the case of out-of die porosity ρ_{apparent} was calculated using V_f , the final volume of the tablet, obtained from the tablet's diameter and thickness after ejection from the die. ρ_{pycno} refers to the material density measured by helium pycnometry.

Elastic recovery (% ER) could then be determined using Eq. (2):

$$\%ER = \frac{V_f - V_{\text{min}}}{V_{\text{min}}} \quad (2)$$

2.3.2. Tablets strength properties

In order to draw tabletability profiles, diametral compression tests were performed on 10 mm cylindrical tablets using a texture analyzer equipped with a force sensor (500 \pm 0.1 N) (TA.HD, Stable microsystems, Surrey, United Kingdom). Speed and acquisition frequency were respectively 0.1 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ and 500 Hz. Each kind of tablet was tested in triplicate, the breaking force F (N) was measured and was then used to calculate the tensile strength (σ) using Eq. (3) (Fell and Newton, 1970):

$$\sigma = \frac{2F}{\pi Dh} \quad (3)$$

where D and h are respectively the tablet diameter and thickness.

Tablet Brittle Fracture Index (BFI) of all the tablets produced was also determined. BFI is used to assess the sensitivity to a stress concentration of tablets and tablet brittleness (Hiestand et al., 1977; Mazel and Tchoreloff, 2023). BFI determination requires two kinds of tablets, with and without a center hole. The tests were performed by diametral compression, using 11 mm tablets with a flattened geometry (Croquelois et al., 2017). Holes of 1 mm diameter were drilled at the center of the tablets as described by Croquelois et al (Croquelois et al., 2017). For each excipient, the tests were performed in triplicate. BFI could then be calculated using Eq. (4):

$$BFI = \frac{1}{2} \left(\frac{\sigma}{\sigma_h} - 1 \right) \quad (4)$$

where σ and σ_h are the apparent tensile strengths of tablets without and with a centered hole, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Powder's physico-chemical properties

3.1.1. FD powders

Cakes visual appearance for trehalose, lactose and mannitol was elegant and no collapse nor cracks were detected even if the shelf temperature used for primary drying during the freeze-drying cycles of all three excipients was quite high (25 $^{\circ}$ C), in order to achieve fast cycles.

The residual moisture (RM) content was measured in all FD samples using Karl Fisher titration method. Trehalose and lactose contained respectively a RM of 1.00 \pm 0.02 % and 1.00 \pm 0.05 % which is coherent for future applications since a RM neighboring 1 % is required for stabilization of biopharmaceutics (Schneid et al., 2011). RM couldn't be determined for FD mannitol because of its poor solubility in methanol, but it is expected that it has a low RM after freeze-drying because of its low hygroscopicity (Vanhoorne et al., 2020). Characterization of FD trehalose, lactose and mannitol was then carried out with XRD measurements to analyze their physical structure (crystalline or amorphous) after freeze-drying. XRD results showed that after freeze-drying, trehalose and lactose were totally amorphous (Fig. 1 A and C) since no peaks were detected on the diffractogram, while mannitol remained crystalline (Fig. 1 E), and was essentially formed by the β polymorph with a minority of the α one. DSC consolidated the XRD results. FD trehalose

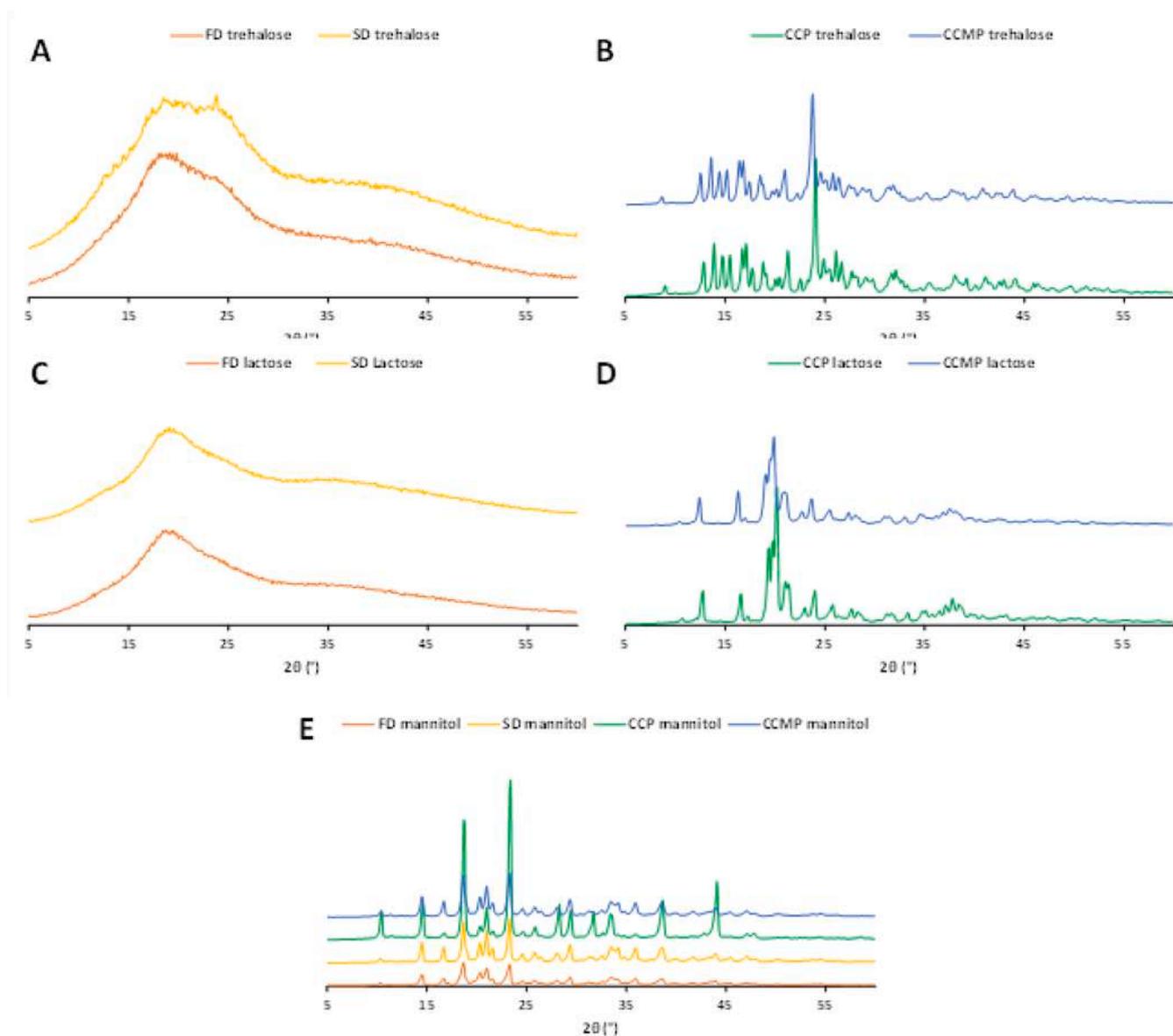


Fig. 1. XRD patterns of (A) FD and SD trehalose, (B) CCP and CCMP trehalose, (C) FD and SD lactose, (D) CCP and CCMP lactose and (E) FD, SD, CCP and CCMP mannitol.

and lactose are characterized by glass transitions, while FD mannitol does not exhibit any T_g . Experimental T_g values obtained for FD trehalose and lactose are given in Table 1. T_g of dry amorphous trehalose and lactose are given in the literature at values of 120 and 107 °C respectively (Haque and Roos, 2006; Roe and Labuza, 2005). But it is well known that T_g values decrease with the increase of the RM (Haque and Roos, 2006; Roe and Labuza, 2005). Then, the experimental T_g values obtained are consistent with the corresponding RM content as described in the literature (Haque and Roos, 2006; Roe and Labuza, 2005).

Cakes morphologies were assessed by SEM for each material to visualize their internal and external morphologies. Viewed from above, trehalose (Fig. 2A) and lactose (Fig. 2B) cakes surfaces presented similar honeycomb structures and pore sizes, while mannitol presented a different surface texture, more like a smooth surface with less pores (Fig. 2 C). Cross sections imaging showed for trehalose and lactose the same honeycomb structures constituted of very smooth leaflets (Fig. 2 D, E). In the case of mannitol, a slight difference was seen with a texture made up of rougher and more irregular leaflets (Fig. 2 F). These differences of appearance may be linked to the fact that trehalose and lactose are amorphous after freeze-drying while mannitol crystallizes.

Finally, the SSA and pycnometric densities of FD powders were measured and are presented in Table 1. Rambhalta et al. have demonstrated that the SSA could change depending on freeze-drying cycle parameters and especially depending on the nucleation temperature during freezing (Rambhatla et al., 2004). They also demonstrated that crystalline FD mannitol has a SSA much higher than amorphous FD sucrose. For the conditions chosen for our freeze-drying cycle, FD trehalose and lactose are characterized by quite similar SSA (respectively $0.950 \pm 0.060 \text{ m}^2/\text{g}$ and $1.060 \pm 0.018 \text{ m}^2/\text{g}$), while mannitol presented a higher one ($2.780 \pm 0.084 \text{ m}^2/\text{g}$) (Table 1). Those results are consistent with Rambhatal's work. The pycnometric density measurements of FD trehalose and lactose gave relatively low values in regard to the one obtained with their crystalline forms (Table 1). This is an expected result since the true density of a material decreases after amorphization, as observed in other studies (Bookwala et al., 2020; Bourduche et al., 2020). On the contrary, the pycnometric density was practically the same for FD and CCP mannitol since FD mannitol remained crystalline after freeze-drying.

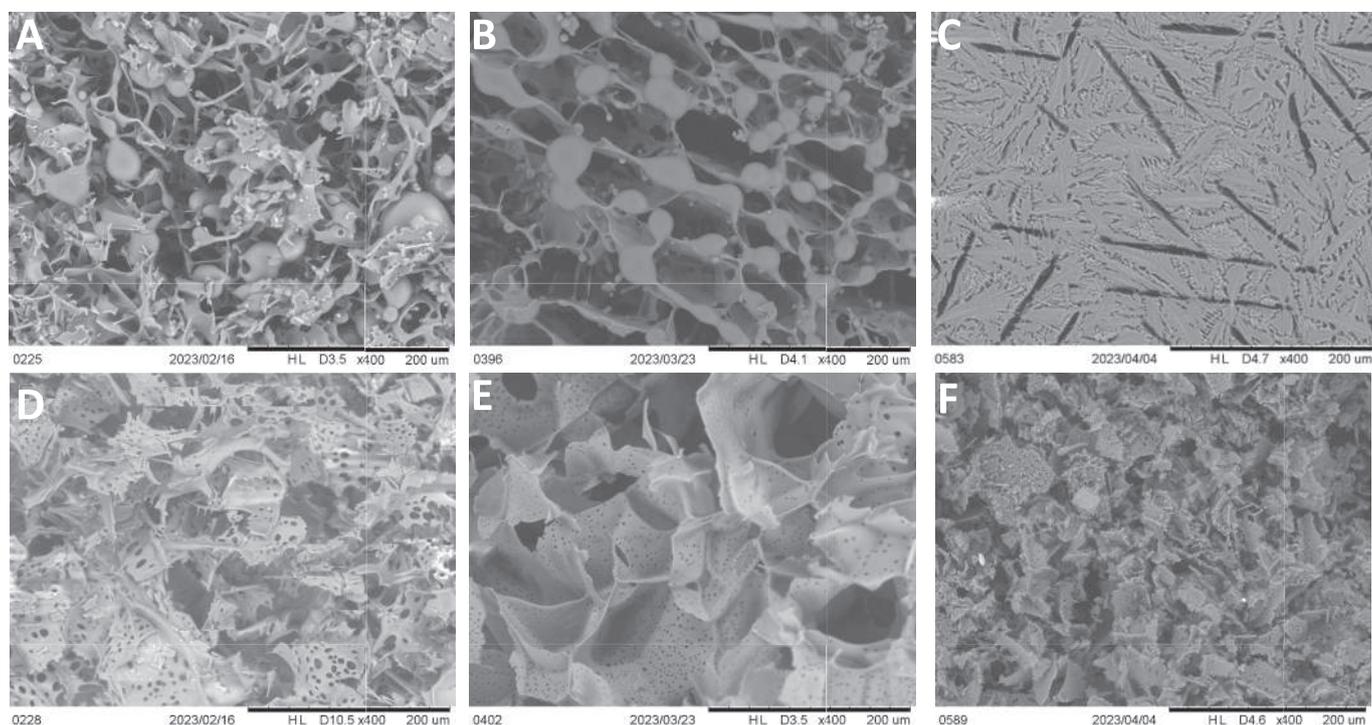


Fig. 2. SEM imaging of FD trehalose (A and D), FD lactose (B and E) and FD mannitol (C and F) (A, B and C are seen from above, D, E and F are cross sections).

3.1.2. SD powders

Exactly the same parameters were used for all three excipients during the spray-drying cycles. When T_{inlet} was set at 110 °C, T_{outlet} was always measured between 58 and 60 °C. Trehalose and lactose powders gave a yield of about 50 %, lower than mannitol which gave a yield of about 85 %.

XRD measurements showed that SD trehalose was mostly amorphous (Fig. 1 A). It could be noted the conservation of only one small peak at $2\theta = 23.8^\circ$ which corresponds to the most intense peak seen on crystalline trehalose diffractogram (Megarry et al., 2011). The diffractogram obtained with SD lactose showed that it was completely amorphous immediately after spray-drying (Fig. 1 C). Finally, results showed that mannitol was completely crystalline after spray-drying (Fig. 1 E), and that the peaks profile was corresponding to those of β -mannitol polymorph (Cares-Pacheco et al., 2014). Water titration by Karl Fisher technique showed that the SD powders presented higher RM than the FD ones. SD trehalose presented a RM of 4 ± 0.6 % and lactose of 5 ± 0.3 %. Crystalline mannitol is known to be non-hygroscopic, and because of its non-solubility in methanol, its RM wasn't measured. DSC measurements showed no T_g for SD mannitol, but showed lower T_g values for SD trehalose and lactose compared to those obtained for FD powders (results shown in Table 1). Here too, since T_g depends on the % RM, these

results are consistent with those found in the literature at the same RM content as explained in the case of FD powders (Haque and Roos, 2006; Roe and Labuza, 2005).

SD powder morphologies and size distributions were evaluated by SEM (Fig. 3) and by laser diffraction particle size analyzer (Table 1). As expected, all three SD excipients exhibit the same spherical morphology with a particle diameter ranging between 1 μm and 10 μm with a predominance of a medium size particle at around 3–6 μm as shown in Fig. 3. Particle size distribution confirmed these results. Table 1 shows that 50 % of particles have a diameter smaller than 4.2, 5.2 and 3.5 μm (D_{50}) respectively for SD trehalose, lactose and mannitol.

Pycnometric densities were obtained, and higher values were noted for SD trehalose and lactose, compared to the FD ones but lower when it comes to compare SD mannitol to the FD one (Table 1). These results could be somehow linked to the differences in the structure of the powders.

SSA results for SD powders showed the same tendency as the FD ones. Amorphous SD trehalose and lactose have also a similar SSA, respectively 1.390 ± 0.037 and 1.160 ± 0.042 m^2/g , which are much lower than SD crystalline mannitol with a SSA of 2.370 ± 0.074 m^2/g .

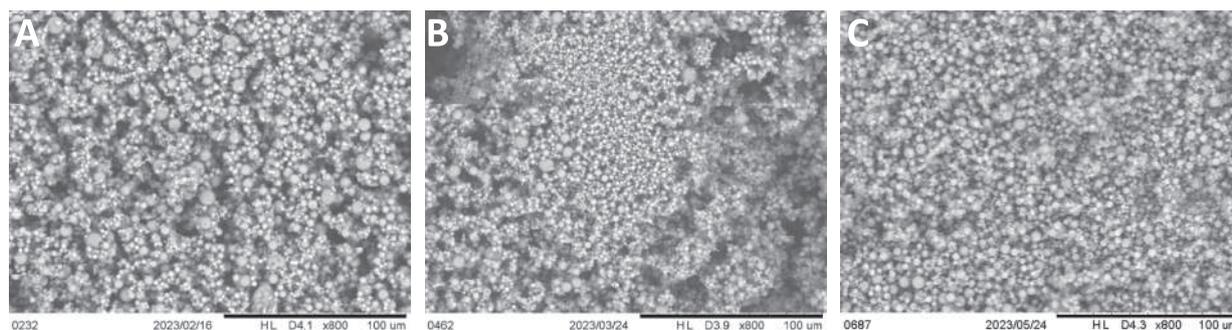


Fig. 3. SEM imaging of SD trehalose (A), SD lactose (B) and SD mannitol (C).

Table 1
Physico-chemical characterization of all three excipients used in this study.

Excipient	Experimental T_g	% RM	Pycnometric density (g/cm ³)	SSA (m ² /g)	Physical structure (XRD)	Particle size distribution $D_v(50)$ (μm)
FD trehalose	100 ± 1.5 °C	1 ± 0.02 %	1.45 ± 0.02	0.95 ± 0.060	Amorphous	–
FD lactose	96 ± 0.9 °C	1 ± 0.05 %	1.39 ± 0.008	1.06 ± 0.018	Amorphous	–
FD Mannitol	–	–	1.49 ± 0.01	2.78 ± 0.084	Crystalline	–
SD trehalose	65 ± 2.7 °C	4 ± 0.6 %	1.51 ± 0.002	1.39 ± 0.037	Amorphous	4.2
SD lactose	69 ± 0.2 °C	5 ± 0.3 %	1.51 ± 0.006	1.16 ± 0.042	Amorphous	5.2
SD Mannitol	–	–	1.43 ± 0.011	2.37 ± 0.074	Crystalline	3.5
Trehalose CCP	–	–	1.51 ± 0.004	1.64 ± 0.231	Crystalline	285
Lactose CCP	–	–	1.53 ± 0.0003	0.45 ± 0.099	Crystalline	100
Mannitol CCP	–	–	1.49 ± 0.001	0.23 ± 0.058	Crystalline	69.6
Trehalose CCMP	–	–	1.53 ± 0.0008	3.63 ± 0.287	Crystalline	6.3
Lactose CCMP	–	–	1.55 ± 0.001	3.39 ± 0.090	Crystalline	6.8
Mannitol CCMP	–	–	1.50 ± 0.0006	3.57 ± 0.280	Crystalline	5.2

3.1.3. CCP and CCMP powders

Particle size distribution (Table 1), and SEM imaging (Fig. 4) showed that as expected, milling reduced particle size and increased the SSA (Table 1). Table 1 shows that the obtained CCMP powders exhibited the highest SSA values regardless of the products.

Milling of raw powders was only done in the goal of changing their texture, without amorphization, to evaluate the impact of the texture on the tableting properties. All crystalline powders were analyzed by DSC and XRD. DSC was done to prove that milling did not amorphize the raw powders. As expected, all CCP and CCMP did not show any T_g on DSC graphs. XRD measurements were then performed to be sure that milling did not result in a change of the basic polymorphic form of CCP. The diffractograms of each of the ground and unground excipients showed that no polymorphic changes occurred upon milling (Fig. 1 B, D, E), which means that the grinding, in our experimental conditions, did not lead to any change in the physical structure of the products.

3.2. Compaction properties of the tested powders

3.2.1. Compressibility

At first, all excipients compaction behaviors were assessed by the study of their compressibility profiles. Knowing that moisture could

influence compaction behavior (Elkhider et al., 2007) and since trehalose and lactose's FD and SD powders are hygroscopic, compression was performed rapidly after vials opening in a room with a relative humidity around 35 %. CCP and CCMP powders were also compressed in the same conditions. Compressibility profiles were evaluated by drawing the evolution of in-die porosity as a function of the applied pressure (Fig. 5).

It can be noted that some of the profiles present apparent negative porosities at high pressure. Two main phenomena can explain these results. First, due to the compressibility of the solid itself, the particle density of the powder in fact increases along with the applied pressure (Wünsch et al., 2019). As generally done in the literature, this effect was not considered in the porosity calculation made in this study. At high pressure this underestimation of the particle density can lead to apparent negative porosity, as seen at high pressures for FD amorphous products (Fig. 5 A, B). Another phenomena could be related with the amorphous nature of the FD products. As amorphous products don't have a well-defined density (unlike crystalline powders), this density can change (increase) during compression, and this can also lead to an apparent negative porosity at high pressure when considering the powder pycnometric density to calculate the porosity of the tablets.

FD trehalose and lactose in-die compressibility profiles seemed to exhibit a quite similar evolution. As shown in Fig. 5 A and 5B, at low

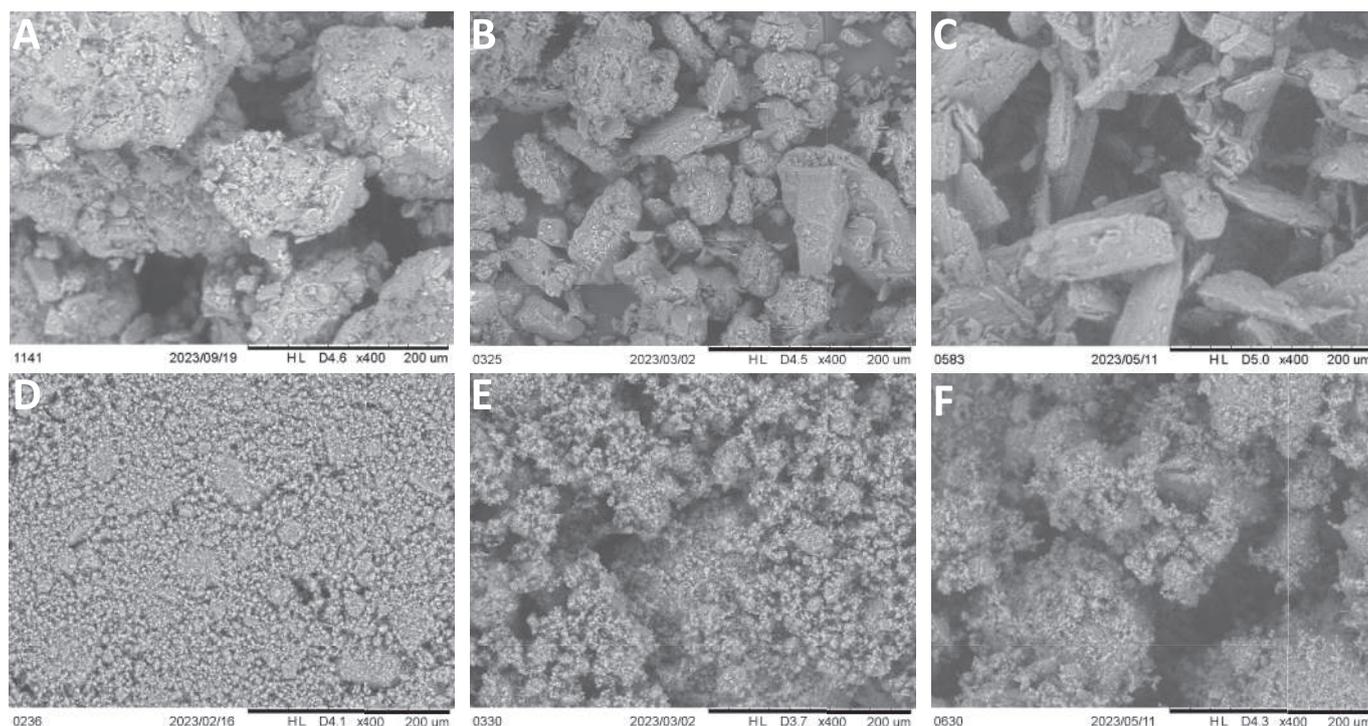


Fig. 4. SEM imaging of CCP trehalose, lactose, and mannitol (respectively A, B and C) and CCMP trehalose, lactose, and mannitol (respectively D, E and F).

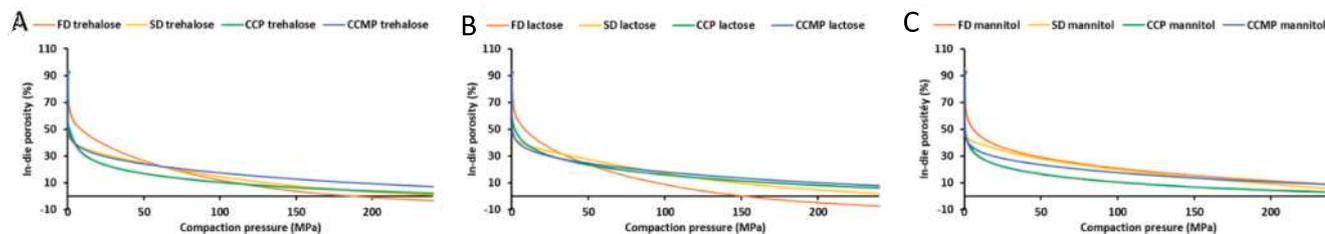


Fig. 5. In-die compressibility profiles of FD, SD, CCP and CCMP powders.

pressure (until 50–60 MPa) the in-die porosities of FD trehalose and lactose are greater than those of SD, CCP and CCMP powders. But, at pressure higher than 50 MPa, these FD powders give lower in-die porosity than others. Mannitol seemed to have a different behavior since the in-die porosity never became below than other powders and no negative porosities were observed (Fig. 5 C).

Considering the three SD compressibility profiles, the same shape was observed that clearly differs from all other powders. Fig. 5 A, B and C show that their porosity rapidly decreases at near zero pressure, until reaching approximately 40 %, then suddenly the curve deviation change. At maximum pressure, porosity of SD powders is higher than the one of FD powders for trehalose and lactose, while it is not the case for mannitol. It is known that SD powders morphology and mechanical properties are outlet temperature dependent (Littringer et al., 2013). When spray-dried at relatively low temperatures (67 °C) like in our study, spherical, rough and hollow particles are formed (Littringer et al., 2013) with entrapped gas inside. Furthermore, moisture content in SD particles is higher than freeze-dried and crystalline powders. Then, difference in texture and high percentage of RM (since water works as a plasticizer) can explain why the mechanical properties during compression are so different from the freeze-dried or crystalline powders.

When comparing CCP and CCMP compressibility profiles, it appears that CCP gives always lower in-die porosities than CCMP which is coherent with the literature (Persson et al., 2022). This is a little less marked in the case of lactose. These results could be explained by the fact that smaller particles of CCMP have more interactions one to the other and are thus more cohesive, and as such, the powder bed develops greater resistance to the compression resulting in a higher in-die porosity.

The results above show that compressibility profiles are impacted by the powders texture, but that it is also linked to their physical structures. Indeed, as expected, for all powders tested, when their texture changes, their compressibility profiles are also modified. Furthermore, the obtained results show that when FD and SD powders are amorphous, particular compressibility profiles are obtained when compared with crystalline powders even if these are obtained by different drying process.

SEM imaging of tablets helped in understanding these results. At low pressures (in a range of 12.5–75 MPa), SEM imaging of SD and FD tablet surfaces showed that the particles morphologies observed in the powders, spherical particles and randomly oriented sheets respectively, were conserved (Fig. 6 A, C, E and G) and high porosity was also observed. When the pressure was further increased, particles started to lose their shapes to form smoother surfaces with less porosity, until reaching the maximum pressure, where close to no porosity was observed (Fig. 6 B, D, F and H). The exact same feature was observed when CCP and CCMP were compressed.

Moreover, as reported in the Hsein et al. work, FD trehalose presents a specific compressibility profile different from the crystalline one (Hsein et al., 2023). In this study, it is also shown that amorphous FD lactose had the exact same behavior than FD trehalose while it is not the case for crystalline FD mannitol. These results show that the particular

behavior of FD trehalose and lactose is tightly linked to the amorphous properties of the powders. Furthermore, when excipients were FD, SD or even milled, leading to a change of their physical structure, texture or both, the compressibility profile of each excipient is altered, and this phenomenon is clearly linked to both the texture and the physical structure of the powders.

3.2.2. Elastic recovery (ER)

Elastic recovery is an important tablet property to be investigated. Fig. 7 represents the ER profiles as a function of applied pressures for all trehalose, lactose and mannitol powders. Hsein et al showed that FD trehalose has a specific ER profile different from crystalline trehalose (Hsein et al., 2023). Results for FD trehalose show that at low pressures, ER is the highest, and when pressure starts to increase, ER decreases gradually, until a pressure around 100 MPa, where it stabilizes to become pressure independent. ER profiles were different when it comes to crystalline trehalose (CCP and CCMP powders) since an increase in pressure, results in an increase in the ER before to stabilize and to become independent of pressure.

In addition, FD lactose, FD mannitol, and SD trehalose, SD lactose and SD mannitol exhibited the same behavior than FD trehalose. Nevertheless, the profile is a little less marked for FD and SD mannitol. That means that whether amorphous or crystalline, it is the specific texture of SD and FD powders that is responsible for such a behavior (Fig. 7 A, B, C).

For lactose and mannitol, CCP and CCMP exhibited similar profiles than the one described above for trehalose. One interesting point is that, after milling, all CCMP had lower ER than CCP for any given pressure. That means that for these powders, the smaller the particle size, the lower the ER.

3.2.3. Plastic energy

Plastic energy (PE) is the total energy given to the powder during the compaction cycle. It can be normalized by the volume of solid compacted to allow comparison of products with different material densities (Wünsch et al., 2021).

Hsein et al have shown that PE of FD trehalose is higher than those of crystalline trehalose (Hsein et al., 2023). Here too, the same tendency was found. FD trehalose, FD lactose and FD mannitol have all three a higher PE, at any given pressure when compared to crystalline powders (Fig. 8 A, B and C). In the case of mannitol, we observed an impact of freeze-drying on the plastic energy (texture effect), but FD and SD mannitol, which are both crystalline, have the same plastic energies. However, in the case where FD and SD powders are amorphous (trehalose and lactose), a higher plastic energy was found for the FD powders compared to the SD ones, demonstrating a significant impact of the texture of amorphous FD powders on plastic energy.

3.2.4. Tabletability

The diametral compression tests were done 24 h after compression, in triplicate to evaluate the reproducibility. The tensile strength of tablets was then calculated and the tabletability profiles were drawn for all the tested products (Fig. 9 A, B, C). It is generally considered that a

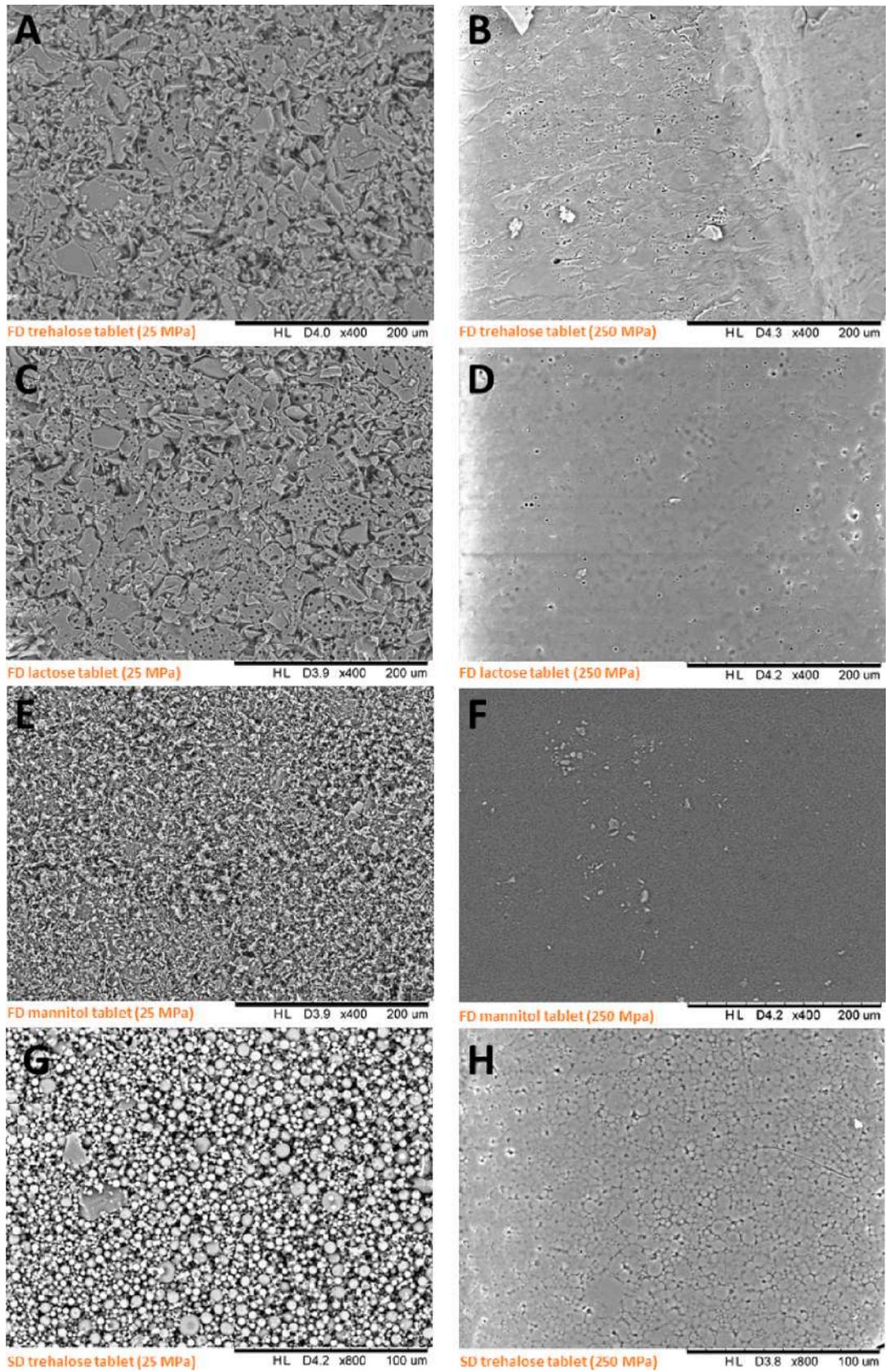


Fig. 6. SEM imaging of freeze-dried and spray dried tableted powders at different pressures.

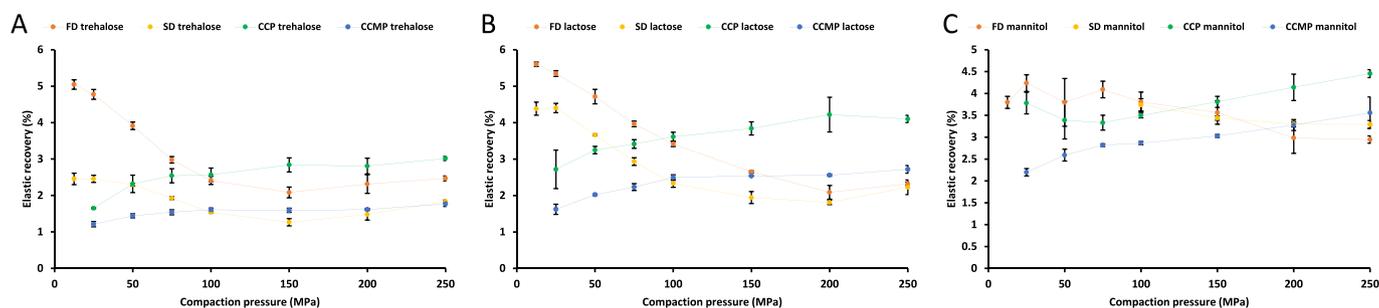


Fig. 7. Elastic recovery profiles of all trehalose powders (A), lactose powders (B) and mannitol powders (C).

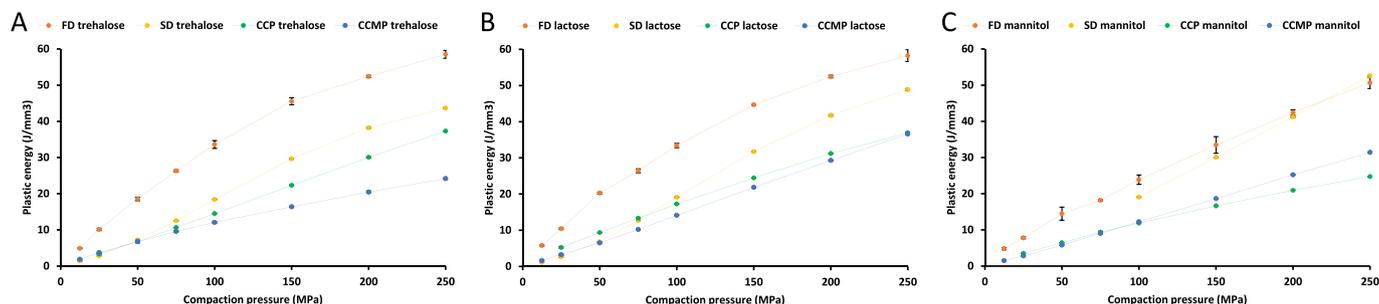


Fig. 8. Plastic energy profiles of FD, SD, CCP and CCMP powders; (A) trehalose, (B) lactose and (C) mannitol.

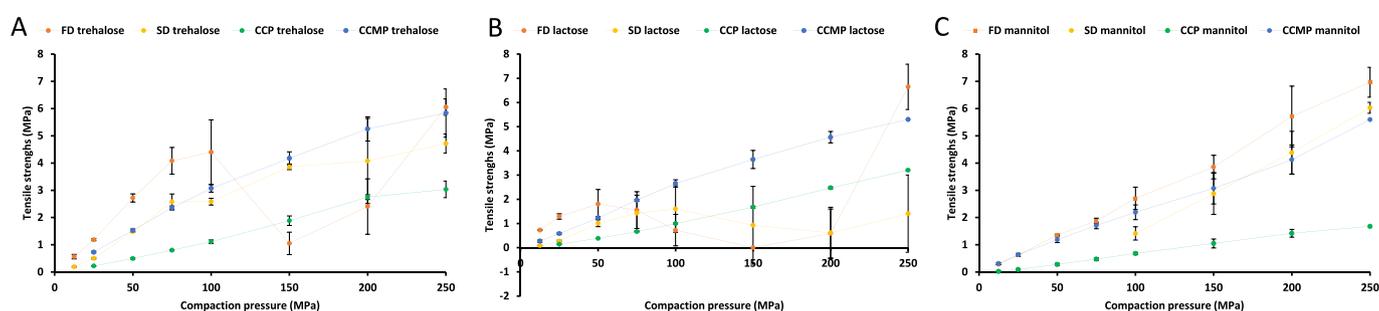


Fig. 9. Tableability profiles of FD, SD, CCP and CCMP powders (A, B and C: test done 24 h after compression, D and E: test done immediately after compression).

tensile strength higher than 2 MPa is sufficient to ensure mechanical resistance to maintain the physical integrity of tablets both during the whole production process and till the delivery to the patient (Pitt and Hoesley, 2013).

As illustrated in Fig. 9A, B, and C for all three excipients, it was consistently observed that the tensile strength and thus the tableability profile of CCMP is greater than that of CCP following the milling process. Such a result was expected regarding the differences in particles size distribution of the two kinds of products (Persson et al., 2022).

In the same manner, at low pressures for trehalose and lactose, and at all the pressure range for mannitol, SD powder's tableability profiles are similar to the CCMP (Fig. 9A, B and C). That could be linked to the fact that SD powders and CCMP have almost identical particle size.

More interestingly, at very low pressures, amorphous FD trehalose and FD lactose exhibited high tensile strength since a value of more than 2 MPa is obtained from 50 MPa for FD lactose and even about 25 MPa for FD trehalose. These values are significantly higher compared to those observed with the SD, CCP and CCMP powders of trehalose and lactose. Conversely, crystalline FD mannitol exhibited similar tensile strengths compared to SD and CCMP mannitol. These results showed one more time the effect of the amorphous FD texture compared to other forms of the same products in terms of tablet's mechanical properties.

Another interesting behavior is seen when it comes to amorphous FD and SD powders (trehalose and lactose). Fig. 9A and B show that when

pressure increases, measurements variability highly increased for FD and SD trehalose and lactose and that we obtain a drastic decrease of the tensile strength in the range 100–200 MPa. This behavior was not detected in the case of crystalline FD and SD mannitol. This variability could probably be explained by the fact that amorphous tablets develop numerous cracks immediately after compression (Fig. 10A), and during storage (Fig. 10B) when the pressure was increased. These defects make the diametrical compression test unreliable and thus variability in the tensile strength results increases. Interestingly, at higher pressures (250 MPa) it was possible to obtain tablets with high tensile strength for both FD trehalose and lactose. Explanation of this phenomenon is complicated with the present results. A more in-depth study of the mechanism of development of the cracks in the tablets would be needed to better understand this point, but this is beyond the scope of the present work.

Conversely, crystalline mannitol tablets showed no signs of cracking even for FD mannitol.

It could be then concluded from these results that while the tableability effect is likely associated with the amorphous FD powders (texture-structure), the effect on tensile strength variability when the compaction pressure is increased appears to be more related to its amorphous nature, independently from its texture. In fact, the range of compaction pressure of interest when considering amorphous FD powders (trehalose and lactose) is at remarkably low-pressure levels (25–75 MPa) and should not exceed a hundred of MPa to avoid the risk

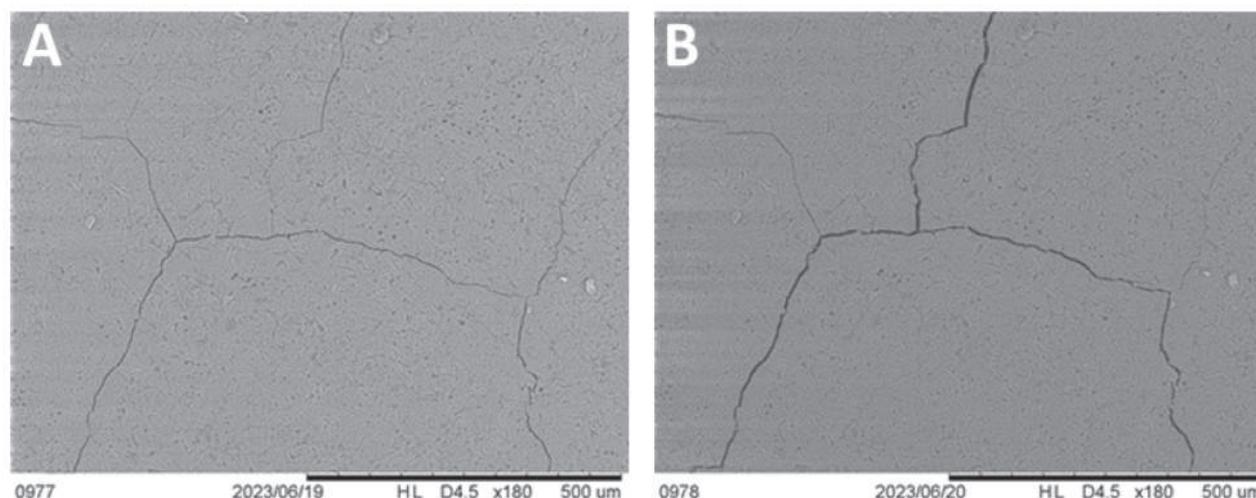


Fig. 10. SEM imaging of trehalose tablets obtained at a pressure of 150 MPa (A) after compression (B) 18 h after compression.

of occurrence of cracks.

3.2.5. Brittle fracture index (BFI)

The BFI is an indicator that makes it possible to assess the sensitivity of a tablet to a stress concentration which is linked with its brittleness (Hiestand et al., 1977; Mazel and Tchoreloff, 2023). It is well known that the BFI values are pressure dependent and are more elevated when pressure is high (Croquelois et al., 2020; Hiestand et al., 1977).

The test was done for each material and powder on tablets obtained at a pressure where they were sufficiently resistant and where the tensile strength results were mostly reproducible. All perforated tablets were visualized with the SEM, before diametral compression to be sure that no cracks were created because of the drilling. When cracks were seen during imaging, BFI tests couldn't be performed. CCMP trehalose, whether compacted at 75 MPa or 150 MPa, showed cracks after perforation, which made it impossible to perform the BFI determinations. Moreover, it wasn't possible to compress all SD powders at the same pressure in order to compare them one to the other. Then, SD powders for each excipient were compressed at the best as possible pressure in terms of reproducibility and some CCMP excipients tablets were produced at those exact same pressures in order to compare SD and CCMP powders (Table 2).

When it comes to compare the BFI values (Table 2) of SD lactose and lactose CCMP (respectively 0.48 ± 0.12 and 0.38 ± 0.02) both compressed at 50 MPa, there is no significant difference. The BFI values of SD mannitol and mannitol CCMP compressed at 150 MPa (respectively 0.95 ± 0.44 and 1.20 ± 0.21) are also in the same order of magnitude. Knowing that for both excipients the CCMP and SD powders have small sized particles, and knowing that SD lactose is amorphous while SD

mannitol is crystalline, physical structure doesn't seem to have an influence on the BFI in this case.

Hsein et al. results showed that FD trehalose has a much higher BFI than crystalline trehalose (Hsein et al., 2023). Our results are consistent with this previous work since we obtained the exact same trend with FD trehalose's BFI of 1.90 ± 0.17 at a 25 MPa compaction pressure while CCP trehalose's BFI is only 0.83 ± 0.01 at a 250 MPa compaction pressure (Table 2). The same behavior is observed when comparing FD lactose (BFI of 1.60 ± 0.49 at a pressure of 25 MPa) to lactose CCP (BFI of 0.50 ± 0.03 at a pressure of 250 MPa). Knowing that BFI values increase with higher pressures, the fact that the BFI of FD lactose tablets obtained at a 25 MPa pressure is higher than the one of CCP trehalose compressed at 250 MPa, means that FD lactose as FD trehalose are much more brittle than CCP lactose and trehalose. Whereas when comparing the BFI of crystalline FD mannitol (0.41 ± 0.18) compressed at 25 MPa to the BFI of CCP mannitol compressed at 250 MPa (0.34 ± 0.02), even if it shows that FD mannitol is more brittle than CCP mannitol, the effect is much less than in the case of trehalose and lactose.

Based on the results described above, one more time, the specific texture of amorphous FD powders seems to play an important role when it comes to tablet's brittleness.

4. Conclusion

According to all the results described above, it was shown that the texture and the physical structure, both have singular or combined impacts on the tableting properties of the studied powders.

This study showed that FD trehalose has indeed the same particular behavior in terms of tableting properties when compared to Hsein et al.'s previous results. In addition, lactose, which was also amorphous after freeze-drying behaved very similarly. It seems therefore that the particular texture of amorphous FD powder is the main reason behind those specific tableting properties and that this behavior is not limited to the chemical structure of trehalose.

Furthermore, the only property obtained that was completely independent from the texture, and that was only influenced by the physical state of the powder (amorphous or crystalline) is the high variability of tensile strength measurements at relatively high pressures. This is due to cracks developed in the tablet after compression. This is a problem that could be easily overcome when it comes to compress amorphous FD powders since these powders have a high tensile strength at very low pressures. It is thus possible to compress these powders using a very low pressure (<50 MPa) since no signs of defects are seen but the tensile

Table 2

Experimental BFI values of all three excipients.

Excipient	Compaction pressure	Calculated Brittle Fracture Index (BFI)
FD trehalose	25 MPa	1.90 ± 0.17
FD lactose	25 MPa	1.60 ± 0.49
FD mannitol	25 MPa	0.41 ± 0.18
SD trehalose	75 MPa	0.52 ± 0.17
SD lactose	50 MPa	0.48 ± 0.12
SD mannitol	150 MPa	0.95 ± 0.44
CCP trehalose	250 MPa	0.83 ± 0.01
CCP lactose	250 MPa	0.50 ± 0.03
CCP mannitol	250 MPa	0.34 ± 0.02
CCMP lactose	50 MPa	0.38 ± 0.02
CCMP mannitol	150 MPa	1.20 ± 0.21

strength is high enough and the test's reproducibility is at its best.

If this work made it possible to better understand the behavior of freeze-dried products during compaction, further is needed to understand the mechanisms that can explain, at the microscopic level, the trends demonstrated. In conclusion, these findings represent the initial phase in the journey towards industrialization. As previously stated, the ultimate objective of this research is to achieve the development of tablets made of freeze-dried powders containing biomolecules. We established that these powders can be compressed at a relatively low pressure to yield tablets with sufficient cohesion. Nevertheless, manual compression is currently employed due to the poor flow of the FD powders. Next challenge would thus be to improve the processability of the powder to make it suitable for industrial processes.

CRediT authorship contribution statement

Charbel Madi: Writing – original draft, Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Project administration. **Hassana Hsein:** Writing – review & editing, Conceptualization, Methodology, validation, Visualization, Project administration, Supervision. **Virginie Busignies:** Writing – review & editing, Validation, Supervision. **Pierre Tchoreloff:** Writing – review & editing, Validation, Supervision. **Vincent Mazel:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

The data that has been used is confidential.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124059>.

References

- Adler, M., Lee, G., 1999. Stability and surface activity of lactate dehydrogenase in spray-dried trehalose. *J. Pharmaceut. Sci.* 88, 199–208. <https://doi.org/10.1021/js980321x>.
- Bjelošević, M., Zvonar Pobirk, A., Planinšek, O., Ahlin Grabnar, P., 2020. Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation. *Int. J. Pharm.* 576, 119029 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119029>.
- Bookwala, M., DeBoyace, K., Buckner, I.S., Wildfong, P.L., 2020. Predicting density of amorphous solid materials using molecular dynamics simulation. *AAPS PharmSciTech* 21, 1–11.
- Bourduche, F., Sanchez-Ballester, N.M., Bataille, B., Lefèvre, P., Sharkawi, T., 2020. Structure-property relationship of amorphous maltitol as tableting excipient. *AAPS PharmSciTech* 21, 1–12.
- Cares-Pacheco, M.G., Vaca-Medina, G., Calvet, R., Espitalier, F., Letourneau, J.-J., Rouilly, A., Rodier, E., 2014. Physicochemical characterization of d-mannitol polymorphs: the challenging surface energy determination by inverse gas chromatography in the infinite dilution region. *Int. J. Pharm.* 475, 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.029>.

- Croqueolois, B., Girardot, J., Kopp, J.B., Cazautets, C., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2017. Breaking pharmaceutical tablets with a hole: Reevaluation of the stress concentration factor and influence of the hole size. *Powder Technol.* 317, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.04.033>.
- Croqueolois, B., Girardot, J., Kopp, J.B., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2020. Quantification of tablet sensitivity to a stress concentration: Generalization of Hiestand's approach and link with the microstructure. *Powder Technol.* 369, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.05.002>.
- Elkhider, N., Chan, K.A., Kazarian, S.G., 2007. Effect of moisture and pressure on tablet compaction studied with FTIR spectroscopic imaging. *J. Pharm. Sci.* 96, 351–360.
- Fell, J., Newton, J., 1970. Determination of tablet strength by the diametral-compression test. *J. Pharm. Sci.* 59, 688–691.
- Haddadzadegan, S., Dorkoosh, F., Bernkop-Schnürch, A., 2022. Oral delivery of therapeutic peptides and proteins: technology landscape of lipid-based nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 182, 114097 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114097>.
- Haque, M.K., Roos, Y.H., 2006. Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 7, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.12.004>.
- Hiestand, E.N., Wells, J.E., Peot, C.B., Ochs, J.F., 1977. Physical processes of tableting. *J. Pharm. Sci.* 66, 510–519. <https://doi.org/10.1002/jps.2600660413>.
- Hsein, H., Madi, C., Mazel, V., Tchoreloff, P., Busignies, V., 2023. Tableting properties of freeze-dried trehalose: physico-chemical and mechanical investigation. *Int. J. Pharm.* <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123598>.
- Littringer, E.M., Noisternig, M.F., Mescher, A., Schroettner, H., Walzel, P., Griesser, U.J., Urbanetz, N.A., 2013. The morphology and various densities of spray dried mannitol. *Powder Technol.* 246, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.05.004>.
- Mazel, V., Guérard, S., Croqueolois, B., Kopp, J.B., Girardot, J., Diarra, H., Busignies, V., Tchoreloff, P., 2016. Reevaluation of the diametral compression test for tablets using the flattened disc geometry. *Int. J. Pharm.* 513, 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.088>.
- Mazel, V., Tchoreloff, P., 2023. Indices for the brittleness of pharmaceutical tablets: a reassessment. *Int. J. Pharm.* 645, 123364 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123364>.
- Megarry, A.J., Booth, J., Burley, J., 2011. Amorphous trehalose dihydrate by cryogenic milling. *Carbohydr. Res.* 346, 1061–1064. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.011>.
- Meynard, J., Amado-Becker, F., Tchoreloff, P., Mazel, V., 2022. On the complexity of predicting tablet capping. *Int. J. Pharm.* 623, 121949 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121949>.
- Persson, A.-S., Pazesh, S., Alderborn, G., 2022. Tabletability and compactibility of α -lactose monohydrate powders of different particle size. I. Experimental comparison. *Pharmaceut. Dev. Technol.* 27, 319–330. <https://doi.org/10.1080/10837450.2022.2051550>.
- Pitt, K.G., Hensley, M.G., 2013. Determination of the tensile strength of elongated tablets. In: *Powder Technology, Special Issue: 5th International Granulation Workshop Granulation across the length scale 2011* 238, 169–175. doi:10.1016/j.powtec.2011.12.060.
- Rambhatla, S., Ramot, R., Bhugra, C., Pikal, M.J., 2004. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying: II. Control and characterization of the degree of supercooling. *AAPS PharmSciTech* 5, 54–62. <https://doi.org/10.1208/pt050458>.
- Roe, K.D., Labuza, T.P., 2005. Glass transition and crystallization of amorphous trehalose-sucrose mixtures. *Int. J. of Food Properties* 8, 559–574. <https://doi.org/10.1080/10942910500269824>.
- Schneid, S.C., Gieseler, H., Kessler, W.J., Luthra, S.A., Pikal, M.J., 2011. Optimization of the secondary drying step in freeze drying using TDLAS technology. *AAPS PharmSciTech* 12, 379–387.
- Tomar, M., Sinha, A.R., Singh, A.K., 2017. Process and development of co-processed excipient silicified microcrystalline cellulose and manufacture paracetamol tablet by direct compression. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 42, 191–196.
- Vanhoorne, V., Almey, R., De Beer, T., Vervaet, C., 2020. Delta-mannitol to enable continuous twin-screw granulation of a highly dosed, poorly compactable formulation. *Int. J. Pharm.* 583, 119374 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119374>.
- Vecchio, I., Tornali, C., Bragazzi, N.L., Martini, M., 2018. The discovery of insulin: an important milestone in the history of medicine. *Front. Endocrinol.* 9, 613. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00613>.
- Wünsch, I., Finke, J.H., John, E., Juhnke, M., Kwade, A., 2019. A mathematical approach to consider solid compressibility in the compression of pharmaceutical powders. *Pharmaceutics* 11, 121. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030121>.
- Wünsch, I., Michel, S., Finke, J.H., John, E., Juhnke, M., Kwade, A., 2021. How can single particle compression and nanoindentation contribute to the understanding of pharmaceutical powder compression? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 165, 203–218. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.009>.