N°d'ordre NNT : xxx

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale EDISS 205
(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé)

Spécialité de doctorat : Sciences pharmacotechniques et biopharmaceutiques

Soutenue publiquement le 20/12/2016, par :
Zoé SENTA-LOYS

Films orodispersibles de tétrabénazine pour l'administration pédiatrique.

Devant le jury composé de :

Dr. Catherine TULEU (University of London)	Rapporteur
Pr. Philippe MAINCENT (Université de Lorraine, Nancy)	Rapporteur
Dr. Vincent JANNIN (Société Gattefossé, St. Priest)	Rapporteur
Dr. Mohamed SKIBA (Université de Rouen)	Examinateur
Pr. Stéphanie BRIANÇON (Université Lyon 1)	Examinatrice
Pr. Hatem FESSI (Université Lyon 1)	Directeur de thèse
Dr. Sandrine BOURGEOIS (Université Lyon 1)	Co-encadrante de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. le Professeur H. HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

A Anne,

Et tout élan est aveugle sauf là où il y a savoir,

Et tout savoir est vain sauf là où il y a travail,

Et tout travail est vide sauf là où il y a amour;

Et lorsque vous travaillez avec amour vous vous liez à vous-même, et l'un à l'autre,…

Khalil Gibran

REMERCIEMENTS

Je souhaite sincèrement remercier,

Hatem Fessi et Sandrine Bourgeois, pour m'avoir permis de réaliser ce travail, pour la confiance qu'ils m'ont accordée et les précieux conseils qu'ils m'ont prodigués tout au long du projet ;

Catherine Tuleu, Vincent Jannin et Philippe Maincent d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse ;

Stéphanie Briançon de m'avoir fait l'honneur de présider le jury, mais aussi pour les nombreux échanges que nous avons eu durant ces trois années ;

Mohamed Skiba d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse, mais aussi pour m'avoir accompagnée et conseillée dans mon travail sur les cylodextrines ;

Nadia Chapel, pour son accueil, sa vitalité et sa grande efficacité !;

Jocelyne Pelletier, de nous avoir épaulés dès notre arrivée au laboratoire, pour son expertise en HPLC et pour les moments passés en salle conviviale à fêter les évènements de chacun autour d'une tablée bien remplie ;

Eyad Almouazen, pour ses conseils et ses encouragements. Grâce au partage de ton expérience et ta positivité, je suis toujours sortie de nos discussions, motivée et rassurée ;

Le laboratoire de chimie médicinale b2mc, particulièrement Laurent Ettouati, pour m'avoir formée à l'analyse LC-MS, fait partager ses connaissances sur ce domaine, et de s'être toujours rendu disponible pour répondre à mes interrogations. Merci aussi à Marc Leborgne pour ses conseils tant sur le projet de thèse que sur mon futur professionnel ;

Ruben Vera, pour m'avoir fait découvrir le monde de la DRX, pour sa disponibilité malgré son planning minuté, mais aussi pour son humour (parfois sarcastique) et ses encouragements qui rendaient mes passages à l'ISA agréables et dynamisants ;

Cyril Paillet-Mattei, pour ces moments à mettre au point la caractérisation mécanique des films. Nous ne serons pas allés au bout de nos ambitions mais notre collaboration aura été pour moi intéressante et enrichissante grâce au partage de ses connaissances.

Géraldine Agusti, pour m'avoir formée aux nombreux appareils du laboratoire : ATG, DSC, HPLC,…

Nos chers voisins de parasitologie : Samira, Marion, Nestor et Philippe.

Mes co-bureaux : Alicia, nous aurons tout vécu ensemble ces 3 ans… je te remercie pour ton calme, ton écoute, tes conseils bienveillants et toutes tes petites attentions ! Raphaël, pour tous nos délires qui nous faisaient oublier le quotidien mais aussi pour ta franchise et ta clairvoyance.

Mes collègues/amis de Rockefeller : Alicia, Raphaël, Marion, Anissa, Audrey et Sabrina. Nous aurons partagés de nombreux moments, bons, mauvais, stressants,… Mais nous serons toujours restés soudés. Je vous remercie pour votre soutien mais surtout pour votre amitié.

Mes collègues de la Doua : Fabrice, Maelenn, Pedro, Barbara, Aurélie, Louis, Romain, Karim … Cela a toujours été un plaisir de vous voir lors de mes passages sur ce site.

Mes stagiaires : Robyn, Raissa et Freddy. Je vous remercie pour le travail que vous avez fourni et pour l'expérience d'encadrement que vous m'avez apportée.

Mes copines de toujours (Océane, Samantha, Karine, Camille, Chloé, Maissa, Phonthip, Sita, Marion et Claire), pour leur soutien, leur compréhension, leur encouragement. Chacune à votre façon m'avez aidée à vivre ce projet dans les meilleures conditions. Remerciement spécial à Samantha et Karine qui ont carrément mis la main à la pâte de la rédaction du manuscrit jusqu'à la présentation !

Mon chéri pour sa patience, son amour et sa volonté de me faire appréhender la vie autrement afin qu'elle soit plus simple, plus douce mais surtout pour que j'aille au bout de mes rêves.

Ma famille… Marie pour ton soutien et ton écoute inconditionnelle et pour m'avoir supportée jusqu'au bout ! Mes parents, pour leurs conseils, leur amour et la force qu'ils me communiquent depuis toujours. Et enfin, mes sœurs pour tout l'amour qu'elles me donnent. La complicité qui nous unit nous permet de rester liées malgré les milliers de kilomètres qui nous séparent.

RESUME :

Lors de cette dernière décennie, le développement de formes pharmaceutiques innovantes permettant d'améliorer l'efficacité, la sécurité et l'acceptabilité des médicaments pédiatriques est en pleine croissance. Les films orodispersibles (ODF) appartiennent à ces nouvelles formes galéniques améliorant la compliance des patients. Ils sont constitués d'une matrice de polymère hydrophile dans laquelle un ou des principe(s) actif(s) (PA) sont dissous ou dispersés. Après dépôt de l'ODF sur la langue ou dans la cavité buccale, la matrice se désagrège libérant le PA pour une action locale ou systémique. Dans cette étude, la mise au point d'ODF, par la méthode de coulée/évaporation de solvant a été explorée afin d'administrer un PA d'intérêt en pédiatrie, la tétrabénazine (TBZ). Les caractérisations physicochimiques et biopharmaceutiques des ODF ont mis en évidence une augmentation de la vitesse et du taux de dissolution de la TBZ induit par son état amorphe. Le système constitué d'un support polymère et d'un PA sous forme amorphe peut être assimilé aux dispersions solides amorphes (SD). Les études réalisées démontrent l'importance de la nature du polymère utilisé pour maintenir les propriétés initiales du système dans le temps. La formation de liaisons hydrogène entre la PA étudié et le polymère est un facteur essentiel pour assurer la stabilité des SD. De plus, l'incorporation de cyclodextrines (CD) prolonge l'état amorphe du PA en générant des liaisons hydrogène avec la TBZ et en l'entourant d'une barrière chimique. Cette association favorise la libération du PA par effet synergique améliorant la biodisponibilité. Cette forme innovante représente un intérêt majeur dans l'amélioration de l'observance dans le cadre d'un traitement pédiatrique.

Mots clés : Formes pédiatriques ; Film orodispersible ; Tétrabénazine ; Hydroxypropylméthylcellulose ; Polyvinylpyrrolidone ; Pullulan ; Dispersions solides amorphes ; Cyclodextrines.

ABSTRACT:

During the last decade, various strategies to develop innovating oral dosage forms for pediatric population were investigated in order to improve treatment efficiency, safety and acceptability. Among these new delivery systems, orodispersible films (ODF) present a great potential to enhance patient compliance. In ODF, drug is dissolved or dispersed in a hydrophilic film-forming polymer. Once the ODF is in the mouth, polymeric matrix disintegrates releasing the drug for local or systemic action. In this study, ODF, produced with the solvent casting/evaporation method, were developed to administer a drug of interest for pediatric population, the tetrabetazine (TBZ). Physicochemical and biopharmaceutic characterizations showed that ODF allowed a major improvement of TBZ dissolution profile in simulated saliva, mainly due to the amorphous state of the drug in ODF. ODF were identified as amorphous solid dispersion (SD) composed of both amorphous TBZ and polymer matrix. We demonstrated that the choice of the polymer plays an important role to maintain initial properties of the system and amorphous state stability over the time. H-bonding formation between TBZ and polymer is essential to assure the preservation of TBZ amorphous state. Moreover, the incorporation of cyclodextrins (CD), by generating H-bonding with TBZ, has extended its stability. By synergic effect, this association produces an improvement of drug release leading to promote bioavailability. As they are easy to swallow and allow enhancing treatment efficiency, ODF appear as suitable delivery forms for pediatric patients.

Key words: Pediatric oral dosage forms; Orodispersible films; Tetrabenazine; Hydroxypropylmethylcellulose; Polyvinylpyrrolidone; Pullulan; Amorphous solid dispersions; Cyclodextrins.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS 14
LISTE DES FIGURES 16
LISTE DES TABLEAUX 20
LISTE DES ANNEXES 22
INTRODUCTION GENERALE 24
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE 28
1 Les médicaments pédiatriques oraux 30
1.1 Spécificités de la population pédiatrique 30
1.1.1 Changements influençant l'absorption du principe actif 31
1.1.2 Changements influençant la distribution du principe actif 33
1.1.3 Changements influençant le métabolisme du principe actif 33
1.1.4 Changements influençant l'élimination du principe actif 34
1.2 Réglementation 34
1.2.1 Contexte 34
1.2.2 Historique 35
1.2.3 Règlement Européen : Incitation et obligation 36
1.2.4 Bilan du règlement pédiatrique 39
1.3 Formulation pédiatrique orale 43
1.3.1 Choix d'une forme pédiatrique orale 43
1.3.2 Formes orales solides innovantes 47
1.3.3 Excipients à effets notoires 52
1.4 Palatabilité et masquage du goût 53
1.4.1 Stratégies de masquage du goût 54
1.4.2 Méthodes d'évaluation du goût 59
1.5 Conclusion 61

2 Les films orodispersibles 64
2.1 Généralités 64
2.2 Composition des films orodispersibles 67
2.2.1 Composition générale 67
2.2.2 Les polymères hydrophiles 68
2.2.3 Choix des excipients et leurs effets sur les films orodispersibles 73
2.3 Procédés de fabrication 74
2.3.1 Méthodes conventionnelles 74
2.3.2 Méthodes innovantes 75
2.4 Caractérisations *in vitro* 77
2.4.1 Evaluation des propriétés Pharmacotechniques 77
2.4.2 Caractérisations physico-chimiques 80
2.4.3 Caractérisations mécaniques 81
2.4.4 Caractérisation de l'état physique du PA 83
2.4.5 Caractérisation organoleptique 83
2.5 Conclusion 83
3 Amélioration de la dissolution des BCS II 86
3.1 Les dispersions solides 88
3.1.1 Aspect structural et classification 88
3.1.2 Procédés de fabrication des dispersions solides 91
3.1.3 Les polymères comme support des dispersions solides de 2ème génération 93
3.1.4 Caractérisations des dispersions solides 94
3.1.5 Mécanisme de libération du PA à partir des dispersions solides 96
3.1.6 Stabilité 98
3.1.7 Conclusion 100
3.2 Les cyclodextrines 101

3.2.1 Structure des complexes d'inclusion et application dans le domaine pharmaceutique 101
3.2.2 Les cyclodextrines et leurs dérivés 102
3.2.3 Applications et utilisations des CD naturelles et modifiées dans le domaine pharmaceutique 103
3.2.4 Complexation 105
3.2.5 Caractérisations des complexes 108
3.2.6 Dispersions solides de 3ème génération PA-Polymère-CD 110
3.3 Conclusion 112
PARTIE EXPERIMENTALE 114
1 Introduction des travaux expérimentaux 116
1.1 La Tétrabénazine comme PA modèle 116
1.1.1 Propriétés physicochimiques de la Tétrabénazine 116
1.1.2 Pharmacologie de la Tétrabénazine 117
1.1.3 La Tétrabénazine chez l'enfant 118
1.2 Choix des films orodispersibles 119
1.2.1 Procédé de fabrication 120
1.2.2 Pré-formulation 120
1.2.3 Choix des polymères matriciels 123
1.2.4 Choix des autres adjuvants 124
2 Formulation de films orodispersibles pour la population pédiatrique –Etude de faisabilité et de stabilité pour la Tétrabénazine. 128
2.1 Résumé de la publication 128
2.2 Publication 131
2.3 Résultats complémentaires : caractérisation des produits de dégradation de la TBZ par LC-MS 154
2.3.1 Préparation des échantillons 154
2.3.2 Méthode LC-MS 154

2.3.3 Résultats et discussion 155
3 Dispersions solides amorphes sous forme de films orodispersibles 162
3.1 Résumé de l'étude 162
3.2 Publication 165
4 Incorporation dans des cyclodextrines - Amélioration de la stabilité et des propriétés de la TBZ contenue dans un ODF. 191
4.1 Matériels 193
4.2 Méthodes 194
4.2.1 Choix d'un type de CD pour la complexation de la TBZ 194
4.2.2 Préparation de complexes d'inclusion TBZ-αCD et incorporation dans des ODF 195
4.2.3 Caractérisations des CI et ODF 196
4.3 Résultats et discussion 200
4.3.1 Choix d'un type de CD pour la complexation de la TBZ 200
4.3.2 Caractérisations des complexes d'inclusion 202
4.3.3 Caractérisations des ODF contenant les CI au ratio (1 :2). 207
4.3.4 Etude physicochimique et organoleptique 212
4.4 Conclusion 219
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 221
ANNEXES 225
REFERENCES 253

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN	Acétonitrile
ADME	Absorption, distribution, métabolisation, élimination
AMM	Autorisation de mise du le marché
ASTM	Standard test method
ATG	Analyse thermogravimétrique
BCS	Biopharmaceutics classification system
BPCA	Best pharmaceuticals for children act
CA	Citric acid
CD	Cyclodextrine
CE	Commission européenne
CHMP	Comité des médicaments à usage humain
CI	Complexe d'inclusion
CMC	Carboxyméthylcellulose
COMP	Comité des médicaments orphelin
CPT	Camptothécine
CVMP	Comité des médicaments à usage vétérinaire
DE	Equivalent dextrose
DRX	Diffraction des rayons X
DSC	Differential scanning calorimetry
EC	Efficacité de complexation
EMA	European medicines agency
ENPR-EMA	European paediatric network-European medicines agency
FDA	Food and drug agency
FT-IR	Infrarouge à transformée de fourrier
HEC	Hydroxyéthylcellulose
HMPC	Comité thérapies innovantes
HPC	Hydroxypropylcellulose
HPMC	Hydroxypropylméthylcellulose
Hr	Taux d'humidité résiduelle
HR	Humidité relative
ICH	Conférence internationale d'harmonisation
IND	Indométhacine
JPC	Japanese pharmacopoeia
MEB	Microscopie électronique à balayage

ODF	Orodispersible film
ODT	Orodispersible tablet
PA	Principe actif
PDCO	Paediatric drug comittee
PEG	Polyéthylène glycol
PFI	Paediatric formulation initiative
PIP	Plan d'investigation pédiatrique
PREA	Pediatric research equity act
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PUMA	Paediatric use marketing authorisation
PUL	Pullulan
PVP	Polyvinylpyrrolidone
REI	Résine échangeuse d'ion
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
SD	Solid dispersion-Dispersion solide
SEM	Scanning electron microscopy
STEP	Safety and toxicity of excipients for paediatric
TBZ	Tétrabénazine
USP	United State pharmacopeial convention
UV	Ultraviolet

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principales différences observées chez l'enfant dans le schéma ADME des principes actifs administrés. *31*
Figure 2 : Validation de la conformité des PIP par an (EMA/795830/2015). *40*
Figure 3 : Nombre de PIP modifiés en fonction du nombre de dossiers soumis par an (EMA/795830/2015). *41*
Figure 4 : Proportion des essais cliniques chez l'enfant par rapport à tous les essais réalisés (EMA/795830/2015). *42*
Figure 5 : Dispositifs de dosage pour l'administration de systèmes multiparticulaires : a. Paille pour l'administration de granules (Xstraw®, Harro Högliger, Allemagne) et b. Cuillère pré-remplie (Walsh et al.., 2011) *48*
Figure 6 : Systèmes d'administration orodispersibles. *49*
Figure 7 : Systèmes d'administration à mâcher, sucer et croquer pour les enfants. *50*
Figure 8 : Exemple d'échelle faciale pour l'évaluation du goût par la population pédiatrique (adapté de Guinard J., 2001) *59*
Figure 9 : Systèmes de détection du goût TS-5000 Z (a) et α-Astree®(b). *61*
Figure 10 : Schéma d'administration d'un film orodispersible. *64*
Figure 11 : Formule chimique développée du monomère glycosidique constituant la cellulose. *69*
Figure 12 : Formule chimique développée des monomères d'amylose (à gauche) et d'amylopectine (à droite) constituant l'amidon. *70*
Figure 13 : Formule chimique développée du monomère maltotriose constituant le pullulan. *71*
Figure 14 : Formule chimique développée du monomère constituant la Polyvinylpyrrolidone. *72*
Figure 15 : Formule chimique développée du monomère constituant le Kollicoat® IR. *72*
Figure 16 : Formule développée du monomère osidique constituant le chitosane. *72*
Figure 17 : Formule chimique développée du monomère constituant le xyloglucane. *73*
Figure 18 : Procédé de fabrication par flexographie (modifiée de http://cerig.pagora.grenoble-inp.fr/tutoriel/flexographie/images/groupe-impression-flexo.jpg) *76*
Figure 19 : Procédé permettant de caractériser le point de rupture des films (Preis et al., 2014). *78*
Figure 20 : Dispositifs d'écoulement millifluidique mis en place par A. Adrover et al., et B. Hoang Thi et al., pour mimer le flux salivaire de la cavité buccale. *79*
Figure 21 : Appareil pour la mesure des propriétés mécaniques des films de type « Texture Analyzer ». *81*
Figure 22 : Représentation des classes de molécules selon le BCS. *86*
Figure 23 : Techniques d'analyses utilisées pour la caractérisation des dispersions solides. *96*
Figure 24 : Profil de dissolution des dispersions de solides. (Schéma adapté de Baghel et al.). *97*
Figure 25 : Cristallisation des dispersions solides (Janssens and Van den Mooter, 2009). *99*

Figure 26 : Représentations chimique (a) et toroïdale (b) d'une cyclodextrine. 102
Figure 27 : Structure moléculaire de l'α, β, γ-CD. 102
Figure 28 : Représentation graphique des profils de phase illustrant l'évolution de la solubilité en fonction de la concentration en cyclodextrine (Adapté de Loftsson and Brewster). 107
Figure 29 : Méthodes analytiques permettant la caractérisation des complexes à l'état solide ou en solution. 110
Figure 30 : Fiche produit de la Tétrabénazine (Guay et al., 2010). 117
Figure 31 : Schéma du procédé de fabrication « solvant coulé/évaporation » 120
Figure 32 : Caractérisations des ODF blancs (a) et contenant la TBZ (b). 123
Figure 33: Taux d'humidité résiduelle (Hr) des ODF en fonction de la quantité de glycérol ajouté. 124
Figure 34 : Propriétés des ODF après incorporation de 15% de glycérol 125
Figure 35 : Images obtenues en microscopie polarisante de l'ODF à base d'HPMC avec différents agents de désintégration (Mannitol Flash, Corscarmellose, Crospovidone) et remplissage (sorbitol). 125
Figure 36 : Propriétés finales des ODF selon la nature de polymère matriciel utilisé. 126
Figure 37 : Chromatogramme de la TBZ pure solubilisée dans ACN (a) et de la TBZ extraite de HPMC-ODF (b). 155
Figure 38 : Interprétation mécanistique de la formation de la cis-TBZ en milieu acide. 157
Figure 39 : Spectre RMN 1H de la TBZ dans le DMSO-d6 et dans D20+acide citrique (1,5M). 158
Figure 40 : Evolution des produits de dégradation de la TBZ durant 6 mois de conservation. 159
Figure 41 : Evolution de la solubilité de la TBZ en fonction de la concentration en α-CD (n=3). 200
Figure 42 : Evolution de la solubilité de la TBZ en fonction de la concentration en β-CD (n=2). 201
Figure 43 : Evolution de la solubilité de la TBZ en fonction de la concentration en γ-CD (n=2) 201
Figure 44 : Courbe DSC des composés purs et des complexes d'inclusion formés à différents ratio TBZ : CD. 203
Figure 45 : Diffractogrammes des matières premières (TBZ, acide citrique et α-CD), de l'αCD après séchage par atomisation et des complexes d'inclusion aux différents ratios TBZ : CD. 204
Figure 46 : Images en MEB de la TBZ pure, l'αCD pure et après séchage par atomisation et le CI (1 :2). 206
Figure 47 : Thermogrammes des composés purs, du complexe 1 :2, des supports filmogènes non chargés et chargés en CI incorporés sous forme de solution (1) et à l'état sec (2). 207
Figure 48 : Observation de la structure cristalline par DRX des ODF contenant les CI avec les procédés (1) et (2), en comparaison avec HPMC-ODF (ODF blanc), HPMC-ODF+TBZ sans ajout de CD et le CI (1 :2) 208
Figure 49 : Observation de la structure cristalline par DRX des ODF contenant les CI avec les procédés (1) et (2), en comparaison avec PVP-ODF (film blanc), PVP-ODF + TBZ sans ajout de CD et le CI (1 : 2). 209

Figure 50 : Images des films contenant les complexes d'inclusion. 209
Figure 51 : Profil de libération de la TBZ incorporée dans les films sans CI et avec CI secs ou en solution. 211
Figure 52 : Thermogrammes après 1 mois de stockage des ODF constitués d'HPMC et PVP contenant les CI incorporés sous forme de solution (1) ou à l'état solide après séchage par atomisation (2)... 212
Figure 53 : Observation DRX de la structure cristalline des films orodispersibles à base d'HPMC après 1 mois de stabilité. 213
Figure 54 : Observation DRX de la structure cristalline des films orodispersibles à base de PVP après 1 mois de stabilité. 214
Figure 55 : Images MEB des ODF + CI après 1 mois de stabilité. 214
Figure 56 : Profil de libération de la TBZ incorporée dans les films sans CI et avec CI secs ou en solution après 1 mois de stockage. 216
Figure 57 : Moyenne des notes attribuées (n=20) par le panel pour chaque formulation en fonction du temps 217

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Evolution des facteurs physiologiques au niveau du tractus gastro-intestinal du nouveau-né au nourrisson (Bowles et al., 2010). *32*
Tableau 2 : Situations considérées comme des prescriptions hors AMM (Kimland and Odlind, 2012). *35*
Tableau 3 : Système de notation des formulations pédiatriques (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005). *45*
Tableau 4 : Matrice identifiant les formes galéniques orales les mieux acceptées et adaptées à la population pédiatrique selon la catégorie d'âge (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005). *46*
Tableau 5 : Avantages et inconvénients des nouvelles formes orales solides (Lopez et al., 2015). *51*
Tableau 6 : Exemple d'excipients et leurs effets notoires issus de la liste prioritaire dressée par les membres du PFI. *53*
Tableau 7 : Caractéristiques des édulcorants naturels, de charge et de synthèse (Clarisse et al., 2009). *54*
Tableau 8 : Arômes de choix en fonction de la saveur de base du PA et de l'indication thérapeutique (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005). *56*
Tableau 9 : Exemples de complexes REI-PA. *58*
Tableau 10 : Caractéristiques des films à libération rapide et retardée. *65*
Tableau 11 : Dispositifs médicaux et médicaments sous forme de films orodispersibles sur le marché. *67*
Tableau 12 : Composition générale des films oraux (Arya et al., 2010 ; Bala et al., 2013). *68*
Tableau 13 : Avantages et inconvénients des méthodes conventionnelles pour la fabrication de films orodispersibles. *75*
Tableau 14 : Types et caractéristiques de SD. *89*
Tableau 15 : Propriétés idéales du support des dispersions solides. *93*
Tableau 16 : Polymères utilisés pour la fabrication des dispersions solides. *94*
Tableau 17 : Caractéristiques des cyclodextrines naturelles. *103*
Tableau 18 : Compositions des ODF. *121*
Tableau 19 : Description des scores attribués aux propriétés des ODF. *122*
Tableau 20 : Résultats LC-MS des pics de la TBZ contenue dans les films à T=0, T=3 mois et T=6 mois. Tr1 correspond à la TBZ (318,2 [TBZ+H] +) et Tr2 correspond à la TBZ (m/z 318,2).* *156*
Tableau 21 : Facteurs physicochimiques influençant la stabilité des SD. *165*
Tableau 22 : Gammes de concentrations réalisées pour établir le diagramme de solubilité de la TBZ en fonction du type de CD utilisées. *194*
Tableau 23 : Composition des films orodispersibles avec incorporation des CI sous forme de solution (procédé 1). *196*

Tableau 24 : Composition des films orodispersibles avec incorporation des CI en poudre obtenus après séchage par atomisation (procédé 2). *196*
Tableau 25 : Composition des ODF administrés au panel. *199*
Tableau 26 : Pics caractéristiques de la TBZ et de l'α-CD. *205*
Tableau 27 : Groupements caractéristiques de la TBZ et de l'α-CD dans les ODF. *210*
Tableau 28 : Groupements caractéristiques de la TBZ et de l'αCD dans les ODF + CI après 1 mois de stockage. *215*
Tableau 29 : Scores attribués pour chaque formulation. *218*

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : PIP TBZ..... 226
Annexe 2 : Article publié du chapitre 2 expériemental..... 233
Annexe 3 : Matériel et méthodes de l'analyse par LC-MS..... 244
Annexe 4 : Courbe d'étalonnage de la TBZ..... 245
Annexe 5 : Spectres FT-IR des composés purs..... 246
Annexe 6 : Comparaison des pics de diffraction apparus après 1 mois de stockage avec les pics caractéristiques de la TBZ et l'α-CD. 248
Annexe 7 : Spectres FT-IR des ODF contenant les CI- T=1mois. 249
Annexe 8 : Scores attribués par le panel de volontaires. 251

INTRODUCTION GENERALE

La population pédiatrique, allant du nouveau-né à l'adolescent, est très diverse. En effet, cette population se caractérise par un organisme en maturation subissant des changements physiologiques et anatomiques constants. La mise au point d'un médicament pédiatrique impose une évaluation des paramètres physiologiques et des caractères communs de chaque catégorie pour développer un traitement efficace et sûr. De plus, des difficultés relatives à la conduite de la recherche clinique pour cette population s'observent à différents niveaux : technique (concevoir des appareils adaptés), logistique (concilier participation au protocole de l'enfant et de sa famille) et éthique (enfant considéré comme une personne vulnérable). De ce fait, très peu de médicaments présents sur le marché sont adaptés aux enfants. Dans le but de promouvoir leur développement, les agences de santé américaine (Food and Drug Administration) puis européenne (European Medicines Agency) ont mis en place des règlements pédiatriques. La règlementation européenne mise en vigueur en 2007, est basée sur un système d'incitation/récompense. Ainsi, pour toute procédure d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), l'industriel devra fournir un Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP). Les PIP décrivent l'ensemble des mesures pharmaceutiques, précliniques et cliniques à réaliser pour assurer la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments pédiatriques. L'une des mesures pharmaceutiques à ne pas négliger, est la forme d'administration du médicament. En raison d'une faible flexibilité de la dose et du besoin d'être avalées, les formes orales solides conventionnelles (comprimés, gélules) ne sont pas adaptées à l'enfant de moins de 6 ans. En 2008, des experts de l'OMS ont publié un rapport dans lequel ils recommandaient l'utilisation de formes orales solides souples pour la population pédiatrique, telles que les formes orodispersibles ou des formules à reconstituer pour obtenir des préparations orales liquides.

Les films orodispersibles (ODF) appartiennent à ces nouvelles formes galéniques permettant d'améliorer l'efficacité, la sécurité et l'acceptabilité des médicaments pédiatriques. Ils sont constitués d'une matrice de polymère hydrophile dans laquelle un ou des principe(s) actif(s) (PA) sont dissous ou dispersés. Après dépôt de l'ODF sur la langue ou dans la cavité buccale, la matrice se désagrège libérant le PA pour une action locale ou systémique. Les caractéristiques souhaitées des films telles que la vitesse de libération du principe actif, le taux de chargement en médicament et les propriétés mécaniques sont dépendantes du support utilisé. En effet, c'est en jouant sur la nature, le grade et la concentration en polymère, que les propriétés désirées pourront être obtenues. Les propriétés des ODF dépendent aussi du

procédé de fabrication utilisé. L'intérêt majeur des ODF est leur capacité de dissolution dans la cavité buccale. Ils pourront être ingérés facilement sans eau, améliorant ainsi la compliance des populations présentant des difficultés à avaler. Les ODF offrent d'autres avantages, tels qu'un dosage plus précis et une meilleure conservation par rapport à l'administration d'une solution buvable, aucun risque d'étouffement ou encore une facilité à manipuler et à transporter. De plus, la désintégration rapide du film et la disponibilité immédiate du PA lorsque celui-ci est à l'état dissous dans la matrice, permettent d'améliorer la biodisponibilité du médicament.

Comme mentionné précédemment, les ODF sont formés d'un support polymère dans lequel est dispersé ou dissous un PA. Un système constitué d'un support polymère et d'un PA sous forme amorphe peut être assimilé aux dispersions solides (SD) amorphes. L'amélioration de la solubilité des PA grâce à une formulation sous forme de SD amorphes est due à différents facteurs tels que la réduction de la taille des particules, l'augmentation de la mouillabilité des particules, l'augmentation de la porosité du système et l'état amorphe du PA. Cependant, maintenir ces systèmes stables est un véritable challenge car l'état amorphe (métastable) tend à évoluer vers l'état cristallin (thermodynamiquement stable). Pour maintenir la stabilité des SD amorphes, il est nécessaire de diminuer la mobilité moléculaire du PA. Ainsi, le choix du polymère en fonction du PA d'intérêt sera d'une importance considérable pour garantir la pérennité des SD amorphes. L'incorporation d'agent d'inclusion/complexation tels que les cyclodextrines (CD) pourrait contribuer à l'amélioration des propriétés de ces SD amorphes. En effet, en formant une barrière chimique autour des molécules de PA, les CD permettraient de prévenir l'agglomération du PA dans la formulation et sa re-précipitation lors de sa libération. De plus, il a été montré que les CD amélioraient la dissolution de PA peu hydrosolubles. Ainsi, l'ajout de CD dans les SD amorphes pourrait accroître la dissolution du PA par effet synergique.

Le principal objectif de ce travail a été de mettre au point un ODF de tétrabénazine (TBZ) pour améliorer l'acceptabilité, la sécurité et l'efficacité d'un traitement pour la population pédiatrique. En effet, ce PA n'existe que sous la forme comprimé et fait partie des médicaments prioritaires pour lesquels le développement d'une forme galénique adaptée à la population pédiatrique est nécessaire.

Le travail comporte deux parties. Dans la partie bibliographique, le 1er chapitre définit les raisons pour lesquelles le développement de médicaments pédiatriques est une nécessité, les moyens mis en jeux pour contraindre les industriels à s'investir et les points clés à prendre en

considération lors de la formulation de formes orales pédiatriques. Les paramètres relatifs à la composition, la fabrication et la caractérisation des ODF sont ensuite développés. Enfin, la dernière partie présente les SD amorphes, leur capacité à améliorer la dissolution des PA peu ou pas solubles, leur problématique de stabilité dans le temps et une stratégie permettant d'améliorer leurs propriétés via l'incorporation de CD.

A l'issue de cette étude bibliographique, un travail expérimental est présenté. Tout d'abord, une introduction apporte des informations sur la TBZ et son intérêt en pédiatrie mais aussi sur le choix des paramètres liés à la formulation (procédé de fabrication, choix des polymères et excipients) des ODF. Le 1^{èr} chapitre de ces travaux expérimentaux caractérise les propriétés physico-chimiques, biopharmaceutiques et l'état physique des ODF fabriqués à partir des 4 polymères hydrophiles retenus : hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), polyvinylpyrrolidone (PVP), Pullulan (PUL) et hydroxyethylcellulose (HEC). Cette 1ère partie, qui a pour but de vérifier la faisabilité et la stabilité des ODF contenant la TBZ, a fait l'objet d'une publication dans Journal of Pharmacy and Pharmacology en 2016. Le deuxième chapitre met en évidence la formation de SD amorphes au sein des ODF et étudie le rôle des différents excipients sur le maintien de l'état amorphe de la TBZ. Ce chapitre est présenté sous forme d'un article scientifique soumis à International Journal of Pharmaceutics. Enfin, dans une 3ème partie, des complexes d'inclusion (CI) TBZ-CD sont fabriqués en vue de leur incorporation dans les ODF afin d'améliorer la dissolution de la TBZ, la stabilité des SD amorphes ainsi que les propriétés organoleptiques des ODF. Cette dernière partie fera l'objet d'une publication.

Enfin, une approche synthétique de l'ensemble des travaux de thèse sera présentée sous la forme d'une conclusion générale et de perspectives.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les médicaments pédiatriques oraux

1.1 Spécificités de la population pédiatrique

La population pédiatrique, allant du nouveau-né à l'adolescent, est très diverse. En effet, cette population se caractérise par un organisme en maturation subissant des changements physiologiques et anatomiques constants. La directive E11 de la Conférence Internationale d'Harmonisation (ICH) (CPMP/ICH/2711/99), relative à l'investigation clinique des médicaments au sein de la population pédiatrique, permet de catégoriser différentes tranches d'âges en fonction des changements physiologiques tels que la capacité métabolique, la maturation des organes et la clairance. La population pédiatrique peut être classée de la façon suivante :

- ✓ Nouveau-né prématuré ;
- ✓ Nouveau-né à terme (0 à 27 jours) ;
- ✓ Nourrisson (1 à 23 mois) ;
- ✓ Enfant (2 à 11 ans) ;
- ✓ Adolescent (12 à 18 ans).

Le devenir du principe actif (PA) et ses effets sur l'organisme dépendent des paramètres pharmacologiques liés au stade d'évolution physiologique d'un individu. Les paramètres pharmacologiques sont caractérisés par :

- ✓ **la pharmacocinétique**, « *ce que le corps fait au médicament* », définie par l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du PA. L'étude des paramètres pharmacocinétiques permet d'adapter la posologie et de déterminer le mode d'administration et la forme galénique optimale ;
- ✓ **la pharmacodynamie**, « *ce que fait le médicament au corps* », permet d'établir la relation dose/efficacité et dose/effet indésirable.

Les études pharmacologiques permettront d'assurer l'efficacité du traitement tout en garantissant une toxicité minimale. La mise au point d'un médicament pédiatrique nécessite donc d'évaluer ces paramètres en prenant compte des particularités de cette population (Pons G., 1993). En effet, les enfants ne sont pas des adultes miniatures ayant pour seules différences la taille et le poids. Ainsi, l'administration d'une dose adulte proportionnelle au poids de l'enfant ne permet pas d'obtenir une concentration plasmatique équivalente. De plus, la population pédiatrique étant très hétérogène, il faudra prendre en considération les

paramètres physiologiques et les caractères communs de chaque catégorie pour mettre au point un traitement efficace et sûr. Les principaux changements physiologiques, chez l'enfant, influençant le devenir du PA dans le corps sont observés à toutes les étapes pharmacocinétiques : absorption, distribution, métabolisme, élimination (Figure 1).

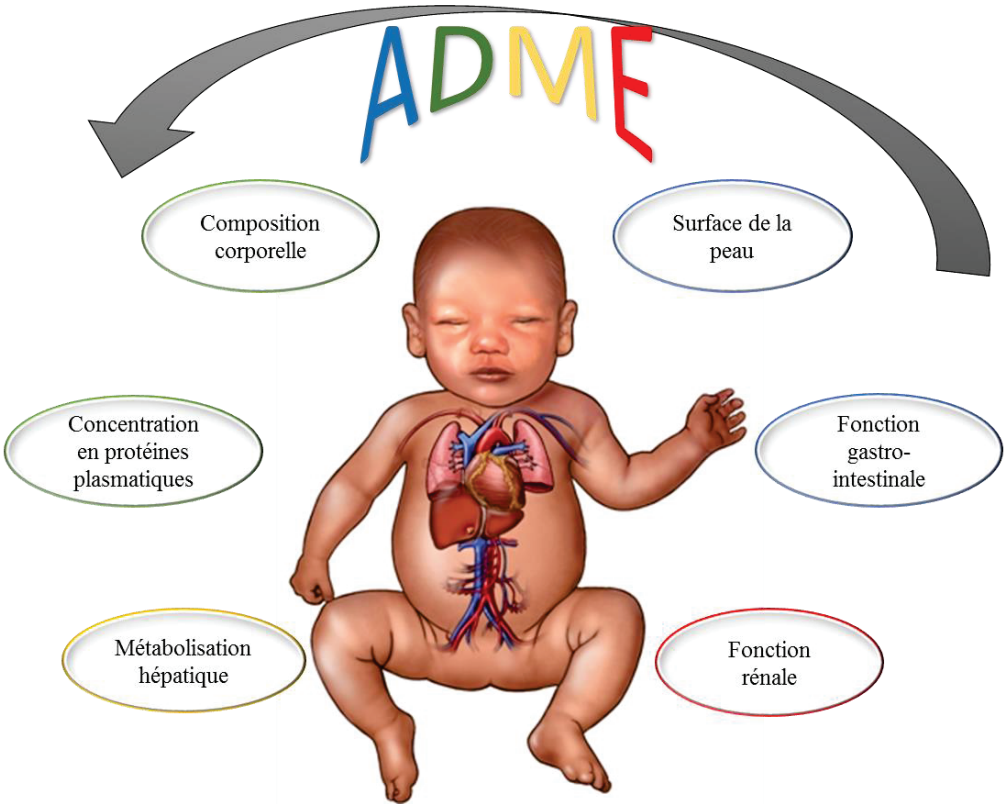


Figure 1 : Principales différences observées chez l'enfant dans le schéma ADME des principes actifs administrés.

1.1.1 Changements influençant l'absorption du principe actif

La première étape de l'administration du médicament correspond à son passage dans le sang. Son absorption détermine la quantité de PA disponible dans l'organisme et dépend particulièrement de la voie d'administration. Les principales évolutions observées chez l'enfant sont les suivantes :

- ✓ ***la surface de la peau*** (Kearns *et al.*, 2003) : la résorption percutanée chez le nouveau-né et le nourrisson est plus importante que chez l'adulte. Cette augmentation de l'absorption du PA à travers la peau s'explique par un taux d'hydratation élevé de la couche cornée et un rapport surface cutanée/poids plus important par rapport à l'adulte. La voie cutanée comme site d'administration du médicament chez l'enfant est

sujette à des risques de surdosage, en particulier lorsque l'application se fait sur une surface corporelle trop importante, dans un endroit occlusif (sous la couche par exemple) ou avec une répétition abusive.

- ✓ ***La fonction gastro-intestinale*** (Bowles *et al.*, 2010)***:*** l'absorption au niveau du tractus digestif est influencée par des facteurs tels que les pH gastrique et intestinal, la vascularisation des vaisseaux et le flux sanguin, la surface, la fonction pancréatique, la flore microbienne intestinale ainsi que la maturation des transporteurs et des récepteurs. Généralement, ces facteurs sont diminués ou immatures lors de la période néonatale (Tableau 1).

Tableau 1 : Evolution des facteurs physiologiques au niveau du tractus gastro-intestinal du nouveau-né au nourrisson (Bowles *et al.*, 2010).

Facteurs physiologiques	***Nouveau-nés (1-24 heures)***	***Nouveau-nés (0 à 27 jours)***	***Nourrissons (1 à 23 mois)***
Volume estomac (à jeun)		2,5 ml	2,5 ml
Production Acide/Pepsine		Relativement faible	~ Adulte
pH gastrique	Neutre	>5	~Adulte
Temps de vidange gastrique	Réduit	Réduit	Augmenté
Mobilité gastrique	Faible dans les 1ers jours de vie		~Adulte (6 à 8 mois)
Surface intestinale	Réduite	Réduite	~Adulte
Temps de transit intestinal	Réduit	Réduit	Augmenté
Fonction biliaire et pancréatique	Très immature	Immature	~Adulte
Flore bactérienne	Très immature	Immature	Immature
Activités enzymatiques et de transport	Très immature	Immature	Proche de l'adulte

Par exemple, le pH gastrique du nouveau-né se situe entre 6 et 8 du fait de l'inexistence de production d'acide gastrique et atteint la valeur du pH adulte à partir de la 3ème année de vie. Le temps de vidange gastrique est diminué chez le nouveau-né et augmente progressivement pour atteindre les valeurs adultes entre le 6ème et le 8ème mois. Au niveau de l'intestin grêle, la vitesse d'absorption est ralentie entraînant une diminution de la concentration maximale, en particulier pour les PA avec un temps de ½ vie court (Kaye J., 2011). La biodisponibilité et l'absorption du PA seront dépendantes de ces facteurs qui auront une influence sur le temps et l'intensité de l'effet thérapeutique chez l'enfant.

1.1.2 Changements influençant la distribution du principe actif

Une fois absorbé, la distribution du PA dans l'organisme se fera par le biais de la circulation sanguine. Plus le PA sera lipophile, plus le passage dans les cellules sera facilité. Certains paramètres physiologiques peuvent réduire ou au contraire augmenter la distribution du principe actif dans le corps :

- ✓ ***La composition corporelle :*** La proportion d'eau représente environ 80% du poids du corps à la naissance et diminue progressivement pour atteindre, à 1 an, la valeur de l'adulte d'environ 60%. De plus, concernant le compartiment adipeux, une variation de la masse graisseuse durant la croissance est observée. Le pourcentage de graisse à la naissance représente 1-15% du poids total, il va ensuite augmenter jusqu'à 30% chez le nourrisson d'environ 9 mois et diminuer pour atteindre une valeur de 10 à 15% à l'adolescence (Kearns *et al.*, 2013). Ces différences vont alors entraîner une augmentation du volume de distribution.
- ✓ ***La concentration en protéines plasmatiques*** telles que l'albumine et l'α-1-glycoprotéine acide peuvent influencer la distribution des PA dans l'organisme. En effet, une part des molécules de PA se lie aux protéines plasmatiques limitant leur distribution à la circulation sanguine, tandis que les molécules non liées restent disponibles pour être distribuées dans les tissus et les organes (fraction libre). Chez le nouveau-né et l'enfant de moins de 1 an, la concentration en protéines plasmatiques est largement inférieure aux valeurs trouvées chez l'adulte (< de plus de 50% pour l'α-glycoprotéine acide et 20% pour l'albumine) entraînant une augmentation de la fraction libre du médicament. Cela aura pour conséquence l'augmentation de l'effet thérapeutique mais aussi de la toxicité (EMEA/CHMP/EWP/147013/2004).

1.1.3 Changements influençant le métabolisme du principe actif

Le foie est le principal organe acteur du métabolisme du médicament. Le rôle majeur de la métabolisation hépatique est la transformation d'un PA liposoluble en un métabolite hydrosoluble, plus facilement éliminé dans les urines ou dans la bile. L'immaturité du foie chez l'enfant se traduit par une déficience de l'activité enzymatique responsable de la métabolisation. Ainsi, cette déficience entraine une diminution des réactions de phases I (oxydation, réduction hydrolyse) et II (glucuronoconjugaison, acétylation, méthylation,…) ralentissant alors la vitesse d'élimination des médicaments et augmentant leur temps de ½ vie par rapport à l'adulte. La maturation des systèmes métaboliques permettant la transformation

des PA est longue et variable. Généralement, la maturité du foie est atteinte vers 6 mois mais selon l'individu, certains systèmes arrivent à maturité au moment de la puberté (Pons G., 1993).

1.1.4 **Changements influençant l'élimination du principe actif**

L'élimination des médicaments est principalement effectuée par le rein. L'excrétion rénale est caractérisée par trois mécanismes : la filtration glomérulaire (filtration du sang par les glomérules rénaux), la sécrétion tubulaire (les molécules sont sécrétées par les tubulures du rein pour former l'urine) et la réabsorption tubulaire. A la naissance, les processus de filtration glomérulaire et de sécrétion tubulaire sont réduits. Cette fonction rénale n'arrive à maturité qu'à partir de 6-8 mois. Le ralentissement de l'élimination chez le nourrisson augmente le temps de ½ vie du PA et donc les risques de surdosage (Pons G, 1993).

1.2 Réglementation

1.2.1 **Contexte**

L'évolution des paramètres physiologiques lors de la croissance a un impact direct sur le développement des médicaments. En effet, la population pédiatrique, très hétérogène, nécessite le développement de traitements spécifiques en fonction des différentes tranches d'âges. De ce fait, les laboratoires pharmaceutiques manquent de motivation face à l'étroitesse du marché. A cela s'ajoute des difficultés relatives à la conduite de la recherche clinique pour cette population d'un point de vue technique (concevoir des équipements adaptés), logistique (concilier participation au protocole de l'enfant et de sa famille) et éthique (enfant considéré comme une personne vulnérable) (Reboul Salze F., 2010). La conséquence du faible intérêt que portent les industriels au développement de médicaments pédiatriques est la prescription hors AMM (Autorisation de Mise sur le Marché). Selon l'EMA, une indication est dite hors AMM lorsqu'un médicament est intentionnellement utilisé à des fins médicales non conformes à l'information du produit autorisé. Cela comprend l'administration de certains médicaments non agrées « pédiatriques » (EMA/876333/2011 Rev 3*). Chez l'enfant, un médicament peut être considéré comme hors AMM dans plusieurs cas de figures tels que la dose, la fréquence ou le mode d'administration qui diffèrent des recommandations données dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) (Tableau 2). En plus de l'administration de médicament hors AMM, les enfants peuvent recevoir des traitements non autorisés pour leur population.

Tableau 2 : Situations considérées comme des prescriptions hors AMM (Kimland and Odlind, 2012).

SITUATIONS DE PRESCRIPTION HORS AMM	DESCRIPTION
L'âge	Médicament non recommandé en dessous d'un certain âge dans le RCP
Le poids	Médicament non recommandé en dessous d'un certain poids dans le RCP
Absence d'information pédiatrique	Indication non spécifiée dans le RCP pour la population pédiatrique
Manque de données cliniques	Absence de données démontrant efficacité et sécurité du traitement chez l'enfant
Contre-indication	Médicament contre-indiqué chez l'enfant dans le RCP
Indication	Médicament prescrit pour une indication non recommandée dans le RCP
Voie d'administration	Médicament administré par une voie non décrite dans le RCP

Une étude effectuée dans un hôpital parisien par Chalumeau *et al.*. montre que 56% des patients en pédiatrie (du nouveau-né à l'adolescent) ont reçu un médicament hors AMM (Kimland and Odlind, 2012). Or, il a été montré que la prescription de médicaments non autorisés et hors AMM augmentaient de 23% les risques d'effets indésirables par rapport aux médicaments autorisés (Bellis *et al.*, 2014). Cette constatation montre un réel besoin dans la recherche et le développement de médicaments à usage pédiatrique pour assurer la sécurité des patients mais aussi pour alléger la prise de risques des professionnels de santé confrontés à ces problèmes (Lenk and Duttge, 2014).

1.2.2 **Historique**

Une première réponse au déficit en médicaments adaptés à la population pédiatrique a été proposée aux Etats-Unis, en décembre 1994 avec la publication de lignes directrices par la FDA, pour inciter les industries pharmaceutiques à apporter des informations supplémentaires pour certaines molécules en vue d'un usage pédiatrique (FDA, 1994). Ces directives, basées sur une démarche volontaire, ont peu été prises en considération. Ainsi, la FDA a établi, en juin 1998, un règlement connu sous le nom de *The pediatric rules*, suivi en 2002, par *The Best Pharmaceuticals for Children Act* (BPCA). Ces règlements font état d'une liste de PA pour lesquels des informations complémentaires (données cliniques chez l'enfant par exemple) seraient bénéfiques. Pour soutenir cette démarche, une protection supplémentaire de 6 mois

des brevets est prévue pour tout laboratoire qui conduirait des études dans ce sens. Finalement, en 2003, ces règles sont devenues le « Pediatric Research Equity Act » (PREA). Adoptées par le Congrès américain, ces règles obligent, cette fois-ci, les industriels à fournir des données pédiatriques pour tout dépôt d'une nouvelle AMM (FDA, 2003).

Dans ce contexte, en 1997, la Commission Européenne et l'EMA a réuni des experts afin d'identifier les problèmes relatifs à la pédiatrie. Cette table ronde a permis de mettre en évidence un déficit réel de données en recherche clinique ainsi qu'un manque d'informations et de formes galéniques spécifiques pour les traitements pédiatriques (EMEA/27164/98 Rev.1). Ainsi en 2001, la Commission Européenne a mis en place une directive pour promouvoir les essais cliniques chez la population pédiatrique (ICH E11). Puis, une ligne directrice intitulée « Better medicines for children - proposed regulatory actions in paediatric medicinal products » a été rédigée par la Commission Européenne en juin 2002. L'objectif de cette ligne directrice est de donner la marche à suivre pour l'administration de médicaments à la population pédiatrique (European Commission, 2002). Ce document a donné les prémisses du règlement n°1901/2006. En effet, en 2007, un système d'obligation/récompense pour les firmes pharmaceutiques a été adopté afin d'assurer la prise en compte de la population pédiatrique lors du développement de nouveaux PA mais aussi pour les médicaments déjà autorisés.

1.2.3 **Règlement Européen : Incitation et obligation**

Le règlement n°1901/2006 du Parlement européen et du Conseil de l'Union Européenne a été mis en vigueur courant juillet 2007. Ce règlement a pour but de « ... ***faciliter le développement et l'accessibilité de médicaments à usage pédiatrique***, ***d'assurer que ces médicaments fassent l'objet de recherches éthiques d'une grande qualité*** *et qu'ils soient dûment autorisés en vue d'un usage en pédiatrie, et enfin* ***d'améliorer les informations disponibles*** *sur l'usage de médicaments au sein des diverses populations pédiatriques. Il importe d'atteindre ces objectifs sans soumettre la population pédiatrique à des essais cliniques inutiles et* ***sans retarder l'autorisation de médicaments destinés à d'autres tranches d'âges de la population. »*** (Règlement (CE) No 1901/2006).

Le règlement Européen s'applique alors aux médicaments en développement, aux médicaments déjà autorisés et couverts par un brevet mais aussi aux médicaments déjà autorisés mais non couverts par des droits de brevets. Pour mener à bien son projet, le règlement prévoit :

- ✓ La mise en place d'un comité pédiatrique à l'EMA (Paediatric Drug Committee ou PDCO) ;
- ✓ Le développement d'un Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP) ;
- ✓ La mise en place d'un système basé sur des exigences, des incitations et des récompenses, comme la prolongation des droits de brevet.

De plus, le règlement pédiatrique assigne les agences nationales de santé et de sécurité sanitaire à promouvoir le développement d'un réseau européen d'investigation clinique dans le domaine pédiatrique (European Paediatric Network/ENPR-EMA) par le biais de financements communautaires et nationaux. L'ENPR-EMA facilitera les études en vue d'accroître la disponibilité des médicaments autorisés pour une utilisation dans la population pédiatrique. La création de deux bases de données sur les essais cliniques en pédiatrie (EUDRACT) et les médicaments autorisés pour les enfants en Europe (Eudrapharm) permettront d'améliorer la visibilité du public. Enfin, l'EMA publie régulièrement des guidelines afin d'assurer une bonne compréhension et application du règlement pédiatrique (EMA, multidisciplinary scientific guideline).

1.2.3.1 *Le Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP)*

Les PIP sont des documents décrivant l'ensemble des mesures pharmaceutiques, précliniques et cliniques à réaliser pour assurer la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments pédiatriques (dossier documentaire INSERM, 2010). Dorénavant, pour le développement d'un nouveau médicament, l'industriel devra élaborer un Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP) pour :

- ✓ Toute nouvelle AMM demandée ;
- ✓ Toute modification d'AMM initialement déposée pour l'adulte (nouvelle(s) indication(s), nouvelle(s) forme(s) pharmaceutique(s)) ;
- ✓ Les demandes de PUMA (Paediatric Use Marketing Authorization). Le PUMA s'applique aux médicaments déjà autorisés sur le marché pour les adultes et n'étant plus couverts par des droits de brevets ou ne bénéficiant plus de certificat complémentaire de protection.

Une ligne directrice décrivant le format et le contenu d'un dossier PIP a été publiée en 2008, dans le Journal Officiel de l'Union Européenne et a fait l'objet d'une révision en 2014 (European Commission, 2014/C338/01).

Lors d'un dépôt de PIP, les industries pharmaceutiques peuvent (ANSM):

- ✓ Soumettre un PIP détaillé ;
- ✓ Et/ou demander un report de ce plan dans le cas où les données ne sont pas suffisantes chez l'adulte en particulier en termes de sécurité d'emploi ;
- ✓ Et/ou demander une dérogation (« waiver »), si par exemple le médicament n'est ni sûr ni efficace pour la population, que la pathologie n'existe pas chez l'enfant ou encore que les bénéfices apportés par le traitement sont faibles par rapport aux alternatives thérapeutiques existantes.

Le PIP est évalué et doit être validé par le comité pédiatrique PDCO. L'autorisation d'AMM sera alors délivrée par l'autorité nationale de santé compétente en fonction de l'avis établi par le PDCO et de la conformité par rapport à la réglementation en vigueur. Dans le cas où le PIP est validé, le titulaire du brevet ou d'un certificat complémentaire de protection, se verra offrir une prolongation des droits de propriété intellectuelle de 6 mois ou, dans le cas d'un médicament orphelin, une extension supplémentaire de l'exclusivité commerciale de 2 ans.

1.2.3.2 *Le comité pédiatrique*

Le *Paediatric Drug Committee* (*PDCO*), créé dans le cadre du règlement n° 1901/2006, a rejoint les 5 comités présents au sein de l'EMA; à savoir : le comité des médicaments à usage humain (*CHMP*), le comité des médicaments à usage vétérinaire (*CVMP*), le comité des médicaments orphelins (*COMP*), le comité des médicaments à base de plantes (*HMPC*) et le comité des thérapies innovantes.

Le *PDCO*, composé d'experts, intervient pour les questions relatives au développement de médicaments destinés aux populations pédiatriques. Il est constitué de :

- ✓ Cinq membres du *CHMP* et leurs suppléants ;
- ✓ Un membre et un suppléant de chaque Etat membre ;
- ✓ Trois représentants d'associations de patients;
- ✓ Trois représentants des professionnels de santé.

Le *PDCO* se réunit tous les mois pour :

- ✓ Evaluer le contenu et la conformité des PIP à une demande ou une modification d'AMM ainsi que les éventuels délais et exemptions ;

- ✓ Etablir un suivi des PIP afin d'assurer la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament pédiatrique ;
- ✓ Dresser un inventaire relatif aux besoins en médicaments pédiatriques et le mettre à jour régulièrement (priority list of off-patent medicines);
- ✓ Conseiller les firmes pharmaceutiques avant le dépôt d'un dossier et le CHMP lors de la collecte des informations dans le cadre d'un dépôt de PIP.

En outre, le PDCO coordonne les activités correspondant à la mise au point d'un médicament pédiatrique et détermine les études nécessaires à mettre en place chez l'enfant.

1.2.4 **Bilan du règlement pédiatrique**

Tous les ans, le PDCO publie un rapport faisant état de l'évolution des paramètres relatifs au règlement pédiatrique. En 2012, un bilan des 5 premières années après la mise en vigueur de la règlementation a été dressé par l'EMA (EMA/428172/2012). Ce bilan fait état des principales réalisations et des failles relatives au règlement pédiatrique tout en proposant des recommandations pour permettre la validation des objectifs fixés. Le bilan de l'EMA ainsi que les rapports annuels du PDCO (EMA/795830/2015), permettent de suivre l'évolution des objectifs principaux du règlement pédiatrique.

Le règlement pédiatrique a été établi dans le but de ***« …faciliter le développement et l'accessibilité de médicaments à usage pédiatrique,… ».*** Les mesures relatives à ce point sont :

- Les dépôts et validation de conformité des PIP : De 2008 à 2012, plus de 600 PIP ont été approuvés par le PDCO. Cependant, très peu d'entre eux ont été complétés. Ainsi, seulement 33 PIP parmi tous les dossiers approuvés ont été achevés et ont conduit à l'approbation de nouveaux médicaments avec indication pédiatrique spécifique. Selon le rapport de l'EMA, en 2012, l'analyse de ces données était trop précoce car le cycle de développement dure environ une décennie et l'instrument règlementaire est trop récent pour pouvoir émettre des conclusions (European Commission, 2013). D'après le rapport 2015 du PDCO, 515 dossiers PIP ont été évalués. Parmi ces 515 PIP, 136 demandes ont été reçues pour de nouveaux PIP, 231 pour des modifications, 74 pour des dérogations complètes et 74 pour les contrôles de conformité. Des avis de conformités positifs ont été délivrés pour 17 de ces PIP permettant la validation de demandes d'AMM. La validation de la conformité de PIP est en nette augmentation depuis 2012 (Figure 2). Ainsi, depuis 2007, 103 PIP ont été jugés finalisés et

conformes à l'opinion du PDCO. Les prédictions établies dans le rapport de l'EMA sont en adéquation avec les résultats obtenus 9 ans après la mise en vigueur du règlement pédiatrique.

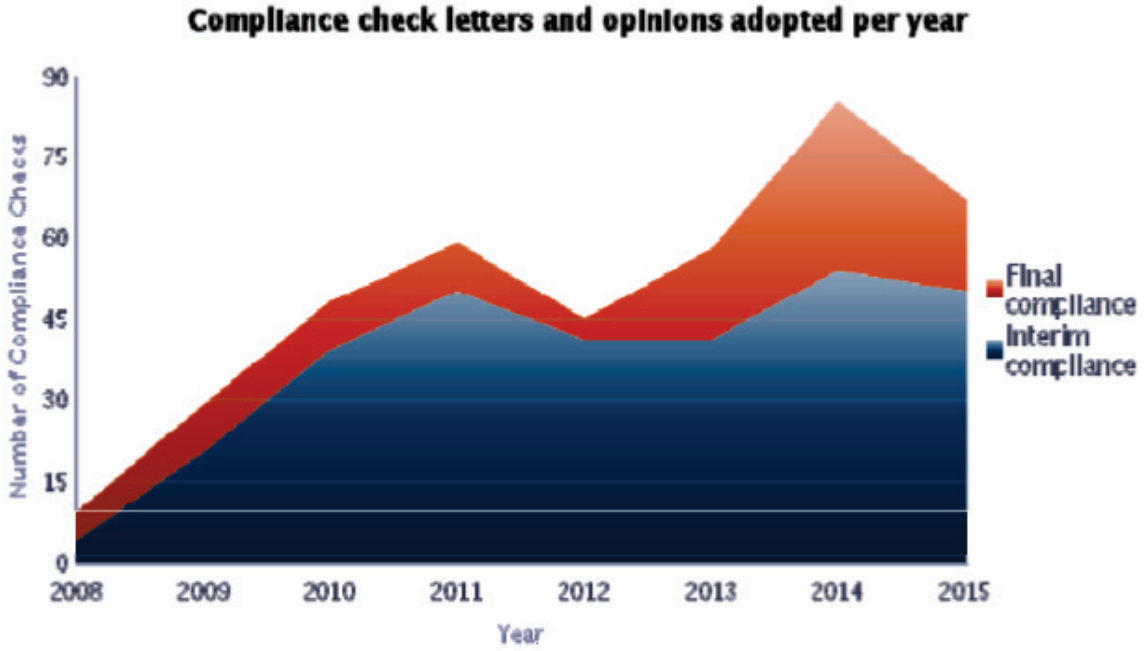


Figure 2 : Validation de la conformité des PIP par an (EMA/795830/2015).

- Les demandes de modifications: En 2012, le rapport de l'EMA souligne le nombre élevé de modifications aux PIP. Les chiffres semblent indiquer que quasiment tous les plans doivent être modifiés au moins une fois. Dans ce contexte, le niveau de détails requis par l'EMA a été critiqué à plusieurs reprises. En effet, ces nombreuses demandes de modifications peuvent témoigner du fait que la mise en œuvre du règlement est difficile et/ou que les autorités sont trop exigeantes (Académie nationale de pharmacie, 2012). Au cours des cinq dernières années, l'EMA et son comité pédiatrique ont fait des efforts pour assurer une certaine souplesse dans le plan afin de permettre une marge de manœuvre. Depuis 2007, le nombre de PIP modifiés par an par rapport au nombre total de dossiers soumis est en constante diminution (Figure 3). Les efforts de l'EMA pour simplifier la procédure des PIP, avec une réduction du niveau de détails, semble ainsi entraîner une diminution du nombre de modifications.

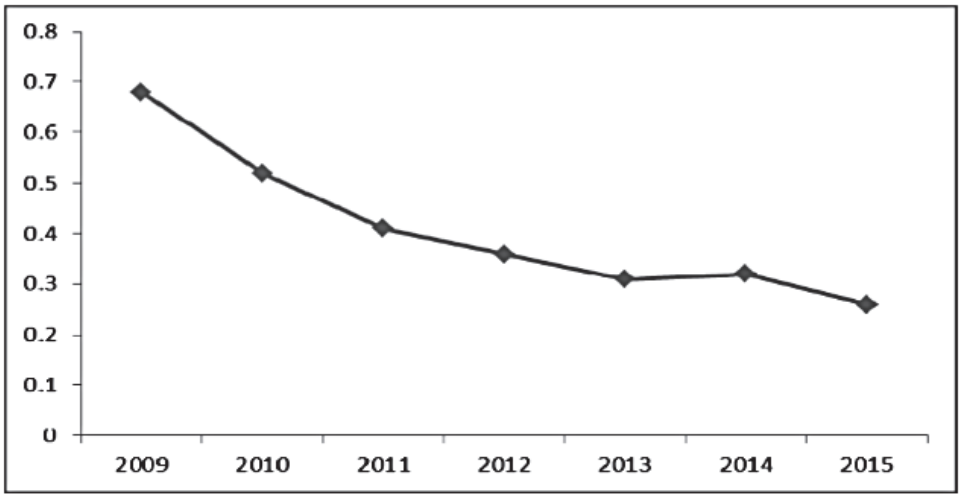


Figure 3 : Nombre de PIP modifiés en fonction du nombre de dossiers soumis par an (EMA/795830/2015).

- Les demandes de PUMA : Il n'y a eu qu'un seul dépôt de PIP soumis selon la procédure PUMA entre 2007 et 2012. Cette constatation, vue comme un échec, est expliquée par des opportunités de marché insuffisantes pour ces produits par rapport aux risques économiques inhérents au développement pharmaceutique. En effet, les entreprises semblent craindre que l'obtention d'une exclusivité du marché n'empêche pas les médecins de prescrire des produits concurrents hors AMM avec le même PA à moindre coût, ou encore qu'il y ait une substitution du traitement en pharmacie avec la forme adulte vendue à moindre coût. La tarification et le remboursement des PUMA ne seraient pas assez avantageux pour que les firmes pharmaceutiques investissent dans le développement de ces vieux médicaments, malgré les mesures d'encouragements mises en jeux (protection de 10 ans) (European Commission, 2013). Ainsi, la difficulté de mise en œuvre du règlement et les règles de remboursement peu attractives ont conduit à un échec du concept PUMA. L'Académie Nationale de Pharmacie recommandait de faciliter l'obtention d'une AMM pour de vieux médicaments. Entre 2012 et 2015, un seul PUMA a été adopté en 2014. Ce PUMA a été obtenu par les laboratoires Pierre Fabre pour l'Hemangiol® prescrit dans le traitement des hémangiomes infantiles prolifératifs (EMA/795830/2015). Au final, deux PUMA ont été acceptés depuis la mise en vigueur du Règlement. L'application de ce type de procédure est à revoir par l'EMA en assouplissant l'usage du règlement Européen et/ou en proposant de nouvelles mesures d'encouragements (Académie Nationale de Pharmacie, 2012).

De plus, la réglementation pédiatrique vise à « ***…, assurer que ces médicaments fassent l'objet de recherches éthiques d'une grande qualité et qu'ils soient dûment autorisés en vue d'un usage en pédiatrie, et enfin d'améliorer les informations disponibles sur l'usage de médicaments au sein des diverses populations pédiatriques,*** », avec :

- Le réseau européen d'investigation clinique dans le domaine pédiatrique : Dès la mise en place du règlement pédiatrique à 2015, l'ENPR-EMA a agrandi son réseau de spécialités au nombre de 46 (EMA/795830/2015) dans divers domaines thérapeutiques. Le développement du réseau de spécialistes dans le domaine clinique permet d'assurer la mise en place de recherches éthiques et de grandes qualités.

- L'autorisation des essais cliniques chez l'enfant dans l'Union Européenne : Le nombre d'essais cliniques chez l'enfant, recensés sur la base de données EudraCT, a particulièrement augmenté ces deux dernières années, et ce, dans toutes les catégories d'âges pédiatriques. Cette augmentation soudaine est, en partie, expliquée par l'amélioration de la base de données en octobre 2013 et la finalisation de la programmation en juillet 2014 (EMA/795830/2015). Fin 2015, les résultats connexes ont été téléchargés sur la base de données EudraCT pour plus d'un millier d'essais pédiatriques. Le ratio du nombre d'essais cliniques chez l'enfant par rapport au nombre total d'essais cliniques montre que la recherche clinique pédiatrique se développe depuis la mise en vigueur du règlement pédiatrique (Figure 4).

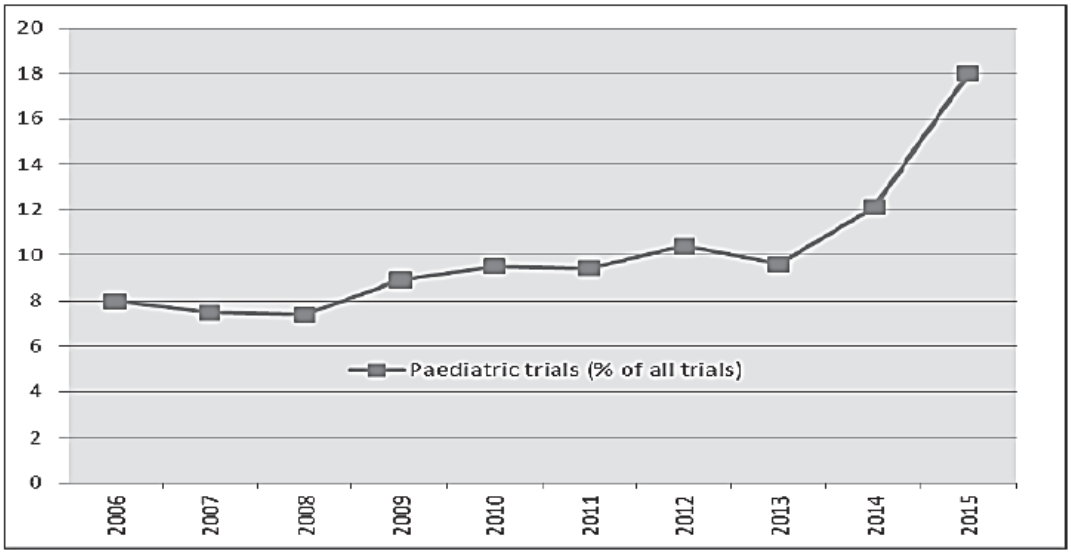


Figure 4 : Proportion des essais cliniques chez l'enfant par rapport à tous les essais réalisés (EMA/795830/2015).

- La récolte de l'information existante : dans le cadre des articles 45 et 46, les autorités compétentes ont reçu plus de 18 000 études apportant des informations pédiatriques de la part des laboratoires pharmaceutiques. Les autorités ne s'attendaient pas à recevoir tant de données pédiatriques ayant été recueillies avant la mise en vigueur de la règlementation, ils appellent cela « les trésors cachés » du règlement (European Commission, 2013). Ils ont ainsi permis d'améliorer le RCP concernant la pédiatrie de 65 médicaments (Académie Nationale de Pharmacie, 2012).

Enfin, ***« (…). Il importe d'atteindre ces objectifs (…) sans retarder l'autorisation de médicaments destinés à d'autres tranches d'âges de la population. ».*** Le bilan montre que :

- Aucuns effets négatifs n'ont été constatés sur le développement de médicaments adultes : L'obligation de fournir un PIP pour toute demande ou modification d'AMM présentait un risque de retarder le développement de médicaments adultes. Dans ce contexte, le règlement a prévu d'octroyer des reports liés à l'initiation ou l'achèvement d'une partie ou de l'ensemble des mesures contenues dans un PIP. L'instrument de report est largement utilisé ce qui suggère que le risque de retards dans le traitement des demandes adultes est minime (European Commission, 2013).

D'une manière générale, les données scientifiques recensées dans le cadre des rapports établis par le PDCO montrent que la mise en œuvre du règlement pédiatrique est une réussite. En effet, il a permis de favoriser le développement de médicaments pédiatriques et les essais cliniques chez l'enfant tout en améliorant les informations disponibles.

1.3 Formulation pédiatrique orale

1.3.1 **Choix d'une forme pédiatrique orale**

L'utilisation de formes galéniques orales inadaptées à la population pédiatrique est très répandue. Les professionnels de santé et les parents sont souvent amenés à manipuler un médicament destinés à l'adulte pour obtenir une dose appropriée pour l'enfant; comme par exemple diviser un comprimé en deux pour obtenir une dose plus faible ou encore ouvrir une gélule et dispersé le contenu dans un volume de liquide donné. De telles manipulations augmentent la variabilité de la dose du produit par des mesures inexactes, des problèmes de stabilité ou des erreurs dans les instructions de manipulation (EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev. 2). Des listes de médicaments prioritaires ont été

dressées car il y un réel besoin de développer des médicaments sous une forme galénique adaptée à la population pédiatrique (WHO, 2013 ; EMA/98717/2012).

Le règlement pédiatrique vise à faciliter le développement et l'accessibilité des médicaments pédiatriques appropriés à l'âge ; le point critique étant de veiller à ce que les enfants du groupe d'âge ciblé aient accès au traitement avec un rapport bénéfice/risque positif. Ainsi, le développement de médicaments pédiatriques nécessite une compréhension des différences physiologiques et biochimiques entre les enfants et les adultes (Cf partie 1.1 Spécificité de la population pédiatrique) mais aussi une compréhension des préférences et des capacités de chacun dans l'acceptabilité des diverses formes galéniques. Le médicament doit apporter une qualité constante, assurer l'observance du traitement et ne pas être un fardeau pour le patient et/ou les aidants (professionnels de santé, parents, professeurs,…) (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005). L'acceptabilité et la préférence parmi les différentes formes de dosage varient selon la catégorie d'âge. Les principaux paramètres à prendre en considération lors du choix de la forme galénique sont l'âge, la pathologie (aigüe ou chronique), la capacité à ingérer, la facilité d'administration par les aidants, les comportements liés à l'adolescence, les handicaps physiques ou mentaux et la culture de l'enfant. Ainsi, la forme galénique idéale pour la population pédiatrique doit (EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev. 2):

- ✓ Assurer une fréquence de dosage minimale ;
- ✓ Proposer une forme de dosage unique ou une gamme complète ;
- ✓ Avoir un impact minimal sur le mode de vie de l'enfant;
- ✓ Assurer une utilisation minimale d'excipients non toxiques ;
- ✓ Assurer une utilisation pratique, facile et une administration fiable ;
- ✓ Assurer une production simple à un coût minime ;
- ✓ Assurer une stabilité de la forme ;
- ✓ Assurer une viabilité commerciale.

Il existe 17 formes galéniques orales disponibles pour la population pédiatrique. Elles peuvent être prêtes à l'emploi (solution, sirop, comprimés) ou nécessiter une manipulation (poudre pour suspension, solution concentrée à diluer, comprimé effervescent,…) (Strickley *et al.*, 2008). L'un des intérêts générés par le règlement pédiatrique est le développement de nouvelles formes galéniques et de nouveaux dispositifs permettant d'améliorer l'acceptabilité

et l'applicabilité d'un traitement à l'enfant. Plusieurs revues et documents font état des formes galéniques ciblées pour la population pédiatrique selon les voies d'administration (Batchelor and Mariott, 2015; Strickley *et al.*, 2008) et la catégorie d'âge (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005 ; Sam *et al.*, 2012). Dans un rapport, l'EMA propose une matrice permettant d'identifier la formulation galénique la mieux adaptée à l'âge de l'enfant selon les critères d'acceptabilité et d'applicabilité. Cette matrice permet de donner des notions générales d'acceptabilité en attribuant des notes de 1 à 5 (Tableau 3), de la forme la moins adaptée à la plus adaptée.

Tableau 3 : Système de notation des formulations pédiatriques (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005).

Note	Prématurés-nourrissons	Enfants de 2 à 18 ans
1	Forme non appropriée	Forme non acceptée
2	Forme appropriée mais des problèmes peuvent survenir durant l'administration	Forme acceptée sous réserve
3	Forme probablement appropriée mais pas en 1ère attention	Forme acceptée
4	Forme appropriée	Forme appréciée
5	Forme appropriée et adaptée à l'enfant	Forme de choix

Par exemple, les formes orales solides ne seront pas adaptées aux enfants de moins de deux ans pour des raisons physiques (difficulté à avaler, risques de fausse route). Alors que pour les plus âgés, la plupart des formes galéniques étant administrable, le choix de la forme galénique la mieux adaptée se fera selon la préférence de l'enfant. Dans le Tableau 4 sont uniquement présentées les notes concernant les formes galéniques orales.

Tableau 4 : Matrice identifiant les formes galéniques orales les mieux acceptées et adaptées à la population pédiatrique selon la catégorie d'âge (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005).

Forme galénique	Prématurés	Nouveau-nés (0-28 jours)	Nourrissons (1 mois-2 ans)	Enfants périscolaire (2-5 ans)	Enfants scolarisés (de 6-11 ans)	Adolescents (12-16/18 ans)
Solution/ Gouttes	2	4	5	5	4	4
Emulsion/ Suspension	2	3	4	5	4	4
Formes Effervescentes	2	4	5	5	4	4
Poudre/ Microgranule	1	2	2	4	4	5
Comprimé	1	1	1	3	4	5
Gélule	1	1	1	2	4	5
Formes Oro-dispersibles	1	2	3	4	5	5
Gomme à mâcher	1	1	1	3	5	5

Ce tableau montre que des efforts sont à fournir, d'un point de vue galénique, pour améliorer l'acceptabilité et l'applicabilité des formes orales, en particulier pour les jeunes enfants (des prématurés aux nourrissons). En effet, aucune forme galénique orale n'est appropriée pour les prématurés. Concernant les enfants de 0 à 2 ans, seules des formes orales liquides sont appropriées, avec la possibilité d'utiliser des formes orodispersibles. Ce n'est qu'à partir de 2 ans, que des formes solides peuvent être adaptées et appréciées (formes orodispersibles et poudre/microgranules).

Un médicament administré par voie orale est destiné à être avalé et pourra être absorbé (action générale) ou non (action locale) par les muqueuses digestives. L'absorption digestive peut se faire à tous les niveaux du tractus gastro-intestinal : bouche, estomac, intestin et rectum. Il existe une large gamme de formes galéniques orales, disponibles à l'état liquide (solution, sirop, suspension) et solide (comprimés, dont les formes effervescentes et orodispersibles, gommes à mâcher). Ainsi, cette voie est extrêmement utilisée pour l'administration de médicaments pédiatriques. Néanmoins, les formes orales conventionnelles ne sont pas toujours bien adaptées et acceptées par les enfants. L'innovation des formes galéniques orales peut être réalisée sur :

- ✓ Les formes liquides par la mise au point de dispositifs médicaux facilitant l'administration du médicament par les aidants et améliorant l'observance du traitement (Walsh *et al.*, 2011);
- ✓ Les formes solides par le développement de nouvelles formes galéniques (orodispersibles, gommes à mâcher, formes multiparticulaires, …). En effet, elles permettent d'améliorer l'acceptabilité et l'applicabilité du traitement par rapport aux formes conventionnelles (comprimé, gélule).

1.3.2 **Formes orales solides innovantes**

En raison d'une faible flexibilité de la dose et du besoin d'être avalées, les formes orales solides conventionnelles (comprimés, gélules) ne sont pas adaptées à l'enfant de moins de 6 ans. Cependant, les formes solides assurent une bonne stabilité du médicament et les procédés de fabrication sont bien établis facilitant ainsi la chaîne d'approvisionnement et le maintien d'un faible coût de fabrication. En 2008, des experts de l'OMS (WHO, 2008) ont publié un rapport dans lequel ils recommandent l'utilisation de formes orales solides souples pour la population pédiatrique, telles que les formes orodispersibles ou des formules à reconstituer pour obtenir des préparations orales liquides. Le développement de ces formules représente un intérêt pour les industries pharmaceutiques. Pour améliorer l'acceptabilité et la sécurité, de nouvelles formes ont été développées : les systèmes d'administration multiparticulaires, orodispersibles, à mâcher et à sucer (Tableau 5) (Lopez *et al.*, 2015).

1.3.2.1 *Systèmes d'administration multiparticulaires*

Les systèmes d'administration multiparticulaires sont caractérisés par une multitude de petites unités. Ils regroupent les mini-comprimés (Van Riet-Nales *et al.*, 2015), les granulés et les granules (Hoang Thi *et al.*, 2015). Grâce à leur taille réduite (diamètre moyen = 2,5mm), ces systèmes peuvent être facilement avalés par les jeunes enfants (2 à 6 ans), sans risque de fausse route. De plus, chaque unité contient une faible quantité de PA permettant un ajustement plus aisé de la dose. Les systèmes multiparticulaires peuvent être administrés directement dans la bouche ou dispersés dans un véhicule tel que l'eau, le lait ou encore des compotes. Ils peuvent se présenter sous différents conditionnements, que ce soit sous forme de dose unique (sachet individuel) ou multi-doses avec l'utilisation de dispositifs de dosage (Figure 5) tels que la paille administrant des granules (Xstraw®, Harro Högliger, Allemagne) et la cuillère pré remplie (Walsh *et al.*, 2011) . Enfin, ces systèmes peuvent être constitués de plusieurs unités offrant la possibilité de combiner différentes caractéristiques de libération

dans la même forme galénique. Cela permettra ainsi de contrôler la libération du PA et d'assurer une meilleure biodisponibilité tout en évitant les risques de surdosage. Le principal désavantage des systèmes multiparticulaires est qu'ils ne sont pas prêts à être utilisés directement. Ils nécessitent d'être reconstitués et administrés en présence de liquide ou d'aliment pouvant alors entraîner une altération de la biodisponibilité et une mauvaise gestion de la dose. Ou bien, ils requièrent l'usage d'équipement ou dispositif spécifiques devant assurer un dosage précis tout en étant rentable (Lopez *et al.*, 2015).

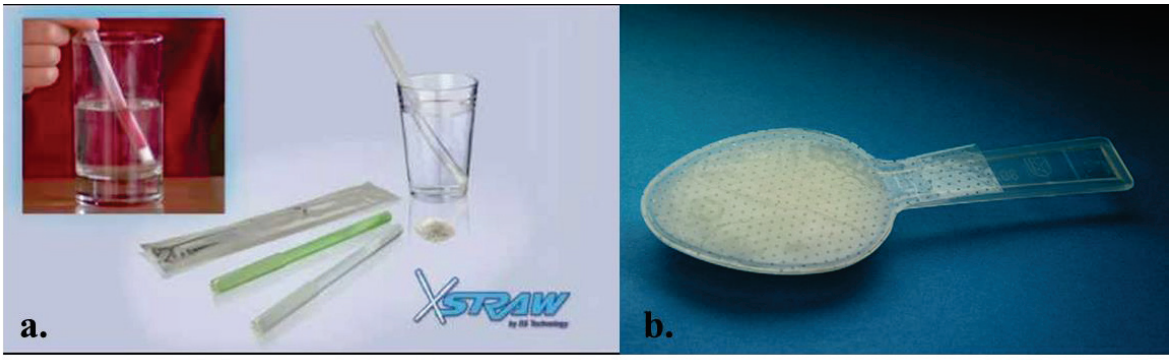


Figure 5 : Dispositifs de dosage pour l'administration de systèmes multiparticulaires : a. Paille pour l'administration de granules (Xstraw®, Harro Högliger, Allemagne) et b. Cuillère pré-remplie (Walsh *et al.*., 2011)

1.3.2.2 *Systèmes d'administration orodispersibles*

Les systèmes d'administration orodispersibles (Slavkova and Breikreutz, 2015) offrent la particularité de se désintégrer rapidement dans la cavité buccale en formant une solution ou une suspension de médicament sous l'action de la salive. Le PA sera alors dégluti progressivement. On peut les rencontrer sous plusieurs formes telles que les lyophilisats oraux, les pastilles, les granules, les comprimés orodispersibles, les mini-comprimés orodispersibles ou encore les films orodispersibles (Figure 6). Selon la formulation, le PA libéré dans la cavité buccale pourra avoir une action locale ou systémique en étant absorbé à travers la muqueuse buccale ou la paroi intestinale. Lors de la dernière décennie, de nombreuses recherches se sont concentrées sur le développement de comprimés orodispersibles (ODT pour Oro-Dispersible Tablets) et de films orodispersibles (ODF pour Oro-Dispersible Films) car ils sont pratiques à utiliser, faciles à avaler, ne nécessitent pas l'utilisation d'eau et sont préférés aux formes conventionnelles. Ils améliorent ainsi l'acceptabilité du traitement. Pour les enfants, les mini-comprimés orodispersibles

(Stoltenberg and Breikreutz, 2011) sont les plus adaptés car ils offrent plus de sécurité et une meilleure flexibilité de la dose comparés aux ODT classiques. De plus, ces formes peuvent permettre d'améliorer la biodisponibilité du PA grâce à une absorption buccale. Cependant, ces nouvelles formes galéniques présentent certaines limites comme indiquées dans le Tableau 5. Par exemple, le contrôle de la libération et le masquage du goût du PA, représentent un challenge car la formule se désintègre dans la cavité buccale directement au contact des papilles gustatives. Une autre limite rencontrée, avec les films et les comprimés orodispersibles, est la possibilité d'incorporer seulement une faible dose de PA.



Figure 6 : Systèmes d'administration orodispersibles.

1.3.2.3 *Systèmes d'administration à mâcher et à sucer*

Les systèmes d'administration à mâcher, sucer et croquer (Figure 7) sont conçus pour être traités mécaniquement dans la bouche pour faciliter la désintégration de la forme et la dissolution du PA. La désintégration et dissolution du PA sera permise par la mastication (gomme à mâcher) ou par succion (pastilles, comprimés à sucer) de la forme. Ces systèmes ne nécessitent pas l'utilisation d'eau et permettent de faciliter la déglutition, dans le cas des comprimés à sucer, ou de l'éviter, dans le cas des gommes à mâcher. Une étude a montré que les gommes à mâcher étaient bien acceptées, tolérées et n'entrainaient pas de complications pour des enfants de 5 à 18 ans (López-Jaimez and Cuello-García, 2016). Concernant les formes à sucer, ces dernières seraient sûres et bien tolérées dès l'âge de 2 ans, néanmoins, elles ne permettent pas une bonne flexibilité de la dose. De plus, ces formules sont destinées à rester dans la cavité buccale un certain temps, ainsi, le goût et la sensation en bouche sont des paramètres très importants. Or, la technique habituelle de pelliculage, pour masquer le goût des comprimés, n'est pas appropriée pour ces formes car elles subissent des contraintes mécaniques. De la même façon, la mise au point de systèmes à libération prolongée est un

challenge pour ces formes galéniques. Enfin, la biodisponibilité du PA et donc l'effet thérapeutique pourront être altérés en fonction de la capacité de succion ou de mastication (Lopez *et al.*, 2015).



Figure 7 : Systèmes d'administration à mâcher, sucer et croquer pour les enfants.

L'ensemble des avantages et inconvénients de ces nouvelles formes orales solides pour l'administration pédiatrique est résumé dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Avantages et inconvénients des nouvelles formes orales solides (Lopez *et al.*, 2015).

Avantages	Inconvénients
Systèmes multi particulaires	
Très bonne flexibilité de la dose Taille réduite aidant à la déglutition Administration flexible Facile à fonctionnaliser Masquage du goût possible Biodisponibilité au niveau du tractus gastro-intestinal très reproductible Possibilité d'obtenir une libération ciblée Excipients utilisés sûrs (GRAS) Procédés de fabrication disponibles	Aspect granuleux et sensation en bouche peuvant être un frein Nécessite une préparation/reconstitution Biodisponibilité pouvant être altérée par la co-administration avec nourriture/boisson Compatibilité nourriture-médicament devant être étudiée Contrôle limité de la dose administrée lorsque le médicament est mélangé avec la nourriture Requière l'utilisation d'équipements ou dispositifs spécifiques Requière le développement de technologie assurant le stockage et la distribution de la dose
Systèmes orodispersibles	
Flexibilité de la dose très bonne (**ODF**) Ne nécessite pas l'utilisation d'eau Ne nécessite pas d'être avalé Administration flexible Préféré aux formes conventionnelles Biodisponibilité pouvant être augmentée par l'absorption buccale Procédé de fabrication en continu pouvant être mis en place (**ODF**)	Requière plusieurs formes posologiques (**ODT**) Manque de résistance mécanique (**ODT**) Contrôle de la libération difficile à obtenir Masquage du goût difficile à obtenir Packaging et conditions de stockage devant être contrôlés Temps de rétention dans la bouche pouvant altérer la biodisponibilité Nécessite l'utilisation d'excipients de sécurité inconnus Ne peut pas contenir des quantités élevées en PA Technologie soumise à la propriété intellectuelle
Systèmes à mâcher et à sucer	
Ne nécessite pas l'utilisation d'eau Ne nécessite pas d'être avalé Préféré aux formes conventionnelles Biodisponibilité pouvant être améliorée grâce à : ✓ une désintégration et une dissolution rapide ✓ une absorption buccale Procédés de fabrication disponibles	Requière plusieurs formes posologiques Contrôle de la libération difficile à évaluer Masquage du goût difficile à évaluer Capacité de mastication pouvant altérer la biodisponibilité Nécessite l'utilisation d'excipients dont la sécurité n'a pas été démontrée Temps de rétention dans la bouche pouvant altérer la biodisponibilité Risque de surdosage Utilisation de dispositifs spécifiques pouvant être requise

1.3.3 **Excipients à effets notoires**

Historiquement, les excipients sont définis comme des substances inactives utilisées pour la mise en forme d'un PA en vue de faciliter son administration, sa conservation et son transport jusqu'au site d'absorption. Ils peuvent remplir divers rôles, tels que : solvant, diluant, agent conservateur, édulcorant, colorant ou encore agent désintégrant... Récemment, le terme d'excipient a été défini par la FDA comme « tout dans la formulation, sauf le PA ». En effet, ces substances ne sont pas totalement inactives et sont parfois associées à des problèmes de toxicité spécifique, réaction allergique et intolérance (Fabiano *et al.*, 2011). De plus, les excipients suivent les mêmes principes pharmacocinétiques que les PA et ne vont pas être ainsi soumis au même schéma ADME que chez l'adulte (Loftsson, 2015). De ce fait, l'utilisation de certains excipients dans les médicaments adultes ne sera pas appropriée pour la population pédiatrique.

La sélection d'excipients pour les médicaments pédiatriques est difficile car les listes établies par la FDA et la Commission Européenne, ainsi que les lignes directrices sur l'utilisation des excipients ne sont pas spécifiques à la pédiatrie. Ainsi, une collaboration entre les Etats-Unis et l'Union Européenne (Paediatric Formulation Initiative-PFI) a donné lieu à la création d'une base de données dénommée : *« Safety and Toxicity of Excipients for Paediatrics* »(STEP) (Salunke *et al.*, 2013). Son objectif est de promouvoir la collecte de données sur la toxicité et la tolérance des excipients utilisés à des fins pédiatriques. Cette base de données permettra alors de faciliter le choix des excipients lors de la formulation et d'informer les professionnels de santé sur d'éventuels risques. A ce jour, la base de données a permis d'accumuler des informations sur 39 excipients (http://www.eupfi.org/step-database-info/). Les membres du PFI ont dressé une liste des excipients pour lesquels des informations sont à apporter en priorité. Celle-ci concerne : le sorbitol, l'alcool benzylique, le polysorbate 80, le chlorure de benzalkonium, l'aspartame, les parabènes, l'éthanol, le propylène glycol, le benzoate de sodium et l'acide benzoïque. Certains excipients et leurs effets notoires sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Exemple d'excipients et leurs effets notoires issus de la liste prioritaire dressée par les membres du PFI.

Excipent	Effet notoire
Alcool benzylique (Committee on Drugs, 1997; Ivanovska *et al.*, 2014).	Neurotoxique, acidose métabolique.
Polysorbate 80 (Ivanovska *et al.*, 2014)	Insuffisance hépatique et rénale.
Chlorure de Benzalkonium (Committee on Drugs, 1997)	Irritant, réactions cutanées, problèmes respiratoires
Ethanol (Ivanovska *et al.*, 2014)	Neurotoxique, problèmes cardiovasculaires
Propylène Glycol (Ivanovska *et al.*, 2014)	Neurotoxique, problèmes cardiovasculaires, problèmes respiratoires
Acide benzoïque (Committee on Drugs, 1997)	Irritant, risque d'ictère chez le nouveau-né

1.4 Palatabilité et masquage du goût

La palatabilité est définie comme l'appréciation globale d'un médicament par des propriétés organoleptiques telles que l'odeur, le goût, l'arrière-goût et la texture. La sensation gustative provient de la stimulation des cellules spécialisées (récepteurs de goût) réparties dans la cavité buccale. Les récepteurs sensoriels deviennent matures entre la 13ème et la 15ème semaine de gestation, ainsi, l'enfant perçoit le goût dès la naissance (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005). Les PA ont généralement une saveur désagréable qu'il va falloir diminuer pour assurer l'acceptabilité d'un médicament pédiatrique. En effet, une enquête réalisée auprès de 800 pédiatres a montré que le goût désagréable d'un médicament est un obstacle majeur à l'observance du traitement pour des patients souffrant d'une maladie aigüe (90,8%) ou chronique (83,9%) (Walsh *et al.*, 2014).

L'intégration du message sensoriel débute avec la détection de la saveur par les récepteurs du goût. L'information gustative est ensuite traduite et transmise en signaux électriques pour être intégrée jusqu'au cerveau. Dans le domaine pharmaceutique, deux stratégies sont utilisées pour masquer le goût :

- ✓ Dissimuler la saveur par l'utilisation d'édulcorants et d'arômes ;

- ✓ Empêcher les récepteurs gustatifs d'interagir avec le PA dissous (bloqueurs d'amertume, barrière physique ou chimique, modification de la solubilité) ou bloquer le mécanisme de transduction du goût (modificateur de saveur).

1.4.1 Stratégies de masquage du goût

1.4.1.1 *Dissimuler la saveur*

Les arômes et/ou édulcorants sont incorporés dans les formulations pharmaceutiques afin de dissimuler la saveur indésirable du PA. Cette approche est la plus intuitive mais ne permet pas toujours de masquer le goût, en particulier lorsque le PA est très soluble et présente une amertume prononcée (Ernest *et al.*, 2007).

Les édulcorants

Les édulcorants sont des substances qui possèdent une saveur sucrée. Il existe trois types d'édulcorants sur le marché, possédant des caractéristiques différentes comme indiqué dans le Tableau 7 : les édulcorants naturels, les édulcorants de charge ou de masse (polyols) et les édulcorants synthétiques (Clarisse *et al.*, 2009). Une consommation importante d'édulcorants naturels entraîne le développement de carries et accroit le risque de surcharge pondérale du fait de leur index glycémique souvent élevé. Pour pallier ces problèmes, des édulcorants non cariogènes (édulcorants de charge) et des édulcorants dépourvus d'apport calorique (édulcorants de synthèse) ont été développés.

Tableau 7 : Caractéristiques des édulcorants naturels, de charge et de synthèse (Clarisse *et al.*, 2009).

	Pouvoir sucrant	Calorie (cal/g)	Modification Glycémie
Edulcorants naturels			
Saccharose	1	4	Augmente
Glucose	0,7	4	Augmente
Fructose	1,5	4	Peu
Edulcorants de charge ou de masse			
Mannitol	0,7	4	Peu
Sorbitol	2	4	Peu
Xylitol	2	4	Peu
Edulcorants de synthèse			
Saccharine	300	0	Aucune
Cyclamate	30 à 40	0	Aucune
Aspartame	200	0	Aucune

Les enfants perçoivent très tôt le goût sucré et sont capable de le reconnaître dans des mélanges et d'estimer son intensité. Ils semblent préférer des niveaux en sucre plus intenses que les adultes. De plus, entre 4 et 12 ans, les filles semblent plus sensibles à la saveur sucrée que les garçons (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005).

Les arômes

Les arômes peuvent être d'origine naturelle ou artificielle. L'avantage des arômes naturels est qu'ils procurent une bonne palatabilité ; tandis que les arômes synthétiques sont plus simple à caractériser et chimiquement plus stables ce qui diminue la variabilité entre les lots et les risques de changements de goût au cours du temps. Les arômes sont des mélanges souvent complexes et de composition exacte inconnue compliquant l'évaluation de la compatibilité avec les autres composants de la formulation. En 2012, la Commission Européenne a adopté deux lois permettant de clarifier et harmoniser l'utilisation des arômes (Règlement d'exécution (UE) n° 872/2012 ; Règlement (UE) n° 873/2012). Ces règlements procurent une liste de plus de 2100 substances autorisées.

La capacité des enfants à reconnaître et différencier les saveurs dans un mélange est limitée par rapport à l'adulte car leur compétence d'analyse et de perception sont moindres. Elles vont s'acquérir durant l'enfance et l'adolescence. De plus, ces capacités peuvent être affectées par la concentration en arôme et l'apparence de la préparation. Pour la population pédiatrique, il est plus judicieux d'utiliser des arômes habituels et d'éviter les mélanges afin d'augmenter la probabilité d'acceptation d'un médicament pédiatrique (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005). Généralement, la saveur à masquer et l'indication thérapeutique déterminent le choix du ou des arômes à utiliser (Tableau 8). Cependant d'autres facteurs peuvent influencer les préférences gustatives chez l'enfant telles que les habitudes alimentaires et les influences culturelles.

Tableau 8 : Arômes de choix en fonction de la saveur de base du PA et de l'indication thérapeutique (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005).

Saveur de base	**Arômes**
Acide	Cerise, citron, citron vert, mandarine, orange, fraise
Alcaline	Banane, caramel, cerise, réglisse, fruit de la passion, pêche
Amère	Cerise, chocolat, pamplemousse, réglisse, pêche, framboise, tutti-frutti
Salée	Caramel, pamplemousse, citron, orange, vanille
Sucrée	Banane, caramel, chocolat, raisin, vanille
Indication Thérapeutique	**Arômes**
Douleur, fièvre, allergie, antibiotiques	Cerise, fraise, banane, caramel
Vitamines	Cassis, citron, citron vert, mandarine, orange
Digestion	Citron, citron vert, orange, menthe poivrée

1.4.1.2 *Empêcher les interactions entre les récepteurs sensoriels et le PA dissous*

La modification de la solubilité du PA peut être une approche intéressante pour masquer le goût des PA. En effet, la saveur ne peut être ressentie par les récepteurs gustatifs que si le composé est à l'état dissous. Ainsi, le simple fait d'avoir une suspension au lieu d'une solution, pourra avoir comme effet le masquage du goût car les particules ne pourront pas se lier aux récepteurs. Pour se faire, le PA peut être maintenu à l'état solide ou sous sa forme non-ionisée à l'aide d'un système tampon. Pour conserver le PA à l'état solide et réduire sa solubilité, il peut être utilisé sous forme de sel, co-cristal ou polymorphe. Cependant, apporter des modifications au PA, change ses propriétés physicochimiques et peut ainsi avoir une influence sur ses propriétés pharmacocinétiques et sa biodisponibilité. De plus, la morphologie du PA peut aussi changer et modifier les sensations en bouche du médicament. Enfin, cette stratégie ne sera pas efficace pour les PA avec un seuil de goût très faible qui sera détectable malgré la faible partie de médicament solubilisée (Walsh *et al.*, 2014).

Les bloqueurs d'amertume et modificateurs de saveur (Walsh *et al.*, 2014). Une approche assez intuitive est d'agir directement sur l'intégration du message sensoriel pour empêcher la perception du goût. Pour cela, l'utilisation des bloqueurs d'amertume permettra d'interférer biochimiquement avec les récepteurs sensoriels ; tandis que l'utilisation des modificateurs de saveur bloquera le mécanisme de transduction de l'information gustative. Dans la cavité buccale, il existe 25 récepteurs gustatifs. L'inhibition de l'amertume au niveau des récepteurs sensoriels ne pourra se faire que si le bloqueur d'amertume se lie exactement sur le même

récepteur que la molécule de PA. L'utilisation de cette approche est empirique car les mécanismes de blocage ne sont pas encore totalement compris. De plus, l'innocuité et la toxicité de ces agents bloquants sont peu connues et la réglementation limite leur utilisation dans les produits pharmaceutiques.

Protection du PA par une barrière physique ou chimique. Afin d'empêcher le PA d'interagir avec les récepteurs gustatifs, la création d'une barrière physique (enrobage) ou chimique (par complexation) autour du PA est une approche intéressante.

- ✓ **L'enrobage** est la technique la plus courante pour le masquage du goût. Il consiste à recouvrir, les particules de PA ou la forme galénique, d'une barrière physique. L'enrobage peut se fait à partir de polymères (hydrophile ou hydrophobe), de lipides et d'édulcorants. Ces agents d'enrobages peuvent être utilisés seuls ou en association, en mono ou multicouches pour atteindre le masquage du goût souhaité (Ayenew *et al.*, 2009). L'enrobage est particulièrement employé dans les systèmes d'administration multi particulaires (Walsh *et al.*, 2014 ; Joshi and Petereit, 2013 ; Hoang Thi *et al.*, 2012).

La formation d'une barrière chimique est générée par la complexation du PA soit avec des cyclodextrines soit avec des résines échangeuses d'ions.

- ✓ **Les cyclodextrines** (CD) sont des oligosaccharides macrocycliques composés généralement de 6, 7 ou 8 unités glycosidiques pour l'α-CD, l'β-CD et l'γ-CD, respectivement. Elles sont caractérisées par une cavité non polaire et une surface hydrophile. Les fonctions hydroxyles de ces molécules sont orientées vers l'extérieur du cône alors que la cavité centrale est bordée par les carbones du squelette et les ponts osidiques des résidus de glucose, lui conférant un caractère lipophile. En raison de sa forme et sa structure moléculaire, la cyclodextrine présente la capacité unique de piéger une molécule hôte à l'intérieur de sa cavité et d'agir comme un récipient moléculaire. Les CD peuvent interagirent avec des molécules de taille appropriée formant alors des complexes d'inclusion. Les caractéristiques des CD ainsi que le mécanisme de complexation seront développés plus en détail ultérieurement dans le chapitre 3.2. L'efficacité des CD pour masquer le goût dépend du type et des propriétés du PA, du type de CD, de la forme galénique et de sa composition. Des interactions entre les CD et d'autres excipients pourront modifier l'équilibre de complexation CD-PA et de ce fait, pourront impacter le masquage du goût. De plus,

les CD peuvent améliorer la solubilité du PA et avoir un impact sur la pharmacocinétique et la biodisponibilité du médicament. Enfin, cette stratégie de masquage du goût peut parfois *impliquer* des ratios élevés en CD et donc être difficilement applicable lorsque des doses élevées en PA sont requises (Walsh *et al.*, 2014). Cependant, il existe de nombreux exemples sur le développement de médicaments impliquant l'utilisation de CD pour masquer le goût des PA (Szejtli and Szente, 2005) dans les comprimés (Stroppolo *et al.*, 2001), les ODF (Preis *et al.*, 2012), ou encore les suspensions (Shah and Mashru, 2008).

- ✓ **Les résines échangeuses d'ions** (REI) sont des polymères anioniques ou cationiques, insolubles dans l'eau. Quelques exemples de complexes REI-PA sont donnés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Exemples de complexes REI-PA.

Résine			**PA**
Nom	Fonctionnalité	Polymère	
Amberlite IRP 69	Acide (SO^{3-})	Copolymère styrène et divinylbenzène	Levetiracetam (Sivaneswari *et al.*, 2016) Déxtrométhorphane hydrobromide (Malladi *et al.*, 2010)
Duolite AP 143	Basique (ammonium quaternaire)	Copolymère styrène et divinylbenzène	Levetiracetam (Sivaneswari *et al.*, 2016)
Indion 234	Acide (COO^-)	Polyacrylique réticulé	Chlorhydrate Diphénydramine (Bhise *et al.*, 2008)

En contact avec une solution, elles peuvent échanger les ions qu'elles contiennent avec des ions de même charge présents dans le milieu environnant. La plupart des médicaments amers contient des sites ioniques (groupements nitro ou amine). Ainsi, les charges de la résine fournissent un moyen de neutraliser les groupements fonctionnels du médicament empêchant sa libération dans la salive. L'utilisation des REI est principalement rencontrée pour le masquage du goût des PA contenus dans les ODT (Malladi *et al.*, 2010) et suspensions (Sivaneswari *et al.*, 2016). La toxicité des

REI est considérée comme faible mais il a été montré que la libération des contre-ions peut affecter la sécurité de ces excipients (Walsh *et al.*, 2014).

1.4.2 **Méthodes d'évaluation du goût**

Les paramètres organoleptiques permettent de caractériser les propriétés se rapportant à la sphère sensorielle telles que l'odeur, le goût, la couleur. Pour les évaluer, des tests *in vivo* peuvent être réalisés sur un panel constitué de volontaires sains. Ces tests sont sensibles et bien établis grâce à des méthodes standard mais ils sont soumis à une haute variabilité en fonction des sens de chacun, coûtent chers et prennent du temps. Ils peuvent également causer des problèmes éthiques et de sécurité lorsque le PA présente une certaine toxicité (Anand *et al.*, 2007). Ainsi, l'évaluation du goût peut être réalisée quantitativement par la mise en place de méthodes analytiques ou de systèmes biomimétiques (langue électronique).

Panel

L'évaluation du goût par un panel doit être réalisée par des personnes présélectionnées, considérées comme des utilisateurs réels du produit à tester. De ce fait, la population la plus à même d'évaluer le goût des médicaments pédiatriques sont les enfants. Généralement, les enfants choisis pour participer à un test panel sont âgés de plus de 4 ans. En effet, ils doivent être en capacité de comprendre, d'exprimer leur ressentis, suivre les directives, et rester concentrer durant toute l'étude. Afin de faciliter l'évaluation du goût chez l'enfant, le test doit être court, ludique, facile à comprendre et se limiter à 4 formulations différentes. De plus, l'objectif doit être clair et répondre à une question simple telle que : « quel échantillon préfères-tu ? » ou « quel échantillon est le plus amer ? ». Enfin, l'évaluation du goût peut se faire par des jugements verbaux (donner une note de 1 à 5) ou par une cotation selon une échelle faciale (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005) illustrée dans la Figure 8.

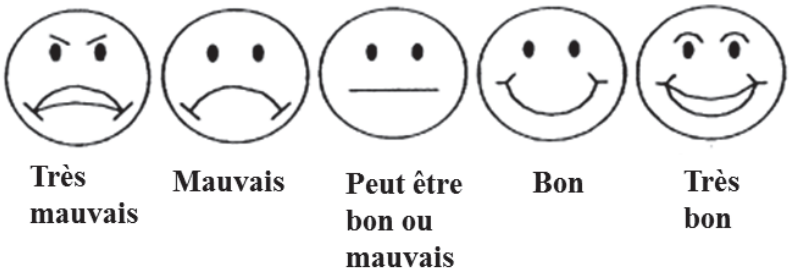


Figure 8 : Exemple d'échelle faciale pour l'évaluation du goût par la population pédiatrique (adapté de Guinard J., 2001).

Méthodes analytiques

Les méthodes analytiques utilisées se rapprochent beaucoup de celles permettant de dresser le profil de libération du médicament. En effet, elles sont basées sur la détection UV du PA en milieu aqueux sur une courte période. C'est un moyen indirect d'évaluer le masquage du goût car elles ne permettent pas d'identifier les saveurs de la formulation. Ainsi, ces méthodes sont généralement utilisées pour déterminer l'efficacité d'un enrobage ou de la complexation du PA. Le masquage du goût est considéré comme réussi lorsque le PA n'est pas détecté ou que sa concentration est inférieure au seuil de détection (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005). Plusieurs systèmes de détection peuvent être mis en place pour déterminer le masquage du goût : i) « en ligne » au moyen d'un capteur de fibre optique UV ; ii) « en direct » en utilisant l'apparus 4 (USP 4) modifié ; « hors-ligne » par prélèvement de l'échantillon suivi d'une analyse au spectromètre UV ou par HPLC. Un système de détection « en ligne » est fortement recommandé lorsque le masquage du goût est accompagné d'une libération retardée du médicament. Le point critique des méthodes analytiques est l'étape de dissolution du PA. En effet, pour se rapprocher de la réalité, il faut mimer au mieux des conditions physiologiques. Les paramètres à prendre en considération sont : la température de la cavité buccal, le milieu de dissolution, le pH du milieu de dissolution (5,5<pH<7), le volume de dissolution (1-2 ml), le mode et la vitesse d'agitation, mais aussi le flux salivaire et la force appliquée par la langue (Pein *et al.*, 2014). Les méthodes de dissolution classiques ne permettent pas de travailler sur de si petits volumes et n'intègrent pas les paramètres de flux salivaire et de force appliquée. Quelques procédés de dissolution ont alors été mis en place pour mimer au mieux la cavité buccale dans le but d'obtenir des résultats proches de l'*in vivo*. Certaines techniques seront développées dans le chapitre 2.4.1.

Les systèmes de détection du goût ou langue électronique.

Il s'agit d'un système biomimétique développé pour évaluer le goût en simulant le système gustatif humain. Le système de reconnaissance du goût chez l'humain implique : la détection (les papilles gustatives), la transmission (système nerveux) et la perception de la saveur (cognition dans le thalamus) (Guhmann *et al.*, 2012). Pour la langue électronique le mécanisme de détection repose sur le schéma précédent. Le capteur est constitué de différentes membranes lipidiques ou polymères représentant les récepteurs spécifiques présents sur les papilles. Lorsque les molécules de PA vont interagir avec les récepteurs, un signal correspondant à un changement de potentiel chimique va être détecté, amplifié et enregistré sur un ordinateur. Les données obtenues seront ensuite analysées et comparées à

une matrice existante comparable à la mémoire gustative humaine. Les systèmes de détection du goût (Figure 9) sont disponibles dans le commerce, avec la TS-5000 Z (Insent Inc, Japon) et l'α-Astree® (AlphaMOS, France). Les résultats obtenus avec la langue électronique seraient plus proches de la réalité que ceux obtenus avec les méthodes analytiques (Pein *et al.*, 2014). Cependant, ces systèmes doivent être améliorés par une diminution du temps d'équilibrage (30 sec) et par l'augmentation de la robustesse des capteurs sensibles à la température et aux particules de PA non dissoutes.

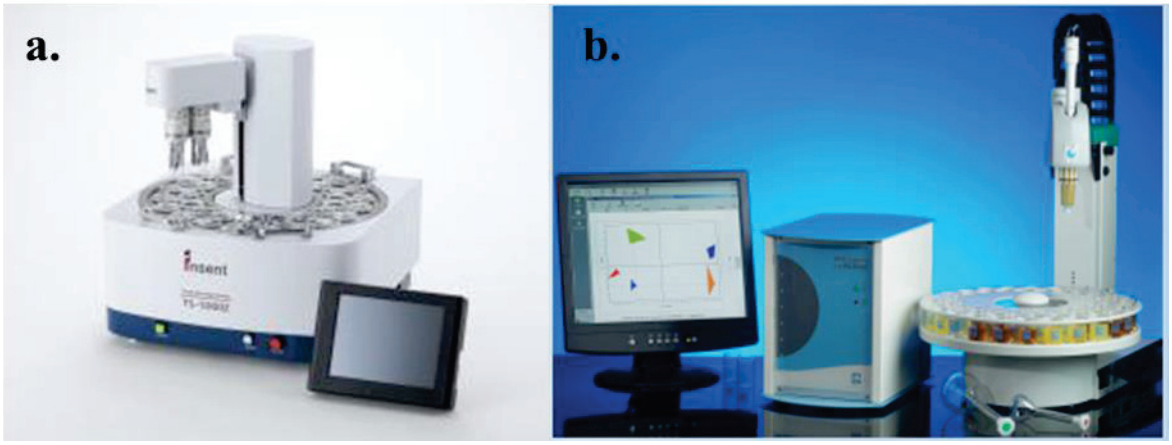


Figure 9 : Systèmes de détection du goût TS-5000 Z (a) et α-Astree®(b).

1.5 Conclusion

Le développement de médicaments pédiatriques nécessite une compréhension des différences physiques et biochimiques entre les enfants et les adultes mais aussi une compréhension des préférences et des capacités de chacun dans l'acceptabilité des diverses formes galéniques. La population pédiatrique, très hétérogène, requière le développement d'un traitement spécifique en fonction des différentes tranches d'âges pour être adapté. De ce fait, les laboratoires pharmaceutiques manquent de motivation face à l'étroitesse du marché. A cela s'ajoutent des difficultés relatives à la conduite de la recherche clinique pour cette population d'un point de vue technique, logistique et éthique. Ces dernières années, le développement de médicaments pédiatriques a progressé de façon exponentielle grâce à la mise en vigueur des règlementations américaine et européenne. En effet, elles ont permis de favoriser le développement de médicaments pédiatriques et les essais cliniques chez l'enfant tout en améliorant les informations disponibles. En raison d'une faible flexibilité de la dose et du besoin d'être avalée, les formes orales solides conventionnelles (comprimés, gélules) ne sont

pas adaptées à l'enfant de moins de 6 ans. Cependant, les formes solides assurent une bonne stabilité du médicament et les procédés de fabrication sont bien établis facilitant ainsi la chaîne d'approvisionnement et le maintien d'un faible coût de fabrication. En 2008, des experts de l'OMS (WHO, 2008) ont publié un rapport dans lequel ils recommandent l'utilisation de formes orales solides souples pour la population pédiatriques, telles que les formes orodispersibles ou des formules à reconstituer pour obtenir des préparations orales liquides. Le développement de ces formules représente un intérêt car elles permettent d'améliorer l'acceptabilité et la sécurité des enfants. La formulation de médicament pédiatrique ne doit pas juste être réalisée dans l'idée de faciliter l'administration d'un médicament. En effet, d'autres facteurs sont à considérer pour assurer la compliance du traitement : le choix des excipients et la palatabilité.

2 Les films orodispersibles

2.1 Généralités

Au cours des dernières décennies, le développement de médicaments innovants permettant d'améliorer l'efficacité, la sécurité et l'acceptabilité du traitement est en plein essor. La mise au point de nouveaux systèmes d'administration de PA est notamment un point capital du développement de ces nouveaux traitements en particulier pour faciliter la prise de médicament aux populations pédiatriques et gériatriques. Les films orodispersibles (ODF) font partis de ces nouvelles formes galéniques améliorant la compliance aux traitements médicamenteux. La FDA introduit les films oraux dans la catégorie « film soluble » défini comme « une mince couche ou revêtement susceptible d'être dissous lorsqu'il est en contact avec un liquide » (FDA, Center For Drug Evaluation and Research). Ces films ont aussi fait leur entrée dans la Pharmacopée Européenne 7.4 dans la monographie « préparation oromucosale ». Ils sont alors définis comme « des feuilles mono- ou multi-couches de matériaux appropriés destinées à être déposées dans la bouche où ils se dispersent rapidement ». Les ODF sont constitués d'une matrice de polymère hydrophile dans laquelle un ou plusieurs principe(s) actif(s) seront dissous ou dispersés. Une fois le film déposé sur la langue ou dans la cavité buccale (Figure 10), la matrice va se désagréger libérant ainsi le PA pour une action locale (Heinemann *et al.*, 2013) ou systémique.

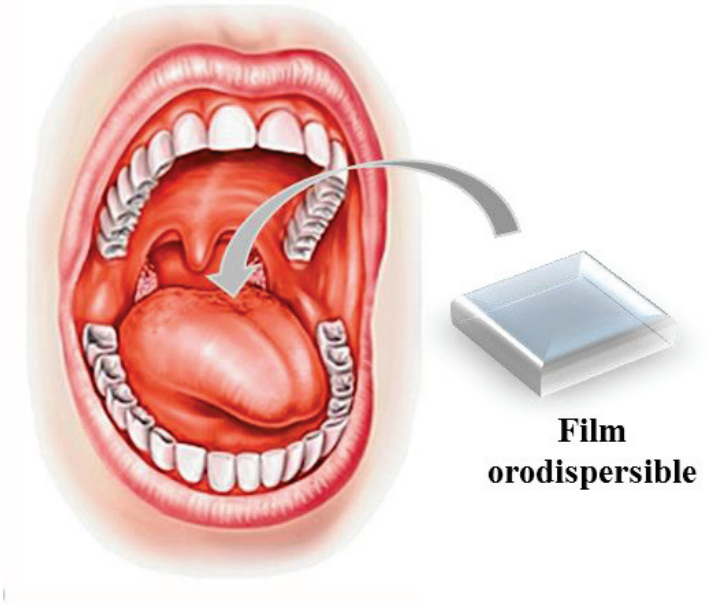


Figure 10 : Schéma d'administration d'un film orodispersible.

Ainsi plusieurs types de films considérés comme orodispersibles peuvent être décrits :

- ✓ *A dissolution rapide* : ODF forme une solution de PA une fois dissous ;
- ✓ *A désintégration rapide* : ODF forme une suspension de PA une fois désintégré ;
- ✓ *A désintégration prolongée* : ODF adhère à la partie gingivale.

Les films présentant une libération rapide du PA permettent une administration orale du PA ; tandis que les films à désintégration retardée offrent un temps de résidence du PA prolongé. La prolongation du temps de résidence optimise le passage des molécules dans la circulation systémique via la muqueuse buccale. Ces films sont à différenciés des films mucoadhésifs à proprement parler, qui sont formulés à partir de polymères peu ou pas solubles dans les milieux aqueux et qui par conséquent n'ont pas la capacité de se disperser dans la cavité buccale. Les films à désintégration retardée sont cependant caractérisés par un certain degré de mucoadhésivité (Borges *et al.*, 2015). Leurs propriétés sont données dans le Tableau 10 (Bala *et al.*, 2013). Les caractéristiques souhaitées des films telles que la vitesse de libération du PA, le taux de PA dans le film et les propriétés mécaniques sont dépendantes de la matrice utilisée. En effet, c'est en jouant sur la nature, le grade et la concentration en polymère, que les propriétés désirées pourront être obtenues.

Tableau 10 : Caractéristiques des films à libération rapide et retardée.

Propriétés	Film libération rapide	Film à libération retardée
Aire (cm^2)	2-8	2-7
Epaisseur (µm)	20-70	50-500
Structure	Une seule couche	Une ou plusieurs couches
Excipients	Polymères hydrophiles solubles	Polymères hydrophiles solubles
Etat du PA	Solution solide	Solution solide ou suspension
Application	Langue	Gencive ou région buccale
Temps dissolution	< 60 secondes	Formation d'un gel en quelques minutes
Mode d'action	Systémique ou local	Systémique ou local

L'intérêt majeur des ODF est leur capacité de dissolution dans la cavité orale. En effet, ils pourront être ingérés facilement sans eau améliorant ainsi la compliance des populations présentant des difficultés à avaler. Les populations particulièrement ciblées par cette nouvelle forme, sont les personnes âgées, les enfants et les patients psychiatriques. Les ODF offrent de nombreux avantages, tels qu'un dosage plus précis d'une solution buvable, aucun risque d'étouffement ou encore une facilité à être manipulés ou transportés (Bala *et al.*, 2013 ; Dixit *et al.*, 2009). De plus, la désintégration rapide du film et la disponibilité immédiate du PA, lorsque celui-ci est à l'état dissous dans la matrice, permettent d'améliorer la biodisponibilité du médicament.

Présentant un intérêt particulier pour l'administration de médicament, les ODF font leur entrée sur le marché dans les années 2000 en tant que dispositifs médicaux et traitements délivrés sans ordonnance. En 2010, la FDA délivre les premières autorisations pour des médicaments sous forme d'ODF (Tableau 11).

Tableau 11 : Dispositifs médicaux et médicaments sous forme de films orodispersibles sur le marché.

Film commercialisé	Fabricant	Indication	PA	Année sortie/ autorisation
Eclipse® Flash Strips	Wrigley's	Mauvaise haleine	Menthol	2003
Neocitran® Thin strips	Novartis	Toux, Rhume	Dextrométhor phane	
Sudafed PE® quick dissolve strips	Pfizer	Décongestionnant	Phényléphrine	2005
Niquitin® strips	Glaxo Smith Kline	Sevrage tabagique	Nicotine	
Gas-X® Thin Strips	Novartis	Flatulences	Siméthicone	
Suboxone® sublingual film	Reckitt Benckiser	Substitution aux opioides	Buprénorphine -naxolone	FDA 2010
Zuplenz®	Strativa Pharmac-euticals	Nausées/vomissements (chimiothérapie et radiothérapie)	Ondansétron	FDA 2010
Setofilm® film orodispersible	Norgine BV	Nausées/vomissements (chimiothérapie et radiothérapie)	Ondansétron	AMM 2010
Breakyl®	Med Pharma	Douleur (ex. patients atteints de cancer)	Fentanyl	AMM 2011
Donepezil®	Sandoz	Symptomes de la maladie d'Alhzeimer	Chlorhydrate de donépézil	AMM 2012

2.2 Composition des films orodispersibles

2.2.1 **Composition générale**

Le principal constituant des ODF est le polymère matriciel qui confère aux films leur structure et leurs propriétés mécaniques. L'ajout de plastifiant est souvent nécessaire pour améliorer la souplesse des films qui peuvent être cassants. Le plastifiant va permettre d'apporter de la flexibilité en s'intercalant entre les chaînes de polymères par l'affaiblissant

des liaisons intermoléculaires. Les autres ingrédients présents dans les ODF permettront d'améliorer l'adhésion au traitement en le rendant plus efficace (amélioration de la vitesse de désintégration) et plus agréable (goût, aspect) (Tableau 12).

Tableau 12 : Composition générale des films oraux (Arya *et al.*, 2010 ; Bala *et al.*, 2013).

Ingrédient	Rôle	Teneur (%m/m)	Exemples d'application
PA	Agent responsable de l'effet thérapeutique.	5-30	Antalgique, anti-nauséeux, antiémétique,…
Polymère hydrophile	Constituant principal des films. Détermine la structure et les propriétés mécaniques mais influence aussi le temps de désintégration et de dissolution.	40-50	Dérivés de la cellulose, PVP, les gommes, …
Plastifiant	Amélioration de la robustesse, la résistance à la déchirure, la flexibilité des films.	0-20	Polyéthylène Glycol, Glycérol
Désintégrant	Augmente la vitesse de désintégration des films.	0-10	Croscarmellose, Crospovidone
Edulcorant	Amélioration du goût.	0-20	Saccharine, Aspartame
Stimulant salivaire	Augmentation de la salivation entraînant une augmentation de la vitesse de désintégration du film.	2-6	Acide citrique, acide malique
Arôme	Amélioration du goût.	0-10	Fruits rouges, citron, orange,…

2.2.2 **Les polymères hydrophiles**

Le choix du ou des polymères est très important dans la formulation de films oraux car il va induire les caractéristiques mécaniques et la vitesse de dissolution (ODF) ou le taux de gonflement (film mucoadhésif) des films. De plus, étant le constituant principal, il doit être

sûr de ne pas présenter d'effet notoire et apporter de bonnes propriétés organoleptiques. Les propriétés idéales des polymères filmogènes sont les suivantes (Bala *et al.*, 2013) :

- ✓ Non toxique et non irritant ;
- ✓ Bonne mouillabilité et bon étalement ;
- ✓ Bonne résistance à l'élongation, au cisaillement et aux frottements ;
- ✓ Peu coûteux ;
- ✓ Durée de vie suffisante ;
- ✓ Peu ou pas d'infections secondaires dans la muqueuse buccale ;
- ✓ Bonne sensation en bouche.

Les polymères hydrophiles peuvent être utilisés seuls ou en association pour obtenir les propriétés souhaitées. Les plus utilisés pour la formulation de films oraux sont (Pathare *et al.*, 2013) :

Les dérivés de la cellulose :

Appartenant à la famille des polysaccharides, ils sont constitués de monomères glycosidiques avec des groupements de substitutions méthyle, hydroxypropyle ou carbonyle, liés par des liaisons β-(1→4) conduisant à des polymères de type linéaire (Figure 11). De nombreux dérivés de la cellulose sont utilisés comme polymères matriciels dans la formulation de films oraux, tels que l'hydroxypropylméthyl cellulose (HPMC) (Sievens-Figueroa *et al.*, 2012 : Shen *et al.*, 2013), l'hydroxyéthyl cellulose (HEC) (Luo *et al.*, 2008), l'hydroxypropyl cellulose (HPC) (Low *et al.*, 2013), la cellulose microcristalline (Nishigaki *et al.*, 2012) ou encore la carboxyméthyl cellulose (CMC) (Heinemann *et al.*, 2013) qui présentent la particularité d'être anioniques. Les dérivés cellulosiques sont de très bons agents filmogènes.

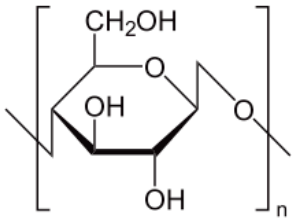


Figure 11 : Formule chimique développée du monomère glycosidique constituant la cellulose.

Les films fabriqués à partir des dérivés de la cellulose sont transparents, insipides et sans odeurs. L'HPMC est très utilisée pour la formulation d'ODF car elle offre une bonne flexibilité et résistance à l'élongation (Nalluri *et al.*, 2013), et des propriétés barrières

intéressantes. De plus, elle est disponible à différents poids moléculaires et plusieurs degrés de substitution, permettant ainsi d'apporter un large panel de propriétés organoleptiques, mécaniques et biopharmaceutiques. Par exemple, l'HPMC de type K est plutôt utilisée pour contrôler et/ou retarder la libération du PA, tandis que l'HPMC de type E est utilisée pour ses propriétés filmogènes (Borges *et al.*, 2015).

L'HPC est utilisé pour sa capacité de transport, ses propriétés bioadhésives modérées mais surtout pour le fait qu'il est soluble dans une large gamme de solvants organiques (Bajdik *et al.*, 2005).

Les dérivés de la cellulose peuvent être associés à d'autres polymères comme l'amidon (Tongdeesoontorn W. *et al.*, 2011) ou le chitosane (Luo. *et al.*, 2008) pour optimiser les propriétés désirées d'une formulation donnée.

L'amidon et les amidons modifiés :

L'amidon est un polysaccharide complexe issu des organes des plantes comme les graines, les tubercules ou les racines. L'amidon est un mélange de deux homopolymères : l'amylose et l'amylopectine (Figure 12). Du fait de sa structure linaire, l'amylose procure à l'amidon ses propriétés filmogènes (Lafargue *et al.*, 2007). Les films d'amidon sont transparents, sans saveur, sans odeur et insipides. Cependant, ils sont cassant et requière l'incorporation d'excipient (Lafargue *et al.*, 2007). De plus, l'amidon est non soluble dans l'eau et les solvants organiques à température ambiante (Korgars *et al.*, 2003). Les amidons modifiés tels que le Lycoat® NG73 offre de meilleures propriétés pour la fabrication d'ODF (Parissaux *et al.*, 2007). En effet, ils se dispersent facilement dans l'eau froide et présentent de meilleures propriétés filmogènes que les amidons naturels (Lafargue *et al.*, 2007 ; Parissaux *et al.*, 2007).

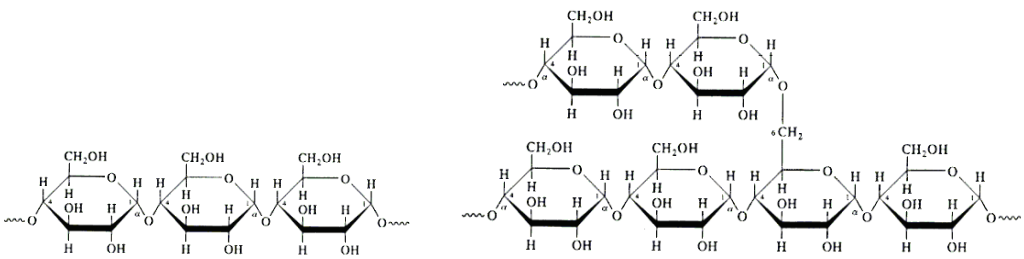


Figure 12 : Formule chimique développée des monomères d'amylose (à gauche) et d'amylopectine (à droite) constituant l'amidon.

La maltodextrine est un autre exemple d'amidon modifié. Il s'agit d'un oligosaccharide issu de l'amidon par hydrolyse partielle. Elle est composée d'un mélange de chaînes de glucose variant de 3 à 7 unités. La maltodextrine est classée en DE (Equivalent Dextrose) allant de 3 à 20 DE. Plus la valeur en DE est élevée, plus les chaînes de glucose sont courtes induisant une meilleure solubilité mais une résistance thermique plus faible. Les maltodextrines, avec un faible DE, offrent quant à elles une meilleure flexibilité (Cilurzo *et al.*, 2008). Elles sont inodores, non toxiques, présentent une hygroscopicité faible et une bonne stabilité par rapport à la recristallisation.

Le pullulan (PUL) est polysaccharide microbien naturel produit par la levure fongique. C'est un glucane neutre constitué d'unités de maltotriose liées par des ponts osidiques de type α-1,4 (Figure 13). Le PUL offre de bonnes propriétés filmogènes, une faible viscosité induisant de bonnes capacités d'étalement, une bonne résistance à la traction et une stabilité par rapport à la température. Il est insipide, inodore, malléable, bon adhésif et bon liant. De plus, il est non toxique, comestible et biodégradable ; ainsi on le rencontre souvent pour la formulation de film à usage alimentaire. Il peut être utilisé seul ou en association avec la gélatine, l'amidon (Kanmani and Lim, 2013) ou encore avec le chitosan (Wu *et al.*, 2013).

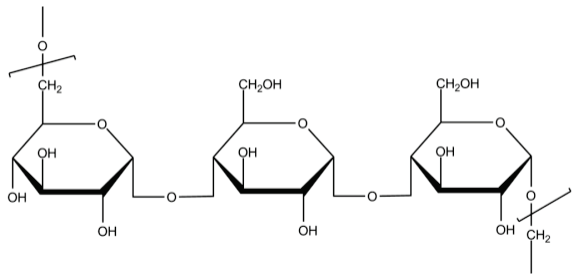


Figure 13 : Formule chimique développée du monomère maltotriose constituant le pullulan.

Les polymères semi-synthétiques, synthétiques et autres :

La polyvinylpyrrolidone (PVP) est un polymère organique synthétisé par polymérisation de la N-vinylpyrrolidone (Figure 14). Elle est très soluble dans l'eau et dans quelques solvants organiques (éthanol) et offre de bonnes propriétés hydrophiles, filmogènes et de mouillage des particules en solution (Kumar *et al.*, 2014). Très utilisée dans le domaine pharmaceutique, elle est inerte et non toxique.

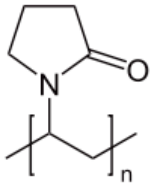


Figure 14 : Formule chimique développée du monomère constituant la Polyvinylpyrrolidone.

Le copolymère de polyéthylène glycol et d'alcool polyvinylique (Kollicoat ® IR) est constitué de chaines de polyéthylène glycol greffées de chaines d'alcool polyvinylique (Figure 15). Ce polymère très hydrophile se disperse facilement dans l'eau. De plus, il est très souple du fait de l'intégration du PEG et facile à formuler (Xu *et al.*, 2014).

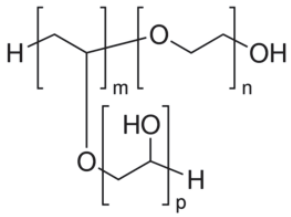


Figure 15 : Formule chimique développée du monomère constituant le Kollicoat® IR.

Le chitosane (Figure 16) est un polyoside issu de l'acétylation de la chitine présente dans la carapace des crustacés. C'est un polymère naturel, non toxique, biodégradable, mucoadhésif et disposant de très bonnes propriétés filmogènes (Abruzzo *et al.*, 2012). Il peut être présent sous la forme d'un polycation lorsque le pH est inférieur à son pKa. Cela permettra d'augmenter les forces d'attractions moléculaires (interactions électrostatiques) avec des polymères anioniques ou avec le mucus buccal chargé négativement (Park *et al.*, 2012). Ce polymère bioadhésif permet ainsi d'améliorer l'absorption des molécules à travers la muqueuse buccale.

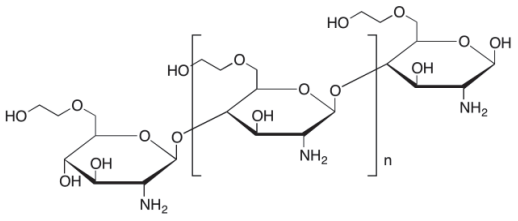


Figure 16 : Formule développée du monomère osidique constituant le chitosane.

Le xyloglucane est un polysaccharide de type glycosaminoglycane (Figure 17) issu des algues et des plantes fabacées (légumineuses : pois, haricots…). Il possède de nombreuses propriétés : mucoadhésive, stabilisante, épaississante, liante, gélifiante et filmogène. Mais il est aussi non cancérigène, biodégradable et biocompatible (Avachat *et al.*, 2013).

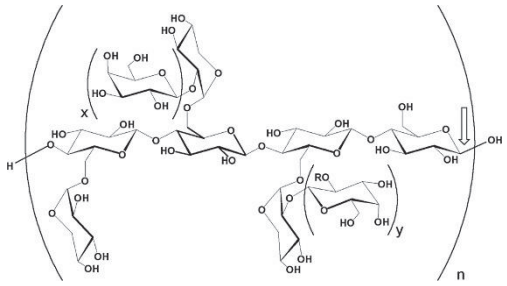


Figure 17 : Formule chimique développée du monomère constituant le xyloglucane.

2.2.3 Choix des excipients et leurs effets sur les films orodispersibles

Pour les films à libération rapide, le polymère doit permettre d'assurer une libération accélérée du médicament grâce une désintégration rapide de la matrice, mais aussi conférer de bonnes propriétés mécaniques afin que le film soit facilement manipulable. Or, il a été montré qu'une désintégration rapide était permise par des polymères de faibles poids moléculaires tandis qu'avec des polymères de hauts poids moléculaires les films sont d'avantages résistants dans la cavité buccale (Hoffmann *et al.*, 2011). Le degré de substitution du polymère peut aussi avoir un effet sur la dissolution des films. Par exemple, pour un film constitué d'HPMC, un ratio hydroxypropoxyle/ méthoxyle élevé entrainera une libération plus lente du fait de la formation d'un gel hydrophile épais dans les milieux biologiques. Le degré de substitution peut aussi avoir une influence sur les propriétés mécaniques des films. En effet, une proportion élevée de groupements méthoxyles permettra d'obtenir des films plus résistants, rigides et extensibles (Borges *et al.*, 2015). Low *et al.*, ont montré que la nature du polymère et sa quantité utilisée dans la formulation peuvent avoir un effet sur la vitesse de libération du PA ; ainsi, avec un polymère très hydrophile la libération du PA sera plus rapide et ce d'autant plus que sa quantité dans le film sera élevée. De plus, ils ont montré que la présence d'interactions entre le PA et le polymère rendrait le film plus rigide et diminuerait la vitesse de libération du PA (Low *et al.*, 2013).

Le choix de la nature, du grade et de la quantité de plastifiant est aussi une étape importante dans la formulation de films oraux. En réduisant les forces intermoléculaires et en augmentant

la mobilité des chaînes de polymères, le plastifiant permet de diminuer la température de transition vitreuse des polymères et d'améliorer la flexibilité des films. Le choix du plastifiant est important et doit se faire en fonction du polymère utilisé. En effet, l'efficacité d'un agent plastifiant dépend de sa structure, de son poids moléculaire et de sa concentration. La plastification nécessite que des interactions s'établissent entre les chaînes de polymère et le plastifiant, et que ce dernier se répartisse uniformément dans le réseau polymérique induisant un volume libre additionnel. La solubilité et la compatibilité du plastifiant avec le polymère est d'une importance majeure pour que la plastification soit efficace. Par exemple, les polyéthylène glycols sont de bons plastifiants pour l'HPMC mais ne sont pas adaptés à l'HEC (Sakellariou and Rowe, 1995). Laboulfie *et al.*, ont montré que l'incorporation de PEG, pour la formulation d'un film de revêtement, améliore le comportement plastique en réduisant le module d'élasticité et de résistance à la traction et en augmentant l'allongement à la rupture. De plus, il montre que cette tendance est d'autant plus importante que la masse molaire du PEG est élevé (Laboulfie *et al.*, 2013). Cependant, le type de plastifiant, son grade et sa concentration influencent les forces intermoléculaires et l'absorption de l'eau qui régissent la mobilité moléculaire. Le glycérol présente, par exemple, une capacité d'absorption de l'eau plus importante que l'éthylène glycol et le propylène glycol du fait de sa nature hydrophile plus élevée (Bergo *et al.*, 2013). Ce point n'est pas à négliger, car les molécules d'eau vont d'une part, pouvoir affecter les propriétés rhéologiques/rhéomécaniques du film et d'autre part, avoir une incidence sur la stabilité de certains PA sensibles à l'humidité. Il faudra alors trouver un compromis et choisir un plastifiant permettant à la fois d'améliorer les propriétés mécaniques du film tout en ayant un taux d'absorption de l'eau faible.

2.3 Procédés de fabrication

Il existe plusieurs procédés permettant la fabrication d'ODF. Généralement, les films sont obtenus par coulé/évaporation de solvant ou par extrusion. Toutefois des procédés originaux ont été développés au cours de ces dernières années comme l'impression à jet d'encre ou la flexographie.

2.3.1 **Méthodes conventionnelles**

La méthode de coulée/évaporation de solvant consiste à mélanger les excipients et le PA dans un solvant commun pouvant être aqueux, organique ou un mélange hydro-alcoolique. Une fois homogénéisé, le mélange est coulé sur une surface plane (ex. boîte de pétri, surface en téflon). Le solvant évaporé (sous hotte, sous vide, en étuve), il se forme alors un film qui

pourra être découpé à la taille souhaitée. Cette technique est très employée (Cilurzo *et al.*, 2008 ; Sayed *et al.*, 2013 ; Xu *et al.*, 2014 ; Kianfar *et al.*, 2012 ; Shimoda *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2015) pour la formulation de films oraux du fait de sa facilité de mise en œuvre en laboratoire et de son faible coût.

L'extrusion permet la formation d'un nouveau matériau en contraignant le passage d'un composé ou d'un mélange compressé à traverser un orifice. Pour cela, différentes conditions expérimentales de température, de débit et de pression peuvent être appliquées. Ce procédé de fabrication mécanique permet d'obtenir, en continu, un produit long et plat appelé extrudât. Dans le domaine pharmaceutique des extrudeuses ont été conçues pour mélanger le/les principe(s) actif(s) avec les excipients sans ajout de solvants (Solanki *et al.*, 2015).

Les avantages et inconvénients de ces procédés sont regroupés dans le Tableau 13 (Nagaraju *et al.*, 2013).

Tableau 13 : Avantages et inconvénients des méthodes conventionnelles pour la fabrication de films orodispersibles.

METHODES CONVENTIONNELLES	AVANTAGES	INCONVENIENTS
COULE/EVAPORATION DE SOLVANT	Epaisseur uniforme Meilleures propriétés mécaniques Facilité de mise en œuvre Coût limité	Solubilité polymère dans solvant organique ou aqueux Nécessité de former une solution stable avec un minimum d'excipients et une viscosité adaptée
EXTRUSION	Pas besoin d'eau ou de solvant Peu d'étapes Bonne dispersion des molécules faiblement soluble dans l'eau Meilleure uniformité dans la répartition des particules	Problèmes de stabilité thermique du médicament et des excipients Connaissance des propriétés d'écoulement des polymères Nombre de polymères candidats limités

2.3.2 **Méthodes innovantes**

L'impression jet d'encre est utilisée pour la fabrication de films oraux à l'aide d'imprimante classique. Ainsi, le papier est remplacé par une feuille de film constitué du/des polymères matriciels et des excipients. La cartouche d'encre, après avoir été lavée, sera remplie par la solution ou dispersion de PA. La solution ou dispersion de PA pourra alors être déposée une

ou plusieurs fois à la surface du film (Genina *et al.*, 2013). L'impression par imprimante ne peut être utilisée que si la taille des particules de PA est suffisamment fine. De plus, cette technologie n'est pas encore adaptée à la production à grande échelle. Une autre technique semble plus réalisable à l'échelle industrielle, la flexographie (Janßen *et al.*, 2013).

Le groupe d'impression par flexographie (Figure 18) est constitué de trois cylindres et d'une chambre à racle dans laquelle se trouve la solution de PA. Le cylindre encreur tramé, aussi appelé anilox, va d'une part récupérer la solution de PA en plongeant dans la chambre à racle et d'autre part permettre d'imprégner le cliché en relief présent sur le cylindre porte-cliché. Enfin, le cliché va tamponner la solution de PA qu'il contient sur le film grâce à une pression appliquée par le cylindre de contre-pression. Cette étape pourra alors être répétée selon la dose de PA souhaitée dans la formulation.

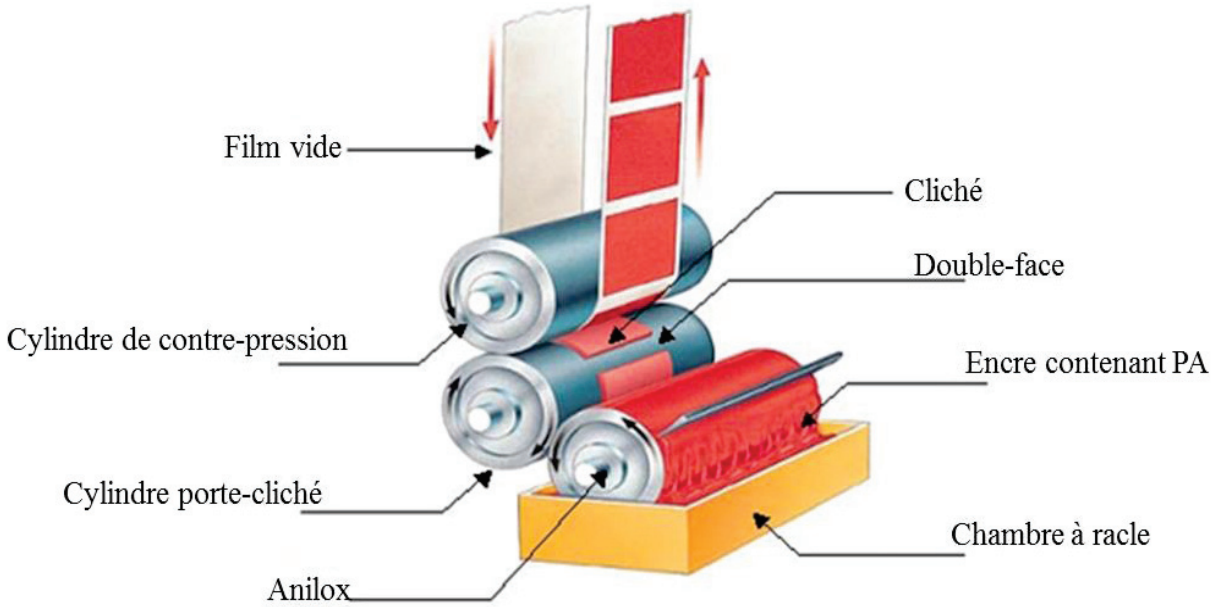


Figure 18 : Procédé de fabrication par flexographie (modifiée de http://cerig.pagora.grenoble-inp.fr/tutoriel/flexographie/images/groupe-impression-flexo.jpg)

Ces procédés de fabrication des films par impression représentent un intérêt car ils permettraient une répartition plus homogène et plus précise du PA par rapport aux méthodes classiques. De plus, l'homogénéisation du PA, avec les méthodes classiques, dépend de la viscosité et la densité du polymère filmogène ; ces propriétés sont elles-mêmes affectées par les caractéristiques et la quantité de PA. De ce fait, la formulation de films oraux par les méthodes conventionnelles doit souvent être ajustée en fonction de la nature et de la quantité

du PA utilisé. La complexité pour la fabrication de films à l'aide de ces procédés, repose sur le dépôt du médicament en solution sur le film de polymère sans provoquer sa désintégration (Janßen *et al.*, 2013).

2.4 Caractérisations *in vitro*

Les ODF doivent répondre aux exigences habituelles des formes galéniques à savoir l'uniformité de masse et l'uniformité de teneur en PA selon les essais décrits à la Pharmacopée Européenne. Ils font, de plus, l'objet de caractérisations particulières adaptées à cette forme pour déterminer les temps de désagrégation et de dissolution, ainsi que les propriétés mécaniques. La monographie de la Pharmacopée Européenne sur la caractérisation des ODF n'étant pas encore établie, il faut se référer aux essais réalisés sur les formes orales solides ou unidoses. Or, ces monographies n'étant pas adaptées aux ODF, la littérature fait état de nombreux protocoles s'efforçant de refléter au mieux les conditions *in vivo* (Kostewicz *et al.*, 2014).

2.4.1 **Evaluation des propriétés Pharmacotechniques**

Essais de désagrégation : Ce test permet de caractériser le temps au bout duquel le film se dissout dans la cavité buccale. Aucune indication officielle n'est spécifiée pour donner le temps limite de désintégration pour les ODF. On peut alors se référer aux lignes directrices données par la FDA pour les comprimés à désintégration rapide, qui spécifient un temps limite de 30 secondes (Guidance for Industry: Orally Disintegrating Tablets, Center for Drug Evaluation and Research, US FDA, Dec. 2008). Les conditions de désintégrations sont bien différentes des formes orales conventionnelles. En effet, la désintégration des films orodipsersibles dépend de la composition et du volume salivaires, de la température et du malaxage appliqué par la langue. Il est donc difficile de mimer la cavité buccale et de choisir une méthode adéquate pour caractériser le temps de désintégration des films. Les appareils décrits dans la Pharmacopée pour la détermination du temps de désintégration des formes orales peuvent être utilisés. D'autres approches ont été mises en place sans pour autant mimer les conditions physiologiques. Elles sont axées sur :

- ✓ La caractérisation de l'indice de gonflement de la matrice dans un environnement aqueux par analyse thermomécanique (Garsuch and Breikreutz, 2009) ;
- ✓ La mesure de l'angle de contact lors du dépôt d'une goutte de liquide à la surface de la matrice (Garsuch and Breikreutz, 2009);

- ✓ L'observation du comportement des films en présence d'une faible quantité de liquide. Il existe 2 méthodes : la méthode de la goutte et la méthode la boîte de pétri (Nalluri *et al.*, 2013 ; Garsuch and Breikreutz, 2010 ; Singh *et al.*, 2013) ;
- ✓ L'observation du temps de désintégration des films dans un volume de milieu plus important et soumis à une agitation (Arya *et al.*, 2010) ;
- ✓ La détermination du temps au bout duquel le point de rupture du film est atteint (Figure 19) (Preis *et al.*, 2014).

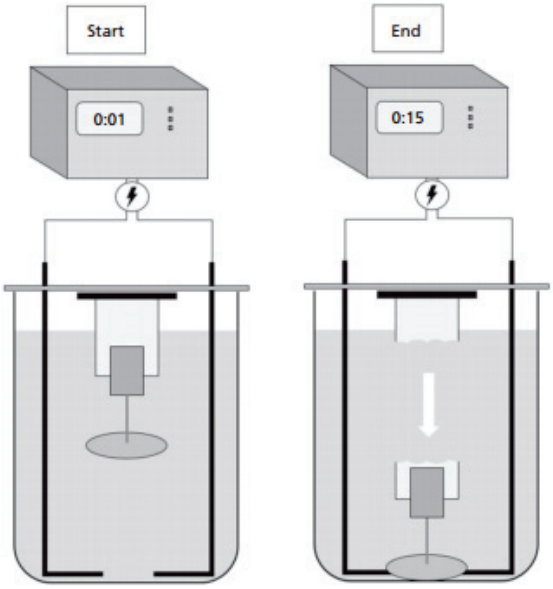


Figure 19 : Procédé permettant de caractériser le point de rupture des films (Preis *et al.*, 2014).

Essais de dissolution : De la même façon que pour les essais de désagrégation, les essais de dissolution décrits les Pharmacopées ne sont pas adaptés aux conditions réelles de libération du PA contenu dans un film. Ainsi, les méthodes conventionnelles telles que les méthodes USP 1, 2, 3 et 4 sont utilisées pour établir le profil de dissolution du PA mais le prélèvement peut être compliqué en raison du flottement des films dans le milieu de dissolution. Pour cela, le procédé peut être modifié en fixant par exemple le film sur une plaque en verre (Nair *et al.*, 2012) ou en suivant la libération du médicament à l'aide d'un capteur fibre optique submersible (Garsuch and Breikurtz, 2009). De plus, les appareils USP ne reflètent pas la réalité car ils sont conçus pour simuler le tractus gastro-intestinal. Adrover *et al.*, montrent que les différentes méthodes USP ne sont pas suffisamment pertinentes pour les raisons suivantes :

- ✓ Taux de dissolution élevé fortement dépendant de la vitesse d'agitation et du positionnement du film ;
- ✓ Volumes de dissolution trop importants ;
- ✓ Temps de séjour faible ;
- ✓ Mauvaise reproductibilité expérimentale.

De nouvelles méthodes expérimentales sont ainsi mises au point pour améliorer la pertinence de ces essais. Des dispositifs d'écoulement millifluidique (Figure 20) permettant d'imposer un débit faible, ont par exemple été développés, pour mimer le débit salivaire à la surface du film (Adrover *et al.*, 2014 ; Hoang Thi *et al.*, 2012).

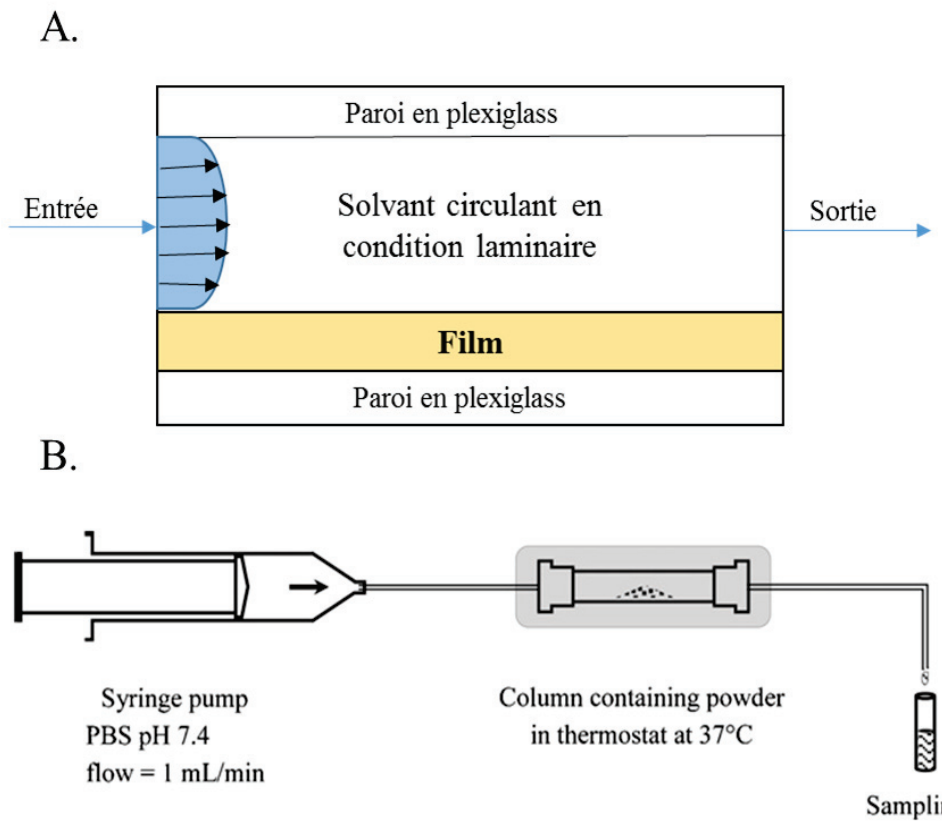


Figure 20 : Dispositifs d'écoulement millifluidique mis en place par A. Adrover *et al.*, et B. Hoang Thi *et al.*, pour mimer le flux salivaire de la cavité buccale.

Krampe *et al.* proposent un nouveau procédé pour caractériser la dissolution des ODF. Cela consiste à piéger le film dans un dispositif permettant à la fois d'appliquer une force imitant celle exercée par la langue et de filtrer la forme galénique désintégrée. Le PA va alors diffuser

à travers le filtre vers le milieu accepteur où le taux de libération sera mesuré à l'aide d'une fibre optique qui mesure l'absorption dans l'UV (Krampe *et al.*, 2015).

2.4.2 **Caractérisations physico-chimiques**

Détermination de la teneur en eau ou en solvants résiduels : La présence de solvant résiduel peut avoir des conséquences sur l'acceptabilité du médicament (odeur, goût, effets secondaires) et sur les propriétés physico-chimiques du PA et de la forme galénique.

Le titrage Karl-Fisher est la méthode standard pour déterminer la quantité d'eau résiduelle dans les produits pharmaceutiques. Le principe de ce titrage est basé sur l'oxydation du dioxyde de soufre par l'iode en présence d'eau. Or, l'utilisation de cette technique est limitée dans le cas des ODF car elle requiert la dissolution du produit dans des solvants organiques dans lesquels les polymères de types polysaccharides sont quasiment tous insolubles. Le taux d'humidité résiduelle peut être déterminé en conservant le film dans un dessiccateur contenant du carbonate de calcium durant 3 jours (Bala *et al.*, 2013). La quantité d'humidité perdue sera alors calculée à partir de la formule suivante :

$$\%(teneur\ en\ eau) = \frac{Masse\ initiale - Masse\ finale}{Masse\ initiale} \times 100$$

Pour plus de précision, l'analyse thermogravimétrique (ATG) pourra être utilisée ; cette technique mesure la masse de l'échantillon en fonction de la température et du temps permettant alors de quantifier la masse perdue associée à des processus de dégradation et de transition dans le produit analysé.

Le taux de solvants résiduels est soumis à des normes fixées par la pharmacopée (monographie 5.4-Residual solvents, Pharmacopée Européenne 8 Ed.). La méthode classique pour identifier et quantifier les solvants résiduels est la chromatographie en phase gazeuse.

Caractérisation des interactions : Les interactions excipient-excipient et/ou excipient-PA ont un rôle déterminant dans les formes galéniques. Des techniques spectroscopiques telles que l'Infra-Rouge à Transformée de Fourrier (FT-IR) et le Raman (Zhang *et al.*, 2014) permettent d'observer ces interactions d'associations. Ainsi, les composés présents dans la matrice pourront être détectés et la compatibilité du PA avec les excipients pourra être évaluée (Xu *et al.*, 2014).

2.4.3 **Caractérisations mécaniques**

Les films oraux doivent avoir des propriétés mécaniques permettant d'assurer l'intégrité des films lors de la manipulation, de l'administration, du transport et du stockage. Ces propriétés se traduisent par une résistance à la traction et un pourcentage d'élongation modérés, ainsi qu'un module d'Young faible. Le module d'Young et le pourcentage d'élongation ont un impact direct sur l'acceptabilité de la forme ; un film trop cassant peut entraîner des risques d'irritation dans la cavité buccale, ou encore, un film trop élastique peut être difficile à manipuler et à administrer (Low *et al.*, 2013). Plusieurs facteurs vont influencer la tenue mécanique des films comme le type et la quantité de polymère, de plastifiant, de solvant et de PA utilisés, ainsi que l'épaisseur du film, le procédé de fabrication et les conditions de stockage (Preis *et al.*, 2013). Afin de déterminer les propriétés mécaniques des films en termes de flexibilité et de résistance, les équipes de recherche utilisent un appareil de type « Texture Analyzer » TA-TX (Figure 21). Cet appareil permet de mesurer les propriétés mécaniques généralement étudiées, à savoir : la résistance à la traction (σm), le module d'Young (E) et l'allongement à la rupture (A).



Figure 21 : Appareil pour la mesure des propriétés mécaniques des films de type « Texture Analyzer ».

La résistance à la traction *:* La résistance à la traction d'un film est définie comme la résistance du matériau soumis à une force qui tend à déchirer. La résistance à la traction est identifiée comme la contrainte maximale de la courbe contrainte-déformation. Elle s'exprime en MPa ou N/mm^2 et est définie par la formule suivante :

$$\sigma_m = {}^{F}/_{S}$$

Avec F = Intensité de la force induisant la rupture et S = Surface du film.

Cette mesure permet de déterminer la résistance du film soumis à une force de déchirement. Les normes ASTM (Standard Test Method) utilisées pour mesurer la résistance à la traction sont : ASTM D882 (Cilurzo *et al.*, 2008) et ASTM 825-88 (Kammani and Lim,).

Le module d'Young : Le module d'Young ou module d'élasticité est la constante qui relie la contrainte de traction (ou de compression) et la déformation (Nalluri *et al.*, 2013) dans le régime linéaire. Il s'exprime en MPa et est défini par la formule suivante :

$$E = {}^{\sigma}/_{\varepsilon}$$

Avec σ = Contrainte (unité de pression) et ε = Allongement relatif (adimensionnel).

Cette mesure permet de déterminer la raideur du film. Ainsi, plus le module d'Young est élevé plus le matériau sera rigide. Les mesures du module d'Young nécessitent de faire des essais de traction suivant la norme international ASTM D882.

L'allongement à la rupture *:* L'allongement à la rupture est la mesure de la déformation maximale du film avant de se déchirer. L'allongement à la rupture est adimensionnel et est défini par la formule suivante :

$$A(\%) = \frac{L_f - L_0}{L_0} \times 100$$

Avec L_0 = longueur initiale du film et L_f = Longueur maximale du film avant la rupture.

L'allongement à la rupture est mesuré à l'aide d'une machine d'essai de traction Hounsfield (Bala *et al.*, 2013) ou d'un Texture analyser TA-TX (ASTM D882).

Les trois mesures mécaniques ci-dessus sont les plus étudiées, mais d'autres tests mécaniques peuvent être réalisés en complément :

Résistance au pliage *(propriété plastique) ou test de fatigue:* La résistance au pliage est définie par le nombre de fois où le film est plié au même endroit sans casser (Kumar *et al.*, 2014). Cette mesure permet de juger de la fragilité du film.

Résistance à la déchirure : La résistance à la déchirure (en Newton) caractérise l'aptitude d'un matériau à résister à un cisaillement (Dixit and Puthli, 2007) (ASTM D-1004 et ATSM D-1922).

Contrainte de rupture en cisaillement *:* C'est la contrainte maximale supportée par un matériau avant la rupture. Cette contrainte (force/section) qui correspond à la force appliquée sur la section de la face cisaillée, est habituellement exprimée en psi (psi~7000 N/m^2) (ASTM D-732).

2.4.4 **Caractérisation de l'état physique du PA**

L'état physique du PA (amorphe ou cristallin) dans la matrice de polymère peut être caractérisé à l'aide de deux techniques, la diffraction des rayons X (DRX) et l'analyse calorimétrique différentielle (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC) (Zhao *et al.*, 2015 ; Xu *et al.*, 2014).

La diffraction des rayons X permet de détecter la présence d'un ordre moléculaire correspondant à l'état cristallin. Ainsi, l'analyse d'un PA dans sa forme cristalline sera caractérisée par la présence de nombreux pics de diffraction bien résolus (pic de Bragg) donnant lieu à une signature cristalline spécifique de ce composé. Tandis que la présence d'un PA à l'état amorphe sera déterminée par l'absence de signaux de type pic de Bragg.

La Calorimétrie différentielle à balayage ou DSC est basée sur la mesure des températures et des flux de chaleur associés aux transitions de phases dans un matériau en fonction du temps et de la température dans une atmosphère contrôlée. L'observation des évènements endothermiques (fusion, transition vitreuse, décomposition) et exothermiques (cristallisation, réticulation) permettront d'apporter des informations sur l'état du PA dans la matrice (transition de phase, polymorphisme).

2.4.5 **Caractérisation organoleptique**

Les propriétés organoleptiques permettent de caractériser les propriétés se rapportant à la sphère sensorielle telle que l'odeur, le goût, la couleur (Cf. partie 1.4.2). L'évaluation du goût des ODF est un critère important à prendre en considération du fait de sa désintégration dans la cavité buccale.

2.5 Conclusion

La voie orale est la voie préférentielle pour l'administration d'un médicament car elle est plus simple, plus commode, plus flexible et généralement le développement des formes orales est moins coûteux. La mise au point de nouveaux systèmes d'administration pour améliorer la compliance des patients est en plein essor. L'ODF est l'un de ces nouveaux systèmes

permettant de faciliter la prise du médicament des personnes ayant du mal à avaler telles que la population pédiatrique ou gériatrique. En effet, constitué d'une matrice de polymère(s) hydrophile(s), les films vont se désintégrer en présence de la salive. Le PA et les résidus de matrice seront alors avalés sans avoir recourt à la prise d'eau ou à l'utilisation d'un dispositif d'administration particulier. De plus, de nombreux PA d'intérêt sont très peu ou pas solubles dans l'eau ce qui peut limiter leur biodisponibilité. Les ODF peuvent améliorer la dissolution de ces PA. Enfin, les procédés de fabrication sont rentables et permettent d'obtenir des produits finis. Cette nouvelle forme d'administration du médicament est donc très attractive pour les industriels. De ce fait, de nombreuses compagnies ont décidé de se lancer dans le développement de ces films. Pour cela, elles ont mis au point leur plateforme technologique. Ces plateformes sont des films placebo, dans lesquels pourront être intégrés différents PA d'intérêt. La formule pourra alors varier en fonction de la nature et de la dose en PA souhaitées. Il y a eu un tel engouement sur la mise au point de plateformes technologiques, qu'il est maintenant difficile d'innover dans le développement de nouvelles formulations. En effet, il existe plus d'une quinzaine de plateformes (Pharmfilms®, Rapidfilm®,…), protégées par des brevets, sans restrictions par rapport au type de PA intégré, à la thérapie ciblée et au procédé de fabrication utilisé (Borges *et al.*, 2015). Cependant, ces formules pourraient être améliorées grâce à l'évaluation des paramètres influençant les propriétés mécaniques et de dissolution des films. La méthode « quality by desing », théorisée dans l'ICH Q8, semble intéressante pour optimiser le développement pharmaceutique (Visser *et al.*, 2015). De plus, ces brevets ne font pas état de l'incorporation de PA peu ou pas solubles (molécules BCS de type II ou IV) dans les ODF. Quelques études se sont intéressées au développement d'ODF contenant des molécules de type II dans le but d'améliorer leur solubilité. Pour cela, le PA peu ou pas soluble pourra être incorporé dans le film en solution, en suspension (Woertz and Kleinebudde, 2015(a) and (b)) ou encore sous forme de nanoparticules (Sievens-Figueroa *et al.*, 2012). Le système obtenu après avoir incorporé un PA dans un support inerte hydrosoluble est appelé dispersion solide (SD). Les systèmes de type SD permettent d'améliorer la dissolution des molécules faiblement hydrosolubles. Dans la partie suivante, les points clés concernant ces systèmes seront exposés afin de comprendre l'intérêt que présentent les SD dans l'amélioration de la solubilité des PA faiblement hydrosolubles. Les limites et inconvénients des SD seront aussi présentés afin d'introduire l'intérêt d'utiliser des CD dans ce type de système.

3 Amélioration de la dissolution des BCS II

Les formes orales sont les systèmes d'administration les plus utilisés depuis de nombreuses années. Cependant, la voie orale n'est pas la plus adaptée pour offrir la meilleure efficacité en particulier lorsque la molécule active est peu ou pas soluble en milieu aqueux. En effet, l'efficacité thérapeutique d'un médicament dépend de la biodisponibilité du PA induite par sa dissolution. La biodisponibilité des PA administrés par voie orale est caractérisée selon leur solubilité et leur perméabilité (capacité du PA à traverser les barrières physiologiques). Ces deux critères permettent de classer les molécules selon le « Biopharmaceutics Classification System » ou BCS (Amidon *et al.*, 1994) (Figure 22).

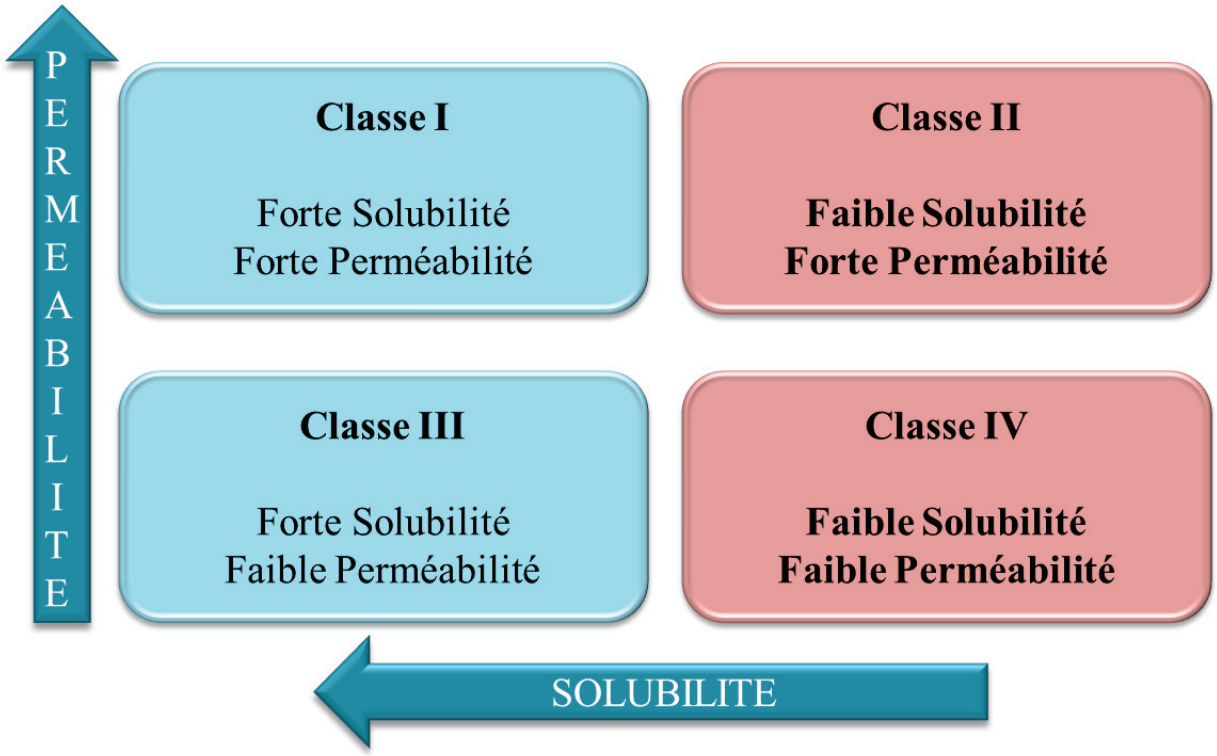


Figure 22 : Représentation des classes de molécules selon le BCS.

Les molécules de classe I sont solubles et perméables, ainsi leur biodisponibilité est uniquement dépendante du temps mis pour qu'elles atteignent les sites d'absorption appropriés dans le tractus gastro-intestinal. Les molécules de classe II présentent une bonne perméabilité à travers les muqueuses digestives mais ont une faible solubilité, ainsi leur absorption par voie orale va dépendre de la solubilité du PA et de sa vitesse de dissolution. Les molécules de classe III sont solubles mais peu perméables, ainsi la biodisponibilité par voie orale de ces médicaments sera limitée par les propriétés barrière du tractus gastro-intestinal. Enfin, les molécules de classe IV sont à la fois peu perméables et insolubles.

Les récentes avancées dans le domaine du développement de molécules thérapeutiques sont caractérisées par une augmentation du nombre de molécules d'intérêt qui sont malheureusement faiblement hydrosolubles (classes II et IV). Pour illustrer ce problème, Benet *et al.* montrent que 40% des molécules actives présentes sur le marché américain font parties des classes II et IV du BCS. De plus, 90% des molécules en cours de développement appartiennent à ces catégories du BCS. Il est donc nécessaire de mettre au point des stratégies permettant l'amélioration de leur biodisponibilité. Pour améliorer la solubilité des molécules plusieurs méthodes peuvent être utilisées :

- ✓ Modifications physiques : Les polymorphes et pseudo-polymorphes, la réduction de la taille des particules de PA, les nano-suspensions ;
- ✓ Modifications chimiques : Les pro-drogues et les sels ;
- ✓ Altération du milieu de dissolution : Les co-solvants, les tensioactifs, l'altération du pH du milieu ;
- ✓ Formulations galéniques : Les supports nanométriques (micelles, liposomes), les formulations lipidiques (en général, elles prolongent la dissolution), **l'inclusion dans les cyclodextrines (CD)**, les systèmes mésoporeux et **les dispersions solides (SD)**.

La modification de molécules peu solubles par des techniques galéniques est souvent plus facile à mettre en œuvre et plus reproductible. De plus, les approches chimiques (à part les sels) obligent les industriels à engager des essais cliniques sur des molécules modifiées car celles-ci sont considérées comme des nouvelles entités chimiques (Vasconcelos *et al.*, 2011).

Dans cette partie, l'amélioration de la solubilité d'un PA par l'obtention d'une dispersion solide (SD) dans une forme galénique sera développée. L'aspect structural, les procédés de fabrication, les types de support et les caractérisations des SD seront ainsi définis. Après avoir donné les raisons pour lesquelles ces dernières sont peu stables et ne sont encore que très peu rencontrées dans les formulations pharmaceutiques ; les CD et les avantages de leur utilisation dans les formes pharmaceutiques seront exposés afin d'expliquer l'intérêt de les incorporer dans des SD.

3.1 Les dispersions solides

3.1.1 **Aspect structural et classification**

En 1971, Chiou and Riegelman définissent les dispersions solides (SD) comme la dispersion d'un ou de plusieurs PA dans une matrice solide inerte hydrosoluble, préparée par fusion, évaporation de solvant ou fusion/évaporation de solvant (Chiou and Riegelman, 1971). Autrement dit, les SD sont caractérisées par des molécules actives dispersées dans un support inerte. De nombreuses revues relatent de l'utilisation des SD comme un système améliorant la solubilité des molécules peu solubles en milieu aqueux (Démuth *et al.*, 2015 ; Leuner and Dressman, 2000 ; Serajuddin, 1999 ; Vasconcelos *et al.*,2011 ; He and Ho, 2015 ; Van den Mooter, 2012 ; Baghel *et al.*, 2015 ; Lewis *et al.*, 2009). Les SD sont classées en fonction de l'état cristallin du PA et du support inerte utilisés (Tableau 14) (Leuner and Dressman, 2000 ; Laitinen *et al.*, 2014 ; Lewis *et al.*, 2009 ; Kim *et al*., 2011). La première génération de SD est caractérisée par l'utilisation d'un support cristallin et regroupent les mélanges eutectiques et les solutions solides. Elles sont thermodynamiquement stables mais l'état cristallin de ces systèmes limite l'amélioration de la dissolution. Les dispersions solides de 2ème génération utilisent un support inerte amorphe et regroupent les solutions et suspensions amorphes. Elles vont permettre d'offrir une meilleure efficacité de libération du PA mais seront thermodynamiquement instables.

Tableau 14 : Types et caractéristiques de SD.

Type de dispersion solide	Etat physique du support	Etat physique du PA	Description
Mélange eutectique	Cristallin	Cristallin	Les deux composés sont totalement miscibles à l'état liquide mais présentent une miscibilité limitée à l'état solide. Elles sont formées par solidification rapide du mélange de deux composés fondus. Au point eutectique, le mélange est constitué des deux composants sous forme de fins cristaux.
Solution solide cristalline	Cristallin	Molécules de PA dispersées	Les solutions solides sont constituées d'un soluté solide dissous dans un solvant solide. Elles sont classées en fonction de la miscibilité entre les deux composants. Au-dessus de la température eutectique, chaque composant sera capable de solubiliser l'autre dans certaines proportions.
Solution amorphe	Amorphe	Molécules de PA dispersées	Le PA est totalement dissous dans la matrice. Ainsi, les molécules de PA seront dispersées dans le support amorphe. Les solutions amorphes sont caractérisées par une seule phase homogène.
Suspension amorphe	Amorphe	Amorphe	Cette forme est observée lorsque le PA n'est pas totalement soluble dans la matrice. Les particules de PA amorphe seront dispersées dans une matrice polymérique. Le système sera caractérisé par une phase de PA amorphe séparée de la phase amorphe du support.

Le profil de libération d'un PA sous forme de SD dépend des propriétés du support et du PA. Les paramètres tels que le poids moléculaire et la composition du support d'accueil, ainsi que la cristallinité, la porosité et la mouillabilité des particules de PA peuvent permettre d'améliorer la biodisponibilité de celui-ci (Vasconcelos *et al.*, 2007). L'amélioration de la solubilité du PA par l'utilisation des SD est due à différents facteurs (Leuner and Dressman, 2000 ; Craig D, 2001 ; Vasconcelos *et al.*, 2007):

- ✓ *La réduction de la taille des particules à l'état moléculaire :* Lorsque le PA est dispersé à l'état moléculaire dans la matrice, le stade le plus élevé en terme de réduction de taille des particules est atteint. La surface spécifique des particules est très élevée entraînant ainsi une augmentation de la vitesse de dissolution. Lors du contact avec le fluide gastro-intestinal, une partie du PA sous forme de SD est libérée immédiatement pour saturer le milieu de dissolution. Ces médicaments sont présentés sous forme de solutions sursaturées après dissolution du système rendant ainsi leur absorption plus rapide.
- ✓ *L'augmentation de la mouillabilité des particules* : L'amélioration de la mouillabilité des particules de PA est obtenue grâce au support utilisé (exemple : PEG, PVP) et contribue largement à l'amélioration de la solubilité. Les transporteurs peuvent influencer le profil de dissolution du PA par dissolution directe ou effet de co-solvant. De plus, des travaux ont montré l'intérêt de l'inclusion d'agents tensio-actifs pour renforcer l'importance de cette propriété (Ghebremeskel *et al.*, 2007).
- ✓ *La porosité élevée des particules* : Les particules de PA dispersées dans un support sous forme de dispersions solides, se sont révélées avoir un degré de porosité élevé. L'augmentation de la porosité permet d'obtenir une libération rapide du PA améliorant sa biodisponibilité. L'augmentation de la porosité dépend aussi des propriétés du support : par exemple, des dispersions solides contenant des polymères linéaires produisent des particules plus grosses et plus poreuses que ceux contenant des polymères réticulés et, par conséquent, conduisent à un taux plus élevé de dissolution.
- ✓ *L'état amorphe du PA* : Lorsque les PA peu solubles se trouvent à l'état amorphe, ils ont une solubilité apparente plus élevée. L'amélioration de la libération d'un PA peut généralement être réalisée en l'utilisant sous sa forme amorphe, parce qu'aucune énergie n'est nécessaire pour briser le réseau cristallin au cours du processus de dissolution.

De nos jours, la recherche se concentre plutôt sur le développement de SD de 2ème génération, avec le PA sous forme amorphe, car elles offrent une solubilité accrue. En effet, le facteur permettant d'augmenter considérablement la dissolution d'un PA faiblement hydrosoluble est attribué à l'état amorphe du PA (Kim *et al.*, 2011). Ainsi, les SD amorphes, en augmentant la solubilité apparente et la vitesse de dissolution, peuvent générer des solutions très concentrées. Elles sont décrites comme des systèmes de libération de solution sursaturée (Brouwers *et al.*, 2008) qui permettront de rendre disponible une quantité importante de PA et

d'améliorer ainsi leur biodisponibilité. Il s'agit d'un système dans lequel le PA sera présent à une concentration supérieure à sa solubilité. Le degré de saturation (S) est déterminé par la relation suivante :

$$S = {}^{C}/_{C_{eq}}$$

Avec C_{eq} = Concentration de la solubilité à l'équilibre.

Ainsi, lorsque S<1, la solution est insaturée, S=0, la solution est saturée et S=1, la solution est dite sursaturée. Les SD peuvent générer des solutions sursaturées en particulier lorsque le PA est amorphe ou sous forme de molécules dispersées car la libération du PA sera uniquement dépendante de la dissolution du support hydrophile.

3.1.2 **Procédés de fabrication des dispersions solides**

Trois méthodes de fabrication sont rencontrées pour la fabrication de SD (Sandhu H *et al.*, 2014) :

- ✓ Méthode de fusion ;
- ✓ Méthode des solvants ;
- ✓ Association des méthodes de fusion et des solvants.

3.1.2.1 *Procédés de fabrication issus de la fusion*

La méthode de fusion a été proposée par Sekiguchi et Obi en 1964 pour la préparation de formes à libération rapide. Elle consiste à chauffer le PA et le support jusqu'à leur fusion. Le mélange fondu est alors refroidi et solidifié rapidement en effectuant une trempe pour maintenir l'état amorphe. Cette méthode est directe et donc plus économique. L'inconvénient est que beaucoup de substances, PA ou transporteurs, peuvent se décomposer ou s'évaporer au cours du procédé de fusion à haute température. Ce problème d'évaporation peut être évité si le mélange physique est chauffé dans un récipient fermé hermétiquement (Chiou and Riegelman, 1971). Plusieurs techniques impliquant la fusion sont utilisées pour la formation de dispersions solides (Keen *et al.*, 2013) :

- ✓ L'atomisation du mélange fondu avant une congélation des gouttelettes ;
- ✓ L'extrusion en phase chauffante ;
- ✓ La fusion du mélange au-dessus du point eutectique suivie d'une trempe thermique ;
- ✓ L'injection d'un mélange fondu sur un support par « hot melt coating ».

3.1.2.2 *Procédés de fabrication par voie liquide*

La méthode des solvants a été décrite pour la première fois par Tachibana and Nakamura en 1965 avec la solubilisation de β-carotène et de PVP dans du chloroforme conduisant à l'obtention de dispersions solides. Cette technique est basée dans un premier temps sur la solubilisation du PA et du support dans un même solvant. L'évaporation du solvant conduira alors à la formation de particules solides. Différents procédés sont utilisés pour évaporer le solvant, tels que :

- ✓ La nébulisation ;
- ✓ La lyophilisation ;
- ✓ La granulation en lit fluidisé/ film coating ;
- ✓ Les technologies basées sur les fluides supercritiques.

D'autres techniques sont utilisées par voie liquide telles que la co-précipitation et l'électrospinning.

Le principal avantage des procédés utilisant la méthode des solvants est que ces derniers se font à des températures faibles. Ainsi les risques liés à la dégradation thermique du PA et du support seront évités. Cependant, ces méthodes présentent de nombreux inconvénients tels que la difficulté à éliminer totalement le solvant, l'éventuel effet négatif de la quantité supposée négligeable du solvant sur la stabilité chimique du médicament ou encore la sélection d'un solvant commun (Chiou and Riegelman, 1971).

3.1.2.3 *Procédés de fabrication associant les méthodes par fusion et voie liquide*

La combinaison des méthodes de fusion et d'évaporation de solvant consiste à dissoudre le PA dans un solvant approprié et de l'incorporer dans le mélange d'excipients fondu avant que le solvant ne soit extrait (Hallouard *et al.*, 2016). Cette méthode offre deux avantages :

- ✓ La température est inférieure et le temps de mélange est plus court que dans le procédé par fusion ce qui protège le PA contre la dégradation thermique ;
- ✓ Le support à l'état fondu est plus facilement dispersé et dissous dans le solvant par rapport à la méthode par voie liquide.

Cette combinaison permet ainsi de réunir les avantages des deux procédés de fabrication.

3.1.3 Les polymères comme support des dispersions solides de 2ème génération

Les polymères sont les supports utilisés pour la fabrication des SD de 2ème génération. Les propriétés qu'ils doivent remplir au mieux pour promouvoir les caractéristiques désirées du système sont décrites dans le Tableau 15 (Janssens and Van den Mooter, 2009).

Tableau 15 : Propriétés idéales du support des dispersions solides.

Sécurité	Préparation	Libération	Stabilité
Inerte Généralement reconnu comme sans danger (GRAS)	✓ *Méthode de fusion* : Thermiquement stable et thermoplastique ✓ *Méthode des solvants* : soluble dans les solvants organiques	Soluble dans l'eau Propriétés de solubilisation et de stabilisation	Tg élevée Donneur/accepteur d'hydrogène

Le choix du polymère pour la formation de dispersions solides est essentiel car il peut engendrer et maintenir l'état amorphe du PA avec les avantages suivants (Démuth *et al.*, 2015) :

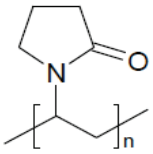
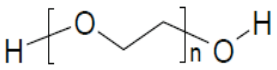
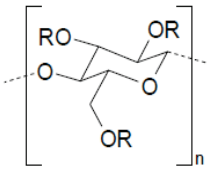
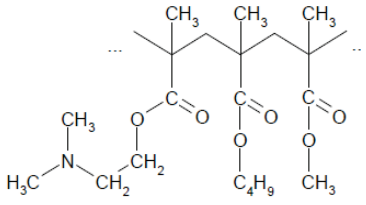
- ✓ *Amélioration de la dissolution du PA* que ce soit en terme de rapidité et de quantité libérée par rapport à la forme cristalline car il n'y a pas de barrières d'énergie à surmonter ;
- ✓ *Augmentation de la surface spécifique des particules*, qui selon l'équation de Nernst-Brunner/Noyes-Whitney, permet de promouvoir la dissolution ;
- ✓ *Augmentation de la mouillabilité du PA* ;
- ✓ *Inhibition de la cristallisation du PA* dans le tractus gastro-intestinal. En effet, l'utilisation d'un polymère approprié permettrait de maintenir la sursaturation du PA augmentant ainsi sa solubilité.

De plus, la formation d'interactions chimiques ou physiques entre le polymère et les noyaux moléculaires ou les cristallites, permettrait d'inhiber la recristallisation (Six *et al.*, 2005). L'utilisation des polymères permet d'augmenter la durée de vie des formes amorphes en immobilisant et en isolant le PA amorphe dans son état vitreux. Les polymères protègent l'état amorphe du PA de plusieurs façons (Démuth *et al.*, 2015) :

- ✓ Rôle de barrière physique ;
- ✓ Augmentation de la Tg du mélange par vitrification ;
- ✓ Formation d'interactions spécifique PA-polymère ;
- ✓ Augmentation de l'énergie d'activation pour retarder la nucléation de l'état cristallin (Marsac *et al.*, 2006).

Quelques exemples de polymères (naturel et synthétique) utilisés pour la fabrication des SD de 2ème génération sont répertoriés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Polymères utilisés pour la fabrication des dispersions solides.

Polymère	Structure	Références
Polyvinylpyrrolidone (PVP)		(Broman *et al.*, 2001; Marsac *et al.*, 2006 ; Chan *et al.*, 2015)
Polyéthylène Glycol (PEG)		(Li and Chiapetta, 2008; Meng *et al.*, 2015 ; Karavas *et al.*, 2007)
Dérivés de la cellulose (Hydroxypropylméthylcellulose, Hydroxypropylcellulose)	 R = $CH_2CH(OH)CH_3$	(Parikh *et al.*, 2015; Kono *et al.*, 2008 ; Jang and Kang, 2014)
Polyacrylates et polyméthacrylates		(Prasad *et al.*, 2014; Li and Chiapetta, 2008, Parikh *et al.*, 2015)

3.1.4 Caractérisations des dispersions solides

L'analyse des formes galéniques contenant des SD est complexe du fait de l'hygroscopicité des matériaux amorphes tels que les polymères et de la présence de nombreux excipients dans la formule finale (Paudel *et al.*, 2014). Les caractérisations qualitatives et quantitatives des

dispersions solides requièrent l'utilisation d'une large gamme de techniques d'analyses permettant de comprendre la mobilité moléculaire, la miscibilité, la séparation de phases, la cristallinité, le taux d'humidité résiduelle et les interactions moléculaires du système étudié. Les analyses répertoriées dans la Figure 23 permettent de caractériser les propriétés physicochimiques des dispersions solides (Paudel *et al.*, 2014 ; Guo *et al.*, 2013 ; Bugay, 2000 ; Baird and Taylor, 2012). La combinaison de plusieurs techniques d'analyses permet d'apporter une meilleure compréhension de ces systèmes.

L'objectif principal de la caractérisation des SD amorphes est de détecter la présence de cristaux pouvant altérer la biodisponibilité du PA. Pour se faire, les techniques les plus couramment utilisées sont la calorimétrie différentielle à balayage (DSC), la diffraction des rayons X (DRX) et la microscopie polarisante. Ces techniques permettront ainsi de suivre l'émergence de cristaux pouvant apparaître lors de la fabrication ou de la conservation des SD amorphes. Cependant, il est aussi intéressant et important de déterminer les facteurs induisant la cristallisation dans le but de prévenir ce phénomène. Pour cela, les facteurs tels que les interactions présentes dans le système et la miscibilité entre les composants seront importants à caractériser afin d'identifier les compatibilités entre les différents constituants. Ainsi, les techniques spectroscopiques (FT-IR et Raman) permettront de mettre en évidence des interactions entre le support et le PA. La détermination de la miscibilité entre les composants sera permise par la caractérisation de la ou des température(s) de transition vitreuse des constituants par DSC ou DSC modulée. Enfin, des études de dissolution dans des milieux simulant les conditions physiologiques permettront de caractériser le mécanisme de libération du PA à partir des SD amorphes.

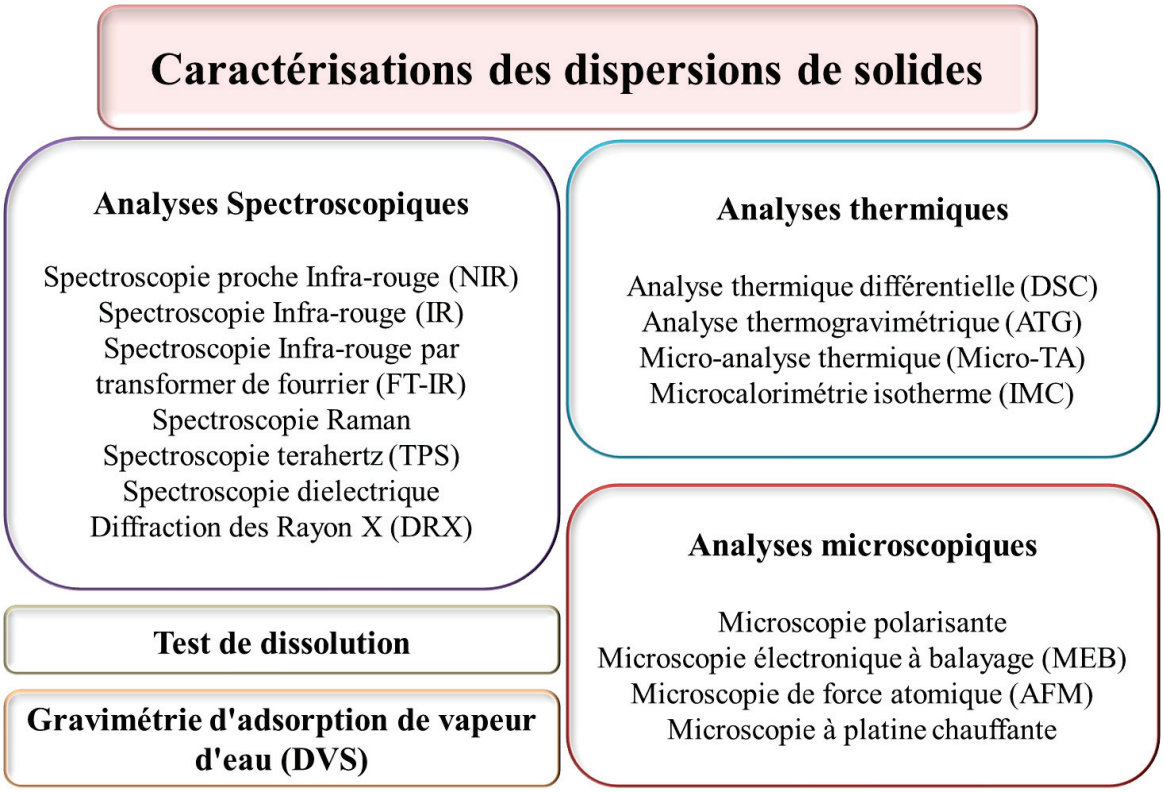


Figure 23 : Techniques d'analyses utilisées pour la caractérisation des dispersions solides.

3.1.5 Mécanisme de libération du PA à partir des dispersions solides

Les tests de dissolution sont utilisés pour prédire le profil de libération d'une formulation *in vivo*. Cependant, il est difficile d'établir une corrélation *in vitro*/*in vivo* car plusieurs processus complexes se déroulent simultanément lors de la dissolution. En effet, la dissolution du PA va être influencée par deux mécanismes : sa diffusion à travers le support et la libération contrôlée du support (Hallouard *et al.*, 2016). Ils se déroulent de façon simultanée mais dans des proportions différentes en fonction du système obtenu.

La vitesse de dissolution du support influence la libération des SD amorphes. En effet, celle-ci peut être rapide entraînant une libération massique du PA dans le milieu de dissolution (solution sursaturée). Mais le support hydrophile peut aussi mettre du temps à se désintégrer et, dans ce cas, deux mécanismes régissent la libération du PA : l'érosion de la matrice et sa dissolution lente. Dans le cas d'une dissolution lente, le phénomène de diffusion du PA est majoritaire. De plus, si le PA et le support sont bien dispersés dans la structure interne du système, la libération contrôlée du support via le phénomène de diffusion du PA à travers la matrice sera favorisé. Au contraire, si le PA et le support sont sous forme de particules séparées, l'érosion de la SD peut devenir le mécanisme prédominant dans la libération du PA.

La diffusion du PA se déroule en deux étapes, la première est caractérisée par l'absorption de l'eau à la surface du support induisant la formation d'une couche de support ou de gel autour de la dispersion solide. La diffusion du PA va dépendre de la viscosité ou de l'épaisseur de la couche enrobant la SD. Le PA doit ensuite diffuser à travers cette couche. Cette étape sera influencée par la solubilité du PA, la taille des particules et l'état du polymorphe (amorphe ou cristallin).

Ainsi, une fois que les SD sont en contact avec le milieu de dissolution, 3 scénarii sont observés (Baghel *et al.*; 2016) (Figure 24) :

- ✓ *1er scénario* : Les particules qui englobent le PA se solubilisent rapidement en une solution sursaturée suivie par la formation de nano-agrégats (amorphe et cristallin) de PA encore décorés par du polymère.
- ✓ *2ème scénario* : Une libération partielle du PA et de la matrice se fait progressivement mais le PA non solubilisé reste à l'état amorphe.
- ✓ *3ème scénario* : Le PA et la matrice sont libérés progressivement mais dans ce cas, le PA tend à cristalliser en raison de sa plastification sous l'effet de l'eau.

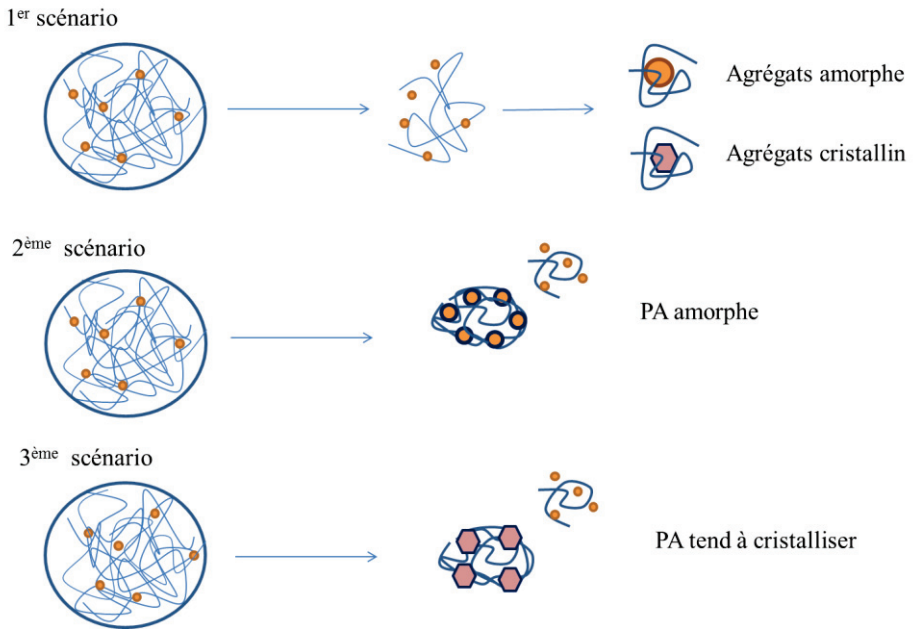


Figure 24 : Profil de dissolution des dispersions de solides. (Schéma adapté de Baghel *et al.*).

Globalement, le profil de libération général pour les SD est appelé « Spring and parachute ». Dans un premier temps, le PA est dissous en même temps que la matrice de polymère produisant une solution sursaturée (spring). Ensuite, la concentration en PA subit un déclin

(parachute) dans le milieu de dissolution en raison de son absorption ou de sa précipitation (3ème scénario). La concentration du PA libéré dans le milieu de dissolution dépendra de la solubilité du PA à l'état amorphe et cristallin. Cette solubilité dépend de plusieurs paramètres tels que la vitesse de cristallisation du PA, les interactions PA-polymère et le ratio PA-polymère. Ainsi, le profil de libération du PA sous forme SD dépend de la capacité du polymère à maintenir la sursaturation du milieu sans que les particules ne précipitent afin que le PA ait le temps d'être absorbé.

3.1.6 **Stabilité**

La formation de dispersions solides pour l'amélioration de la solubilité des molécules peu hydrosolubles est une stratégie pertinente et une approche attractive. Cependant, maintenir ces systèmes stables est un véritable challenge (Figure 25). En effet, l'état amorphe est un état métastable qui tend à vouloir se réorganiser spontanément en cristaux pour atteindre l'état cristallin plus stable thermodynamiquement. La cristallisation est favorisée thermodynamiquement car l'enthalpie libre de Gibbs est plus élevée pour les systèmes amorphes que cristallins lorsque la température est inférieure à la température de fusion. Ainsi, cet état vitreux tend à vouloir retrouver un état ayant une enthalpie et une entropie plus faibles. La différence d'enthalpie libre de Gibbs ($\Delta G(T)$) entre un liquide en surfusion et un état cristallin est donnée par l'équation de Gibbs :

$$\Delta G(T) = \Delta H(T) - T\Delta S(T)$$

Avec H=Enthalpie ; S=Entropie ; T=Température.

La cristallisation peut se produire lors de la fabrication, le stockage et la dissolution des dispersions solides amorphes. Deux principaux facteurs jouent un rôle important dans la cristallisation : la température et l'humidité. En effet, d'après l'équation de Gibbs, la température a un effet direct sur l'enthalpie libre : quand T augmente, ΔG diminue conduisant ainsi à une réorganisation plus stable du système sous forme de cristaux. Mais la température peut également avoir une influence sur la mobilité moléculaire. La mobilité moléculaire est un phénomène cinétique caractérisé par les mouvements rotationnels et transitionnels des molécules (Kou and Zhou, 2014). La mobilité moléculaire détermine la stabilité et la réactivité des matériaux amorphes. En effet, la séparation des phases et la cristallisation comprennent la diffusion et la nucléation, qui exigent tous deux une mobilité moléculaire suffisante (Kou and Zhou, 2014 ; Janssens and Van den Mooter, 2009 ; Baghel *et al.*, 2016 ; Baird and Taylor, 2012). La mobilité moléculaire est principalement influencée par :

- ✓ *La température* : Lorsque la température est supérieure à la température de transition vitreuse, une relaxation structurelle est observée conduisant rapidement à une séparation de phase et une augmentation du potentiel de cristallisation. De plus, l'augmentation de la température de la matrice PA-polymère peut réduire le degré d'interactions entre les deux composants affectant les liaisons hydrogènes. Une perte des interactions diminue la miscibilité des composants contribuant ainsi à la recristallisation.
- ✓ *L'humidité ou la présence d'eau lors de la fabrication et la conservation* : Les solides amorphes peuvent interagir avec l'eau par deux mécanismes, l'adsorption et l'absorption. Or, l'eau a un effet plastifiant sur les dispersions solides conduisant à une diminution de la Tg du système et donc à une augmentation du risque de recristallisation. De plus, l'effet plastifiant entraîne une diminution des forces mécaniques, de la viscosité et augmente la mobilité moléculaire favorisant la recristallisation.

Afin de conserver l'état amorphe, il est donc nécessaire d'éviter d'augmenter la mobilité moléculaire du PA.

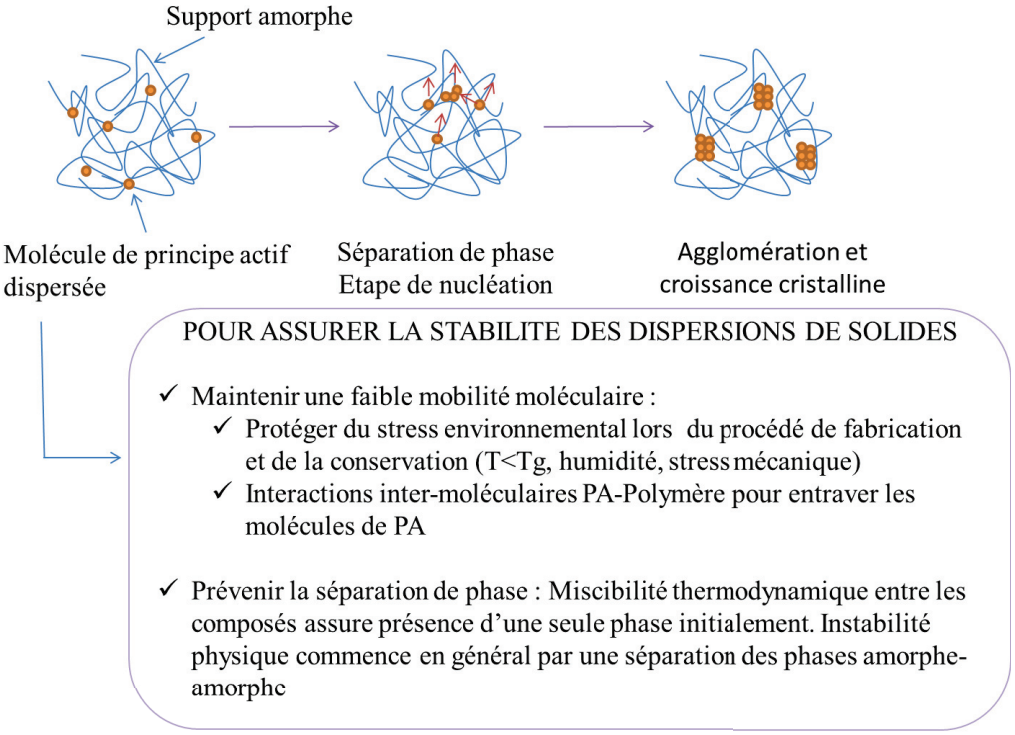


Figure 25 : Cristallisation des dispersions solides (Janssens and Van den Mooter, 2009).

Aujourd'hui, plusieurs facteurs contribuent à l'observation d'une instabilité des dispersions solides amorphes lors de leur développement (Janssens and Van den Mooter, 2009):

- ✓ Un manque de maîtrise des propriétés physicochimiques du PA, du support, des autres excipients et des interactions entre ces différents composés ;
- ✓ Un manque de technologies fiables pour la prédiction de la stabilité de la formulation amorphe avec une quantité limitée d'échantillons ;
- ✓ Des difficultés de transposition d'échelles du procédé de fabrication.

Le manque de maîtrise de la stabilité des SD amorphes explique le peu de spécialités médicamenteuses contenant ce type de système malgré les avantages qu'elles peuvent offrir.

3.1.7 **Conclusion**

La formulation d'un PA, insoluble ou peu soluble en milieu aqueux, sous forme de SD amorphes permet d'améliorer ses propriétés de dissolution. En effet, selon la méthode de fabrication et le support utilisés, le PA va subir différentes modifications (diminution de la taille des particules, passage d'un état cristallin à un état amorphe, etc…) conduisant à une amélioration de la vitesse et du taux de dissolution du PA. Les SD amorphes représentent une approche attractive pour améliorer considérablement la dissolution d'une molécule peu soluble dans l'idée d'améliorer sa biodisponibilité. Cependant, la difficulté à maintenir et prévoir la stabilité de ces systèmes, tant lors de la fabrication et le stockage que lors de la libération du PA, est un facteur limitant dans le développement de formes galéniques composées de SD amorphes. Une 3ème génération de dispersions solides a donc vu le jour pour pallier les limites des SD de 2ème génération. Les dispersions solides de 3ème génération sont des SD amorphes dans lesquelles un additif supplémentaire va être ajouté pour augmenter les performances biopharmaceutiques du système sursaturé. Les additifs utilisés peuvent être : des polymères de nature différente, des tensioactifs, des auto-émulsifiants ou encore des agents de complexation (Hallouard *et al.*, 2016). Par exemple, le développement de systèmes ternaires composés de deux polymères hydrophiles (Prasad *et al.*, 2014) montre que l'association PVP K90/Eudragit® E100 améliore la stabilité et la dissolution de l'indométacine (IND) par rapport aux systèmes binaires IND/PVP K90 et IND/Eudragit® E100 par effet synergique. La dissolution pourra être accrue par l'ajout d'agents émulsifiants (ex. acide cholique) dans le système car ils permettront d'améliorer la mouillabilité du PA (Kim *et al.*, 2011). Ou encore par l'incorporation d'acides organiques (acide citrique, acide

fumarique) dans un système PA-Polymère permettant d'augmenter le taux de dissolution (Tran *et al.*, 2010). En effet, l'utilisation d'acides organiques dans la formulation va fournir un environnement favorable à la formation de liaisons hydrogènes entre le PA et le polymère et à l'obtention d'une structure amorphe.

Une autre approche semble intéressante pour stabiliser les SD : l'incorporation d'agent d'inclusion/complexation tels que les cyclodextrines (CD). En effet, en formant une barrière chimique autour des molécules de PA, les CD permettraient de prévenir l'agglomération des du PA dans la formulation et sa précipitation lors de la dissolution (Brouswers *et al.*, 2009). De plus, les CD améliorent la dissolution de PA peu hydrosolubles (Loftsson and Brewster, 1996 ; Liu and Guo, 2001). Ainsi, l'ajout de CD dans les DS pourrait accroître la dissolution du PA par effet synergique. Dans la partie suivante, les caractéristiques des CD, le mécanisme de complexation et leurs intérêts dans le domaine de la formulation de médicaments seront développés afin de justifier l'intérêt de mettre au point un système ternaire PA-Polymère-CD.

3.2 Les cyclodextrines

3.2.1 **Structure des complexes d'inclusion et application dans le domaine pharmaceutique**

Les cyclodextrines (CD) ont été découvertes par hasard en 1891 par Villiers lors d'une expérience où ce dernier souhaitait réduire des dextrines par l'action d'une bactérie appelée *Bacillus amylobacter*. Au début du XXème siècle, Shardinger isole la bactérie responsable de la fabrication des CD et découvre plusieurs types de CD sans en connaître la structure. C'est en 1935 que leur structure est enfin définie (Kurkov and Loftsson, 2013). Il existe un nombre important de revues pertinentes sur les cyclodextrines et leurs particularités (Loftsson and Brewster, 1996 ; Davis and Brewster, 2004 ; Brewster and Loftsson, 2007 ; Loftsson and Duchêne, 2007 ; Carrier *et al.*, 2007 ; Ostero-espinar *et al.*., 2010 ; Loftsson and Brewster, 2010 ; Loftsson and Brewster, 2011 ; Loftsson and Brewster, 2012 ; Kurkov and Loftsson, 2013 ; Mura, 2014 ; Mura, 2015 ; Jambhekar and Breen, 2016). Les CD sont des oligosaccharides macrocycliques composés respectivement de 6,7 ou 8 unités glycosidiques pour l'α-CD, la β-CD et la γ-CD. Ces CD natives sont caractérisées par une structure de cône tronquée avec une cavité de nature hydrophobe et une surface hydrophile (Figure 26). Les fonctions hydroxyle de ces molécules sont orientées vers l'extérieur du cône alors que la cavité centrale est bordée par les carbones du squelette et les ponts osidiques des résidus de glucose leur conférant un caractère lipophile. En raison de sa forme et sa structure

moléculaire, la cyclodextrine présente la capacité unique de piéger une molécule hôte à l'intérieur de sa cavité et d'agir comme un récipient moléculaire. Les CD peuvent interagir avec des molécules de taille appropriée formant alors des complexes d'inclusion.

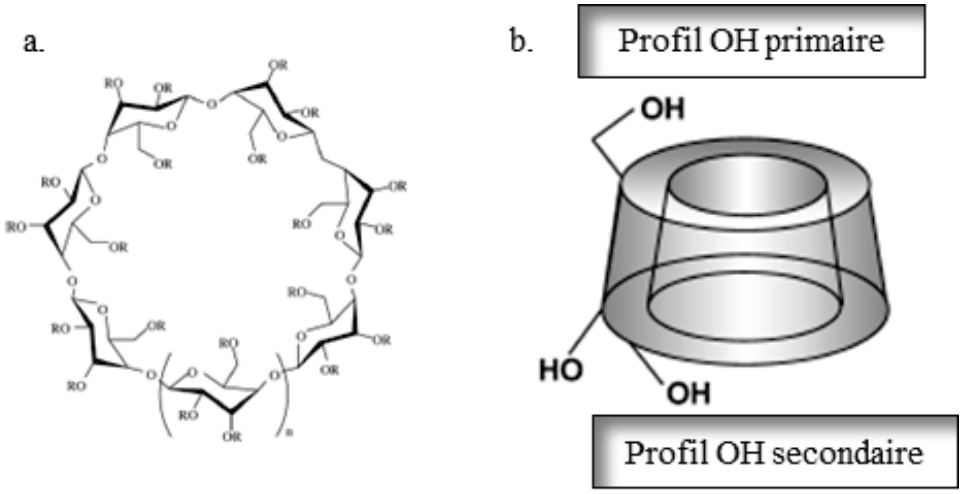
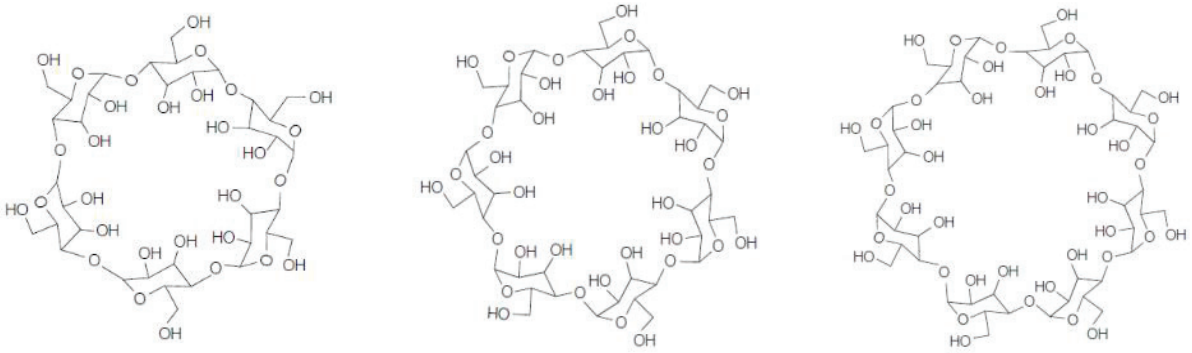


Figure 26 : Représentations chimique (a) et toroïdale (b) d'une cyclodextrine.

3.2.2 Les cyclodextrines et leurs dérivés

Il existe trois types de CD naturelles : α, β, γ, selon le nombre de groupements glycosidiques constituant la molécule et qui leur confère un diamètre de cavité plus ou moins large (Figure 27).



α-CD β-CD γ-CD

Figure 27 : Structure moléculaire de l'α, β, γ-CD.

Les caractéristiques des CD naturelles sont données dans le Tableau 17. La solubilité des CD naturelles est limitée du fait de la présence de liaisons intermoléculaires fortes à l'état cristallin. Cela est particulièrement vrai pour la β-CD constituée d'un plus grand nombre de

groupements hydroxyles capables de former un réseau intermoléculaire entre les liaisons hydrogènes des hydroxyles secondaires (Davis and Brewster, 2004).

Tableau 17 : Caractéristiques des cyclodextrines naturelles.

	Nombre d'unités glycosidiques	Poids moléculaire (Da)	Diamètre de la cavité (Å)	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/ml)
α-CD	6	972	4.7-5.3	145
β-CD	7	1135	6.0-6.5	18.5
γ-CD	8	1297	7.5-8.3	232

Afin d'améliorer la solubilité des CD naturelles, la substitution chimique par des groupements méthyles (éthérification) ou autres sur les fonctions hydroxyles en position 2, 3 et 6 vont permettre d'obtenir des CD modifiées beaucoup plus solubles dans l'eau. L'amélioration de la solubilité des CD s'explique par la diminution des liaisons hydrogène intermoléculaires et l'état cristallin des CD modifiées. En effet, la substitution des hydroxyles se fait de façon aléatoire entraînant la formation de composés isomériques caractérisés par une structure amorphe. Par exemple, la solubilité de l'hydroxypropyl-β-CD (HPβ-CD) est supérieure à 600 mg/ml ou encore l'hydroxypropyl-γ-CD (HPγ-CD) présente une solubilité supérieure à 500mg/ml.

3.2.3 Applications et utilisations des CD naturelles et modifiées dans le domaine pharmaceutique

Le statut réglementaire des CD est toujours en évolution. L'α- et la β-CD possèdent des monographies dans les Pharmacopées Américaine (USP/NF), Européenne (Ph.Eur.) et Japonaise (JPC) ; la γ-CD est uniquement référencée dans le JPC et sera bientôt intégrée dans la Pharmacopée Américaine. Concernant les CD modifiées, seule l'HPβ-CD est listée dans les Pharmacopées Américaine et Européenne (Jambhekar and Breen, 2016 ; Jansook and Loftsson, 2009). Kurkov and Loftsson ont montré la répartition des types de CD utilisés parmi 30 produits commercialisés. La β-CD est majoritairement employée (54,8%) malgré sa faible solubilité, du fait de son bas prix. Les cyclodextrines modifiées (HPβ-CD, HPγ-CD, Sulfobutylether-β-CD, Randomly methylated-β-CD) grâce à leur haute solubilité dans l'eau, représentent 1/3 des produits présents sur le marché (Kurkov and Loftsson, 2013).

Les complexes d'inclusion fabriqués à partir de CD représentent un fort intérêt dans le domaine pharmaceutique ; en effet, ils offrent plusieurs avantages (Jambhekar and Breen, 2016) :

- ✓ Augmenter la dissolution des molécules faiblement hydrosolubles pour améliorer leur biodisponibilité ;
- ✓ Masquer les caractères organoleptiques désagréables (goût) d'un PA (Sohi and Sultana, 2004) ;
- ✓ Protéger le PA des dégradations thermiques, oxydatives et de la lumière.

Ainsi, les CD sont présentes sur le marché à travers de nombreuses formes galéniques : comprimé, gélule, suspension, solution, spray nasal, suppositoire… ; car elles offrent des intérêts particuliers pour améliorer l'efficacité des traitements administrés par différentes voies (Brewster and Loftsson ,2010 ; Brewster and Loftsson, 2011):

- ✓ **Voie dermique et transdermique** : Les CD présentent un intérêt pour optimiser l'administration cutanée d'un PA, que ce soit pour une application locale ou systémique, en améliorant la perméation du PA à travers la barrière cutanée (Vega *et al.*, 2013 ; Loftsson *et al.*, 2007) ;
- ✓ **Voie ophtalmique** : L'utilisation des CD dans les préparations ophtalmiques permettrait de promouvoir la biodisponibilité des PA en améliorant leur solubilité en milieu aqueux et leur perméabilité pour augmenter la diffusion à travers la barrière de la couche cornée ophtalmique (Zhang *et al.*, 2016 ; Loftsson and Järvinen, 1999). Leur utilisation permet aussi d'éviter les suspensions ophtalmiques, particulièrement irritantes.
- ✓ **Voie nasale, buccale, rectale et pulmonaire** : La formulation de complexes CD-PA permettrait d'améliorer la diffusion des molécules à travers le mucus. En effet, la complexation, en modifiant les propriétés physico-chimiques du PA, faciliterait la répartition du PA à l'extérieur de la muqueuse et tout en permettant ainsi d'améliorer sa perméabilité à travers les membranes (Dufour *et al.*, 2015).
- ✓ **Voie orale** : Les intérêts d'utiliser des CD pour l'administration de médicaments par voie orale sont multiples. En effet, les complexes présentent l'avantage de pouvoir améliorer la biodisponibilité du PA en augmentant sa solubilité et sa vitesse de dissolution. Mais il a également été montré que les CD pouvaient améliorer la stabilité du PA tant lors de la formulation et du stockage que lors de son passage dans le tractus

gastro-intestinal. Enfin, les CD peuvent aussi permettre de masquer le goût du PA améliorant ainsi sa palatabilité (Szejtli and Szente, 2005).

De plus, les CD sont aussi utilisées dans les systèmes dispersés tels que les émulsions, les systèmes micro et nano particulaires, les liposomes mais elles peuvent aussi être développées comme des systèmes auto-assemblés (Ostero-Espinar *et al.*, 2010 ; Davis and Brewster, 2004 ; Vyas *et al.*, 2008). Ainsi, des complexes CD-PA sont intégrés dans des liposomes pour cumuler les avantages de chaque système ; à savoir, amélioration de la solubilité grâce aux CD et ciblage du site d'intérêt à l'aide des liposomes. Ou encore, l'incorporation de CD dans la formulation de nanoparticules permettrait d'augmenter la capacité d'encapsulation (Huarte *et al.*, 2016).

Du fait de leurs multiples propriétés, les CD sont très utilisées dans les formes galéniques présentent sur le marché et font l'objet de nombreuses recherches pour le développement des nouvelles formes pharmaceutiques.

3.2.4 **Complexation**

3.2.4.1 *Mécanisme de complexation*

Les CD sont constituées d'une enveloppe hydrophile et d'une cavité hydrophobe permettant d'accueillir tout ou une partie d'une molécule hydrophobe formant ainsi un complexe d'inclusion. La complexation est fortement influencée par la structure de la CD choisie et les propriétés physicochimiques du PA mis en jeu. Le facteur stérique est important car l'inclusion va dépendre de la taille relative de la cavité par rapport à la taille de la molécule invitée. En effet, si la molécule est trop grosse par rapport à la taille de la cavité, celle-ci ne pourra pas s'introduire dans la cavité ; à l'inverse si la molécule est trop petite, les interactions avec la CD seront trop faibles pour que le complexe puisse se former. De plus, la complexation est permise grâce aux interactions qui s'établissent entre les CD et le PA (interactions électrostatiques, Van der Waals, hydrophobes, liaisons hydrogène) et par une augmentation de l'entropie du système causée par la désolvatation de la cavité (Liu and Guo, 2001). Ainsi, en interagissant avec les molécules faiblement hydrosolubles, les CD améliorent leur solubilité apparente. En effet, durant la complexation, aucune liaison covalente n'est formée ou cassée, et les complexes en solution sont rapidement dissociés. En solution, un équilibre s'établit alors entre des molécules complexées et des molécules libres :

$$mCD + nPA \overset{Km:n}{\longleftrightarrow} CD_mPA_n$$

Où n molécules de PA interagissent avec m molécules de CD pour former un complexe ayant un ratio m:n.

Cet équilibre est régi par la constante de stabilité ($K_{m:n}$) qui est caractérisée par l'équation suivante :

$$K_{m:n} = \frac{[CD_mPA_n]}{[CD]^m \times [PA]^n}$$

$K_{m:n}$ permettra alors de comparer l'affinité de la molécule avec différentes cyclodextrines. Pour déterminer la valeur de la constante de stabilité d'un système CD-PA et la stœchiométrie à laquelle l'équilibre est atteint, la méthode de solubilité des phases décrites par Higuchi et Connors est utilisée (Higuchi and Connors, 1965). Elle consiste à tracer l'évolution de la solubilité apparente de la molécule peu soluble en présence d'une concentration en cyclodextrine croissante. Plusieurs diagrammes de phase de solubilité peuvent alors être observés (Figure 28) (Brewster and Loftsson, 2007):

- ✓ ***Le type A*** est généralement caractérisé par une augmentation de la solubilité apparente du PA en fonction de la concentration en cyclodextrine. Il peut être ensuite de type A_L lorsque la solubilité augmente linéairement en fonction de la concentration en CD ou de type A_P et A_N lorsque la droite de solubilité dévie respectivement de manière positive ou négative à partir d'une certaine concentration.
- ✓ ***Le type B*** regroupant deux profils B_s et B_i ; B_s où la solubilité apparente augmente dans un premier temps en fonction de la concentration en CD, suivie d'un plateau montrant que l'augmentation en CD n'a plus d'effet sur la solubilisation du PA, puis une phase de diminution de la solubilité indiquant la précipitation des complexes. Pour B_i, le plateau est directement atteint sans gain de solubilité et suivi de la perte de solubilité.

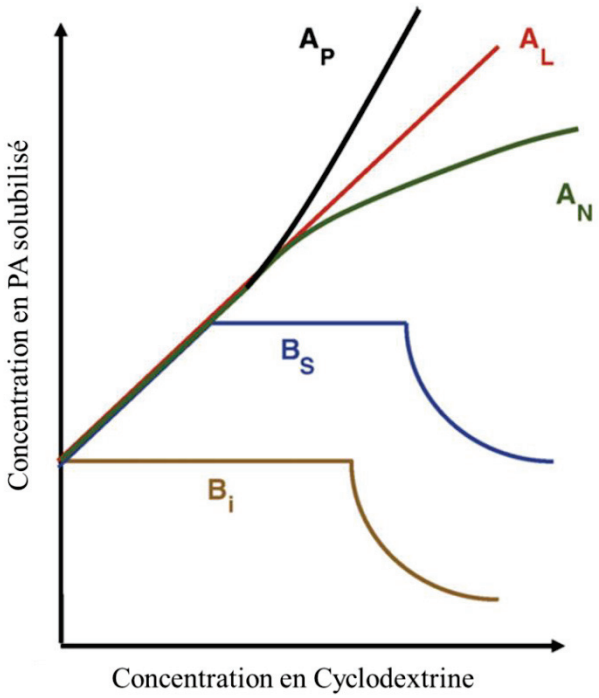


Figure 28 : Représentation graphique des profils de phase illustrant l'évolution de la solubilité en fonction de la concentration en cyclodextrine (Adapté de Loftsson and Brewster).

Cette méthode permet de décrire la façon dont la concentration en PA évolue sous l'effet des CD sans pouvoir expliquer de quelle façon la solubilité est améliorée. En effet, les cyclodextrines peuvent aussi former des complexes de non inclusion et des agrégats conduisant à la formation de système de type micellaire pouvant être à l'origine d'une augmentation de la solubilité (Loftsson and Brewster, 1996).

3.2.4.2 *Amélioration de la complexation*

Dans le domaine pharmaceutique, il va être important d'utiliser le moins de cyclodextrines possible car la quantité d'excipients dans une formulation galénique est limitée (Jambhekar and Breen, 2016). De plus, pour obtenir une amélioration optimale de la biodisponibilité d'un PA, il est recommandé de déterminer la quantité minimum de CD suffisante pour produire l'effet souhaité sans avoir de CD en excès (Loftsson and Brewster, 2012). De ce fait, il est intéressant de déterminer l'efficacité de complexation (EC) définit par la relation suivante :

$$EC = S_0 \times K_{m:n}$$

Avec S_0= solubilité apparente du PA et $K_{m:n}$=constante de stabilité.

Pour augmenter l'EC, plusieurs stratégies ont été décrites visant toutes à augmenter la solubilité du PA (Kurokov and Loftsson, 2013 ; Loftsson and Brewter, 2012 ; Jambhekar and Breen, 2016) :

- ✓ *L'ionisation d'un PA* faiblement hydrosoluble va permettre d'augmenter sa solubilité apparente (S_0) et donc d'améliorer l'efficacité de complexation ;
- ✓ *La formation de sel de PA acide ou basique*. Plus le sel formé sera soluble plus la complexation sera améliorée ;
- ✓ *La formation de système ternaire* est une stratégie intéressante pour améliorer l'efficacité de complexation. Ces systèmes sont constitués de trois entités, dont le PA et les CD, auxquels est ajouté un 3ème composé d'origine variable. Le composé le plus utilisé étant les polymères hydrophiles qui permettront de diminuer la cristallinité du PA et donc d'augmenter sa solubilité. L'incorporation d'un acide ou d'une base organique est aussi utilisée lorsque le PA est sous forme ionisé car les forces électrostatiques jouent un rôle important dans la complexation.

3.2.5 Caractérisations des complexes

L'étude de la complexation se fait en solution pour déterminer : i) la constante de stabilité ; ii) la stœchiométrie optimale en vue d'obtenir des complexes CD-PA et iii) caractériser le type de complexe. Pour se faire, la méthode Higuchi-Connors est utilisée (Cf partie 3.2.4.1 Mécanisme de complexation) pour établir le profil de solubilité. La quantité de PA solubilisé en présence des CD sera alors quantifiée par UV-Vis, en utilisant un spectromètre UV-Vis après avoir vérifié que les CD n'absorbaient et n'interféraient pas avec le spectre d'absorption du PA (Mady *et al.*, 2010 ; Di Cagno *et al.*, 2014). Par ailleurs, une technique de séparation telle que l'HPLC munie d'un détecteur UV-Vis, pourra être employée pour plus de précision et reproductibilité (Jug *et al.*, 2013 ; Mura, 2014). La formation de complexes d'inclusion en solution peut être étudiée par la mise en évidence d'interactions entre le PA et les CD. Plusieurs techniques chimiques et physiques peuvent être utilisées pour caractériser les complexes en solution telles que les techniques spectroscopiques et électro-analytiques (Mady *et al.*, 2010, Mura 2014). La résonnance magnétique nucléaire (RMN), est considérée comme l'une des techniques d'analyse les plus utiles pour étudier les interactions entre les CD et les molécules de PA. En effet, les spectres RMN permettent l'élucidation de la structure du complexe en solution, en fournissant des informations spécifiques sur l'orientation de la molécule hôte à l'intérieur de la cavité (Mady *et al.*, 2010 ; Jug *et al.*, 2013). Tandis que les

autres techniques (UV-Vis, dichroïsme circulaire, émission de fluorescence) ne peuvent fournir que des informations indirectes sur la structure moléculaire des complexes d'inclusion (Mura, 2014).

Les complexes d'inclusion peuvent aussi se trouver à l'état solide. Les complexes à l'état solide peuvent être obtenus de trois méthodes différentes :

- ✓ Méthode à l'état solide grâce au broyage du PA en présence des CD ;
- ✓ Méthode semi-solide dite de pétrissage du mélange physique PA-CD en présence d'un solvant organique ;
- ✓ Méthode en solution suivi d'une technique d'évaporation du solvant telle que la coacervation/précipitation, le spray-drying ou encore la lyophilisation.

Pour vérifier la formation de complexes d'inclusion à l'état solide, des techniques de caractérisation du solide sont employées (DRX, DSC, ATG, …) en association avec des techniques spectroscopiques. La procédure générale à suivre lors de l'utilisation de ces techniques consiste à comparer systématiquement les propriétés des composants individuels, leur mélange physique et les hypothétiques complexes formés. Le but étant de fournir des preuves de l'existence de différences entre les mélanges physiques et les complexes d'inclusion. Ainsi, les techniques spectroscopiques telles que la FT-IR (Bouchal *et al.*, 2014 ; Jambhekar *et al.*, 2004) et le Raman vont permettre de mettre en évidence et identifier les interactions CD-molécule hôte afin de déterminer la structure des complexes secs (Mura, 2015). Ces interactions pourront être indirectement observées par les techniques d'analyses du solide. En DSC, par exemple, les changements tels que la réduction, l'élargissement, le déplacement du pic de fusion du PA, seront représentatifs de la perte de structure cristalline du PA. Le rapport entre l'enthalpie de fusion du PA dans le mélange par rapport à celle du PA pur peut donner une indication quant à l'intensité des interactions CD-PA dans les différents échantillons. Cette démarche pourra alors être utilisée pour déterminer le ratio correspondant au maximum d'interactions dans un échantillon (Mura, 2015). Ainsi, la disparition totale du pic de fusion du PA pure est souvent utilisée comme une preuve de l'insertion complète de la molécule invitée dans la/les CD. Généralement, ce résultat sera confirmé par des analyses DRX, avec la disparition des pics caractéristiques du PA pur dans le diffractogramme du complexe formé (Taupitz *et al.*, 2013).

Les complexes d'inclusion peuvent donc être caractérisés en solution et à l'état solide. Des techniques appropriées permettront de détecter la présence d'interactions entre les molécules hôte et invitée et mettre en évidence les variations des propriétés chimiques et physiques du PA lors de sa complexation (Figure 29). Néanmoins, la combinaison de plusieurs techniques est essentielle pour assurer une bonne compréhension des complexes obtenus (Mura, 2014 ; Mura, 2015 ; Szente *et al.*, 2016).

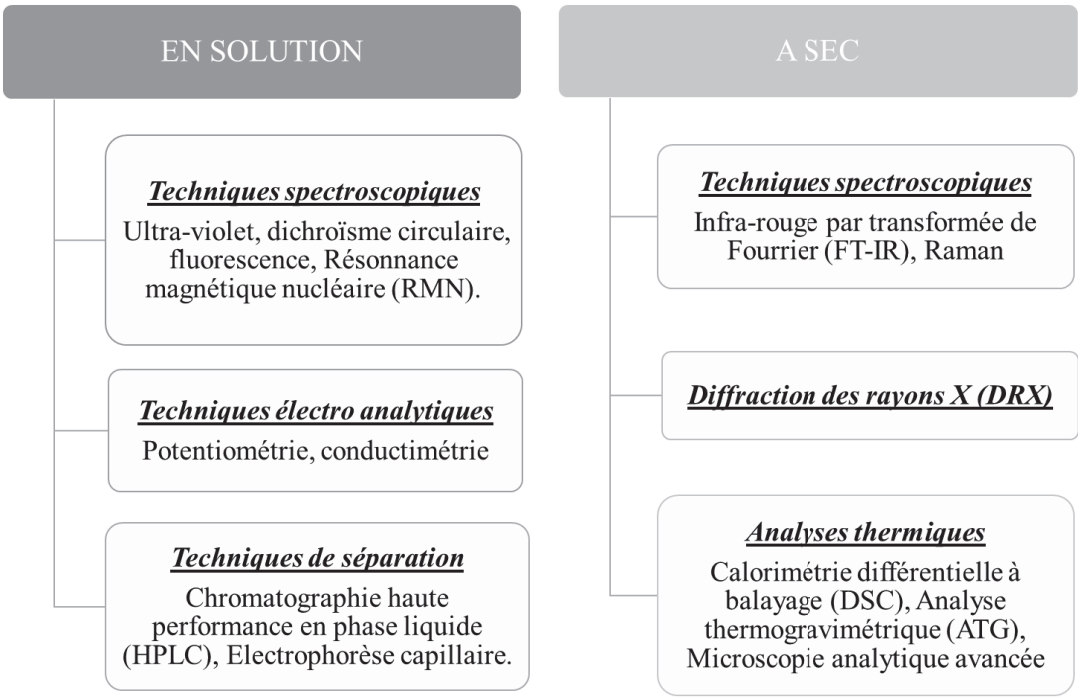


Figure 29 : Méthodes analytiques permettant la caractérisation des complexes à l'état solide ou en solution.

3.2.6 Dispersions solides de 3ème génération PA-Polymère-CD

La structure 3D des cyclodextrines, caractérisée par une enveloppe hydrophile et une cavité hydrophobe, offre de nombreux intérêts dans la formulation de médicaments. En effet, pour des molécules avec une faible biodisponibilité, les cyclodextrines ont la capacité d'améliorer la dissolution de PA peu solubles, soit en les piégeant dans leur cavité, soit en formant des systèmes auto-assemblés. De plus, elles seraient en mesure d'améliorer la perméabilité de certains PA à travers différentes barrières physiologiques (Brewster and Loftsson, 2010 ; Brewster and Loftsson, 2011). Ces avantages peuvent être mis à profit dans les SD amorphes. En effet, promouvoir la solubilité du PA et le maintien de l'état des dispersions solides amorphes lors de la dissolution par l'ajout d'additif(s) peut être une approche pertinente. On

parle ainsi de dispersions solides de 3ème génération. L'utilisation des cyclodextrines dans le développement de systèmes ternaires présente des perspectives intéressantes pour l'amélioration de la solubilité et de la stabilité des dispersions solides. En effet, les cyclodextrines sont utilisées comme agent solubilisant grâce à la formation de :

- ✓ Complexes d'inclusion pour piéger le PA ;
- ✓ Agrégats par la formation de complexes de non inclusion ;
- ✓ Systèmes micellaires.

Ainsi, l'incorporation de CD pourra augmenter la solubilité d'un système de dispersions solides binaire par effet synergique. Par exemple, Fatmi *et al.* (2015), ont étudiés l'amélioration du taux de dissolution de la camptothécine (CPT) dans trois systèmes : Complexes CPT/CD, dispersions solides de CPT dans une matrice de PEG 6000 et système ternaire CPT/CD/PEG 6000. Ils montrent alors que le taux de libération de la CPT pure ne dépasse pas 20% après 2h de dissolution en milieu gastrique et qu'avec les différents systèmes, le taux de libération obtenu était respectivement de 76%, 70% et 85% pour les complexes CPT/CD, la dispersion solide et le système ternaire.

De plus, les CD peuvent être utilisées comme des inhibiteurs de la précipitation du PA dans le cas des solutions sursaturées, par différents mécanismes (Brouwers *et al.*, 2009) :

- ✓ L'augmentation de la solubilité du PA va diminuer le degré de saturation et entraîner une altération de la cinétique de précipitation en formant une solution métastable ;
- ✓ La formation d'interactions avec le PA en solution par la formation de liaisons hydrogène ;
- ✓ L'inhibition de la nucléation et du grossissement du cristal par l'augmentation de la solvatation des molécules de PA dissoutes ;
- ✓ Les CD peuvent être considérées comme des matériels kosmotropes capables d'améliorer la structure cohésive de l'eau et de ce fait augmenter la stabilité des solutions sursaturées.

Ainsi, Brewster *et al.* (2008) montrent que la stabilité d'une solution sursaturée, lors de la dissolution du PA, peut être améliorée et maintenue par la sulfobutyether-β-cyclodextrine et la 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine. Les raisons pour lesquelles ces CD permettraient de promouvoir la sursaturation sont celles définies par Brouwers *et al.* (2009) et citées précédemment. Cependant, d'autres études (Dias *et al.*, 2003 ; Iervolino *et al..*, 2000) montrent que l'effet des CD sur les solutions sursaturées ne se ferait qu'au niveau de

l'amélioration de la dissolution du PA. Les CD seraient moins efficace pour stabiliser les solutions sursaturées par rapport aux polymères, en particulier l'HPMC (Raghavan *et al.*, 2003).

Enfin, une étude montre que la formation de complexes d'inclusion PA-CD avant sa dispersion dans une matrice de polymère hydrophile améliorerait la stabilité des dispersions solides en inhibant la cristallisation lors de la fabrication (Bouchal *et al.*, 2015). Ainsi, alors que le système binaire PA-polymère montrait toujours la présence de cristaux quelle que soit la quantité de PEG ajouté, le système ternaire, dans lequel étaient dispersés les complexes PA-CD était caractérisé par un état totalement amorphe.

Ces études montrent que l'ajout d'agent de complexation dans une dispersion solide améliore les propriétés biopharmaceutiques en :

- ✓ Augmentant la dissolution du PA ;
- ✓ Maintenant la solution sursaturée lors de la libération du PA dans le milieu de dissolution ;
- ✓ Inhibant la cristallisation du PA lors de la fabrication.

3.3 Conclusion

La mise au point de stratégies permettant l'amélioration de la dissolution des PA de classe II, très peu solubles en milieu aqueux, représente un enjeu majeur dans le domaine pharmaceutique. De nombreuses stratégies ont été mises en œuvre pour augmenter les propriétés de dissolution de ces molécules. Parmi elles, les SD offrent la possibilité d'augmenter considérablement la vitesse et le taux de dissolution des PA peu hydrosolubles. Selon la nature de l'état physique du PA et du support, l'amélioration de la dissolution sera permise par une réduction de la taille des particules et/ou une augmentation de la mouillabilité du PA et/ou une augmentation de la porosité des particules et/ou l'amorphisation du PA. Les SD amorphes permettent une libération très importante du PA, sous la forme d'une solution sursaturée. Cependant, la libération importante du PA peut rapidement être suivie de sa précipitation. En effet, l'état métastable dans lequel se trouve le PA tend à vouloir retrouver un état plus stable sous forme de cristaux insolubles en milieu aqueux. Maintenir cet état métastable est indispensable pour permettre l'absorption du PA et donc assurer une amélioration de la biodisponibilité. Pour cela, le choix du support est très important car il pourra permettre de stabiliser le PA au moyen d'interactions intermoléculaires ou encore par

effet vitrifiant. Maintenir l'état métastable des SD amorphes lors de leur fabrication et de leur conservation est aussi un enjeu pour ses systèmes. Pour se faire, il est important de choisir des excipients miscibles entre eux et avec le PA. De plus, la formule devra être conçue de façon à garantir une faible mobilité moléculaire afin d'éviter l'agglomération du PA dispersé conduisant à la recristallisation.

Afin de promouvoir les propriétés biopharmaceutiques des SD amorphes de 2ème génération, l'ajout d'un additif peut être envisagé. Les CD comme additif dans les SD, semblent offrir de bonnes perspectives car elles seront capables d'améliorer la solubilité par effet synergique en formant des complexes ou des systèmes micellaires avec le PA. Mais elles pourront aussi inhiber la recristallisation lors de la fabrication, la conservation et la dissolution en :

- ✓ Diminuant le degré de saturation;
- ✓ Formant des interactions de types liaisons hydrogène avec le PA ;
- ✓ Augmentant la solvatation des molécules de PA solubilisés ;
- ✓ Améliorant la structure cohésive de l'eau et de ce fait augmentant la stabilité des solutions sursaturées (matériel kosmotrope).

PARTIE EXPERIMENTALE

1 Introduction des travaux expérimentaux

Le principal objectif de ce travail est la mise au point d'un ODF de tétrabénazine (TBZ) pour améliorer l'acceptabilité, la sécurité et l'efficacité d'un traitement pour la population pédiatrique. En effet, ce PA n'existe que sous la forme comprimé et fait partie des médicaments prioritaires pour lesquels le développement d'une forme galénique adaptée à la population pédiatrique est nécessaire. Dans cette partie, des informations relatives à la TBZ et son intérêt en pédiatrie sont données, mais aussi sur le choix des paramètres liés à la formulation (procédé de fabrication, choix des polymères et excipients) des ODF.

1.1 La Tétrabénazine comme PA modèle

La TBZ est un dérivé de la benzoquinolizine. Développée initialement dans les années 1950 comme traitement antipsychotique, la Tétrabénazine est aujourd'hui communément utilisée dans les traitements des troubles hyperkinésiques tels que la chorée de Huntington, l'hémiballisme, la chorée sénile, les dyskinésies tardives et le syndrome Gilles de La Tourette (Swope and Chen, 2012). Cette molécule possède un profil de tolérance acceptable et est indiquée pour les populations pédiatriques et adultes.

1.1.1 **Propriétés physicochimiques de la Tétrabénazine**

La TBZ est une hexahydro-dimethoxy-benzoquinolizine dont les propriétés physicochimiques sont rassemblées dans la Figure 30. Il existe deux principales méthodes connues pour la synthèse de TBZ: la cyclisation des dérivés de tétrahydroisoquinoléine ou la condensation d'un dérivé de 3,4-dihydro-isoquinoléine avec la β-aminocétone (Yu *et al.*, 2010). La TBZ dispose de deux centres chiraux, et peut donc théoriquement exister sous quatre formes isomères. La structure moléculaire suggère une réactivité modérée par le groupe amine tertiaire. Les problèmes associés à cette molécule sont multiples : faible solubilité dans l'eau, faible mouillabilité et sensible à l'hydrolyse, à la chaleur et à la lumière.

FICHE PRODUIT TBZ

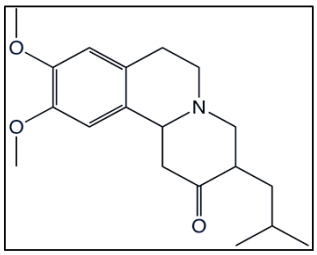
Nomenclature IUPAC :
1,3,4,6,7,11b-Hexahydro-9,10-dimethoxy-3-(2-methylpropyl)-2H-benzo-[a]quinolizin-2-one

Formule brute : C19H27NO3

Masse moléculaire : 317,4 g/mol

Pka : 6,51

Température de fusion : 122-128°C



Structure chimique TBZ

Forme : poudre cristalline blanche à légèrement jaune

Solubilité :

Pratiquement insoluble dans l'eau
Soluble en milieu aqueux à pH très acide
Soluble dans l'éthanol 30mM, le DMSO 100mM et le chloroforme
Peu soluble dans le méthanol

Classe thérapeutique : Faible solubilité dans l'eau et forte perméabilité ➔ BCS II

Figure 30 : Fiche produit de la Tétrabénazine (Guay *et al.*, 2010).

1.1.2 Pharmacologie de la Tétrabénazine

La Tétrabénazine agit par déplétion dopaminergique présynaptique en bloquant de façon réversible le transporteur des monoamines présent sur les vésicules synaptiques (VAMT2). Elle possède également la propriété de bloquer des récepteurs post-synaptiques à la dopamine. La forme commerciale disponible est le mélange racémique (SS, RR)-TBZ. Après son administration orale, elle est rapidement absorbée dans l'heure (absorption minimale de 75%) et la prise de nourriture n'affecte pas son absorption. Elle est ensuite rapidement distribuée au cerveau et on la retrouve préférentiellement dans le striatum. Cependant, sa biodisponibilité est très faible (5%), cela est dû à sa forte métabolisation lors de son premier passage hépatique. L'enzyme carbonyle réductase dans le foie est responsable de la formation de deux métabolites actifs majeurs : l'α-dihydrotétrabénazine (α-HTBZ) et la β-dihydrotétrabénazine (β-HTBZ). L'α-HTBZ est ensuite métabolisée en 9-desméthyl- α-DHTBZ, un métabolite mineur, par le cytochrome CYP2D6 (et CYP 1A2 en contribution). La β-HTBZ quant à elle,

est métabolisée en un métabolite circulant majeur, le 9-desméthyl-β-DHTBZ par le cytochrome CYP 2D6. Les métabolites sont ensuite éliminés à 75% par les reins et de 7 à 16% dans les matières fécales. La TBZ non métabolisée n'a pas été détectée dans les urines humaines. Enfin l'excrétion urinaire de l'α-HTBZ et la β-HTBZ compte pour moins de 10% de la dose administrée.

Des études pharmacologiques *in vivo* ont montré que la TBZ et les HTBZ ont un profil pharmacologique identique et jouent un rôle égal dans l'effet biologique et donc dans l'efficacité clinique du médicament (Mehanna *et al.*, 2013). Roberts *et al.*, ont montré que les aires sous les courbes des métabolites actifs étaient pratiquement identiques après administration de la TBZ par voies orale et intraveineuse. De plus, ils rapportent que l'administration de la TBZ par une voie évitant l'effet de 1er passage hépatique pourrait entraîner une disponibilité systémique plus élevée et plus constante (Roberts *et al.*, 1986).

1.1.3 **La Tétrabénazine chez l'enfant**

Chez l'enfant, des rapports d'utilisation de la TBZ ont été rapportés sur les pathologies suivantes : maladie de Huntington, chorée post-hypoxie, hyperkinésie post-encéphalique, syndrome Gilles de La Tourette, syndrome de Lesch-Nyhan et dystonie généralisée (Jain *et al.*, 2006).

Chez l'adulte, dans le traitement de la maladie de Huntington ou de l'hémiballisme, la posologie moyenne utilisée est de 25 mg (1 comprimé) 2 à 3 fois par jour soit 50 à 75 mg/jour. Le schéma thérapeutique recommande une dose initiale de 12,5 mg/jour pouvant être augmentée progressivement jusqu'à ce que les mouvements soient contrôlés, sans dépasser la dose maximale recommandée de 100 mg/jour (Yu *et al.*, 2010). Pour l'enfant, la posologie n'est pas codifiée, compte tenu du peu d'études pédiatriques. L'analyse de la littérature disponible, montre une grande variabilité de doses utilisées. Cependant, il est recommandé de débuter le traitement à 0,5mg/kg/jour et d'augmenter progressivement par paliers de 0.5 mg/kg par semaine en fonction de la tolérance de l'enfant jusqu'au contrôle total des mouvements. La dose peut être augmentée jusqu'à 4-5 mg/kg/jour sans dépasser 150-200 mg/jour (Guay *et al.*, 2010).

Ce médicament orphelin ne dispose pas de formulation pédiatrique. En dépit de son efficacité dans la réduction des troubles du mouvement résistant au traitement à d'autres médicaments, les rapports d'utilisation chez l'enfant restent limités. De plus, les doses élevées administrées pour traiter la chorée chez l'enfant ont été bien tolérées (Jain *et al.*, 2006). Il est nécessaire

d'utiliser des formes posologiques appropriées pour cette population pédiatrique et/ou un dispositif d'administration adapté aux symptômes liés à ces pathologies. La TBZ fait partie des médicaments prioritaires pour lesquels le développement d'une forme galénique adaptée à la pédiatrie est nécessaire (EMA/98717/2012). Récemment, elle a fait l'objet d'une validation d'un Plan d'Investigation Pédiatrique (EMA/138220/2015) sous la forme d'une suspension solide (Annexe 1).

1.2 Choix des films orodispersibles

En 2008, des experts de l'OMS (WHO, 2008) ont publié un rapport dans lequel ils recommandaient l'utilisation de formes orales solides souples pour la population pédiatriques, telles que les formes orodispersibles ou des formules à reconstituer pour obtenir des préparations orales liquides. Les films orodispersibles (ODF) ont été choisis pour une administration adaptée de la TBZ à la population pédiatrique. Ils font partie de ces nouvelles formes galéniques améliorant la compliance aux traitements médicamenteux. Ils sont constitués d'une matrice de polymère hydrophile dans laquelle un ou plusieurs principes actifs sont dissous ou dispersés. Une fois le film déposé sur la langue ou dans la cavité buccale, la matrice va se désagréger libérant ainsi le PA pour une action locale (Heinemann *et al.*, 2013) ou systémique. L'intérêt majeur des ODF est leur capacité de dissolution dans la cavité orale. En effet, ils pourront être ingérés facilement sans eau améliorant ainsi la compliance des populations présentant des difficultés à avaler. De plus, la désintégration rapide du film et la disponibilité immédiate du PA lorsque celui-ci est à l'état dissous dans la matrice, permettraient d'améliorer la biodisponibilité du médicament (Bala *et al.*, 2013 ; Dixit *et al.*, 2009).

Le cahier des charges que nous nous sommes fixés pour la conception d'ODF pour la population pédiatrique présente les caractéristiques suivantes :

- ✓ Minimum d'excipients à risque pour les enfants. Ainsi, le choix de ne pas utiliser de solvant organique pour la préparation des films a été fait ;
- ✓ Quantité de TBZ de 12,5 mg/film ;
- ✓ Temps de désintégration totale de l'ODF<1 minute ;
- ✓ Teneur en eau <10% ;
- ✓ Facile à manipuler (flexible, résistant).

1.2.1 **Procédé de fabrication**

La méthode de coulée/évaporation de solvant a été choisie pour la fabrication des ODF (Figure 31). Elle consiste à mélanger les excipients et le PA dans un solvant commun pouvant être aqueux, organique ou un mélange (co-solvant). Une fois homogénéisé, le mélange est coulé sur une surface plane (boîte de Petri, surface en téflon). Après évaporation du solvant (sous hotte, sous vide, en étuve), il se forme un film qui pourra être découpé à la taille souhaitée. Cette technique est très employée (Cilurzo *et al.*, 2008 ; Sayed *et al.*, 2013 ; Xu *et al.*, 2014 ; Kianfar *et al.*, 2012 ; Shimoda *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2015) pour la formulation de films oraux du fait de sa facilité de mise en œuvre en laboratoire et de son faible coût. Après des essais avec différents supports de coulage (boîte de Petri, PTFE) et méthodes de séchages (sous hotte, sous vide), les conditions de préparations suivantes ont été sélectionnées : gel coulé dans une boîte de Petri et séchage sous hotte à température ambiante durant 20h. En effet, les films se décollaient bien des boîtes de Petri et celles-ci offraient de meilleures commodités (consommable, transportable). Le séchage sous vide ne permettait pas d'évaporer le solvant plus rapidement car, pour éviter les bulles, il fallait faire des paliers afin de diminuer la pression progressivement. Le séchage à l'étuve ne convenait pas à notre système du fait de la sensibilité du PA à la chaleur.

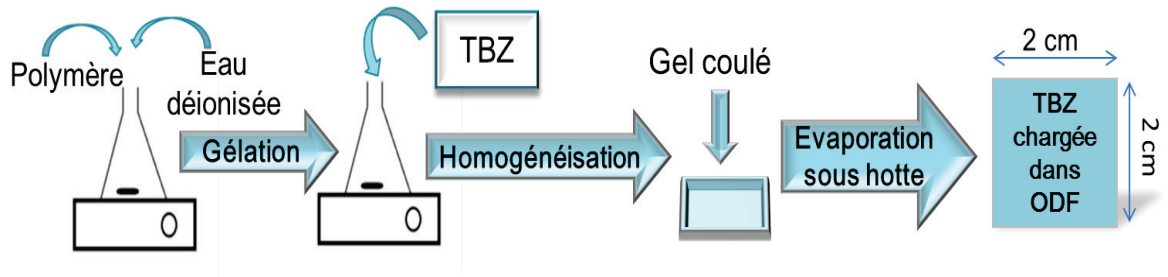


Figure 31 : Schéma du procédé de fabrication « solvant coulé/évaporation ».

1.2.2 **Pré-formulation**

Afin d'assurer une répartition homogène de la TBZ dans l'ODF, nous avons fait le choix d'intégrer le PA en solution dans le gel de polymère. En effet, Mira et al. (2013), montrent que lorsque le PA est à l'état cristallin, la répartition est hétérogène et entraîne une mauvaise uniformité de teneur en PA dans le médicament. De plus, solubiliser le PA éviterait l'apparition d'agrégats cristallin lors de l'évaporation du solvant (Hemrans *et al.*, 2014).

Enfin, la présence du PA à l'état cristallin entraîne la formation d'un film rugueux et plus cassant (Kianfar *et al.*, 2012).

Comme nous l'avons dit précédemment, la TBZ est très peu soluble en milieu aqueux hormis à pH acide. Nous avions donc le choix de solubiliser la TBZ soit dans un solvant organique tel que l'éthanol soit dans de l'eau acidifiée. L'acide citrique a été préféré car il peut avoir d'autre rôle dans la formulation notamment celui de contribuer à l'amélioration de la palatabilité de la préparation mais aussi d'agir comme un plastifiant (Dixit *et al.*, 2009). L'étude de solubilité a montré que pour 1 mole de TBZ, il fallait introduire 1,5 mole d'acide citrique.

En se basant sur les données de la littérature (Arya *et al.*, 2010 ; Bala *et al.*, 2013), la base de formulation des ODF est la suivante (Tableau 18):

Tableau 18 : Compositions des ODF.

Ingrédient	Teneur (%m/m)
Principe actif	5-30
Polymère matriciel	40-50
Plastifiant	0-20
Désintégrant	0-10
Autres (édulcorant, Arôme)	0-20

La sélection des supports et la mise au point des formulations finales ont été faites selon la démarche suivante :

1) **Fabrication de films blancs (sans PA) et caractérisations macroscopiques.**

⇨ Le film se décolle-t-il bien du support ? Est-il collant ? Flexible ? Cassant ? Homogène ? Se désintègre-t-il en moins d'une minute ? La teneur en eau est-elle inférieure à 10% ?

⇨ Sélection des polymères hydrophiles répondant au mieux à ces critères pour les ODF blancs.

2) **Incorporation de la quantité nécessaire en TBZ et caractérisations.**

⇨ Le film se décolle-t-il bien du support ? Est-il collant ? Flexible ? Cassant ? Homogène ? Se désintègre-t-il en moins d'une minute ? La teneur en eau est-elle inférieure à 10%? Quelle est la charge finale en TBZ retrouvée dans les films ?

- ⇨ Sélection des polymères hydrophiles répondant au mieux à ces critères en présence de TBZ.

3) Incorporation d'excipients pour améliorer la formulation avec TBZ et caractérisations.

- ⇨ Le film se décolle-t-il bien du support ? Est-il collant ? Flexible ? Cassant ? Homogène ? Se désintègre-t-il en moins d'une minute ? La teneur en eau est-elle inférieure à 10%?
- ⇨ Sélection des polymères hydrophiles et autres adjuvants (plastifiants, désintégrants) répondant au mieux à ces critères en présence de TBZ.

Les 5 critères considérés pour sélectionner les films sont :

- ✓ La teneur en eau (Hr) : elle représente la quantité d'eau non liée à une substance. Hr a été déterminé par analyse thermogravimétrique (ATG) (**Cf 1.3 Publication, ODF moisture content**).
- ✓ La « friabilité » : cette propriété a été déterminée en «écrasant» le film dans le creux de la main et en observant si celui-ci s'effrite.
- ✓ La résistance à l'élongation : cette propriété a été déterminée en tirant manuellement le film à ses extrémités.
- ✓ La résistance au pliage : cette propriété a été déterminée par le nombre de fois où le film peut être plié sans casser (**Cf 2.2 Publication- Mechanical and morphological investigation**).
- ✓ Le temps désintégration : il correspond au temps au bout duquel le film est totalement désintégré (**Cf 2.2 Publication- ODF Disintegration time**).

Un système de score (Tableau 19) a été établi pour caractériser les propriétés des films sélectionnés afin de les représenter sur un graphique de type radar (Figure 32).

Tableau 19 : Description des scores attribués aux propriétés des ODF.

Score	1	2	3
Hr(%)	>10	5< Hr< 10	<5
Friabilité	Friable	Peu friable	Non Friable
Résistance à l'élongation	Pas Résistant	Résistant	Très Résistant
Résistance au pliage	1-5	5-50	>50
Temps de désintégration	>2 minutes	≥ 1minute	<1 minute

1.2.3 **Choix des polymères matriciels**

Plusieurs polymères hydrophiles ont été testés seuls: Pullulan (PUL), HydroxyPropylMethylCellulose (HPMC E15), Gélatine, PVP K90, HydroxyEthylCellulose (HEC), Hydroxypropyl amidon modifié (Lycoat® RS720); et en association : Pectine/Carraghénane, Gélatine/Pectine, Gélatine/Gomme arabique, Gélatine/ Carraghénane. D'après le cahier des charges, 5 films ont été sélectionnés, dont un constitué d'une association de polymères, en fonction de leur caractéristique morphologique, leur temps de désintégration et leur taux d'humidité résiduelle (Hr). Les films blancs choisis étaient à base d'HPMC, de PVP K90, d'HEC, de PUL et d'une association Gélatine/Pectine avec un ratio massique de (2 : 1,5). Cette association, déjà décrite pour un usage alimentaire, présentait une bonne résistance mécanique du fait de la présence d'interactions électrostatiques entre la gélatine (munie de charge positive) et la pectine (munie de charge négative) (Liu *et al.*, 2007).

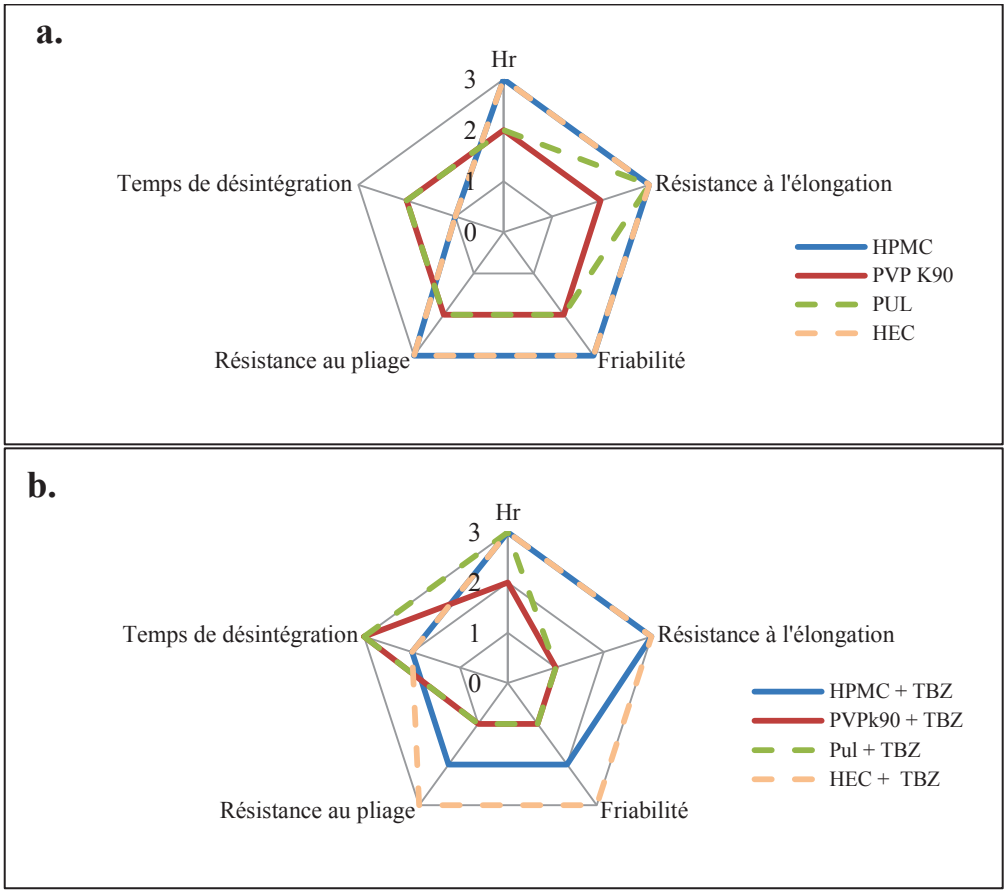


Figure 32 : Caractérisations des ODF blancs (a) et contenant la TBZ (b).

Lors de la 2ème étape, qui consiste à ajouter la quantité nécessaire de TBZ, le film composé de l'association de gélatine/pectine ne se décollait plus, il a donc été écarté. Les ODF composés d'un seul type de polymère (HPMC E15, HEC, PUL, PVP K90) ont tous été sélectionnés. L'amélioration des propriétés de ces films était néanmoins nécessaire. En effet, l'ajout de la TBZ dans les matrices les a rendus plus cassants et moins flexibles (Figure 32). Ainsi, pour les ODF à base d'HPMC, de PVP K90 et de PUL, un plastifiant a été incorporé. De plus, les films à base d'HPMC et HEC ont un temps de désintégration de 1 minute, ainsi, pour l'améliorer, un agent de désintégration a été ajouté.

1.2.4 **Choix des autres adjuvants**

La nature, le nombre et la quantité d'excipients pour les formes pédiatriques doivent être bien considérés. Ainsi, nous avons choisi d'en ajouter un minimum. Dans un premier temps, le glycérol a été choisi comme plastifiant et a été incorporé à différentes concentrations par rapport à la masse du film : 5, 10, 15 % dans les ODF à base d'HPMC, PVP K90 et PUL. L'amélioration de la flexibilité et de la tenue des films a bien été observée en fonction de la quantité de glycérol ajouté, sans pour autant dépasser la valeur critique en humidité résiduelle (Figure 33). En effet, le glycérol est hygroscopique et le risque était de dépasser les 10% d'Hr dans les films. La concentration maximale (15%) en glycérol a été retenue pour chaque film, car c'est celle qui apportait la meilleure tenue et souplesse (Figure 34).

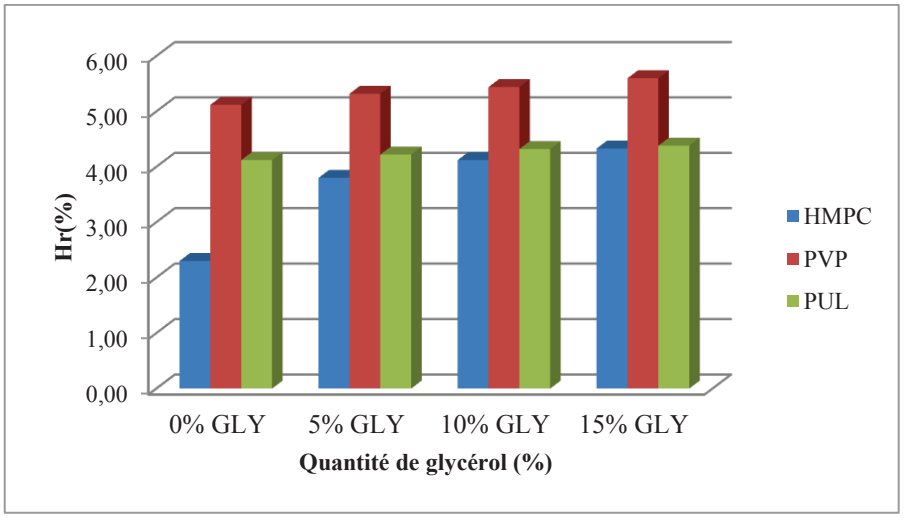


Figure 33: Taux d'humidité résiduelle (Hr) des ODF en fonction de la quantité de glycérol ajouté.

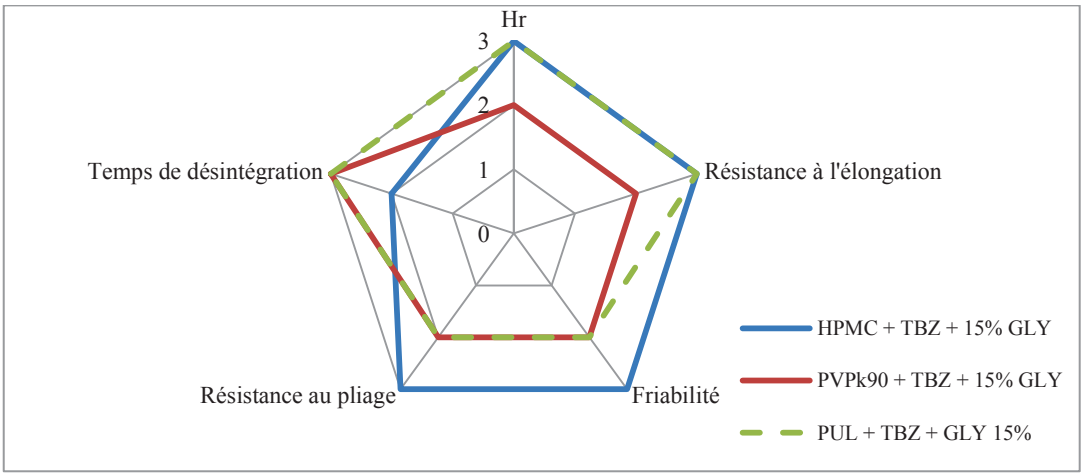


Figure 34 : Propriétés des ODF après incorporation de 15% de glycérol.

Enfin, différents agents de désintégration ont été testés : Mannitol Flash, Crospovidone, Croscarmellose sodique. Ils ont été incorporés au gel à une concentration de 8% par rapport à la masse sèche totale de la formulation. Le problème rencontré avec ces trois agents de désintégration a été leur présence sous forme cristalline (Figure 35) qui impactait sur les propriétés mécaniques des ODF. En effet, ils sont devenus plus cassants et friables (Kianfar *et al.*, 2012). De plus, l'augmentation de la vitesse de désintégration des ODF n'était pas flagrante. L'incorporation d'un polyol type sorbitol a donc été envisagée. En effet, des études ont montré que les polyols avaient un effet sur la vitesse de désintégration des comprimés orodispersibles (Bolhuis *et al.*, 2009). Une légère amélioration de la vitesse de désintégration des ODF a été observée en présence de sorbitol (T=50 secondes) sans affecter les propriétés mécaniques du fait de l'absence de sorbitol sous forme cristalline dans les films (Figure 36).

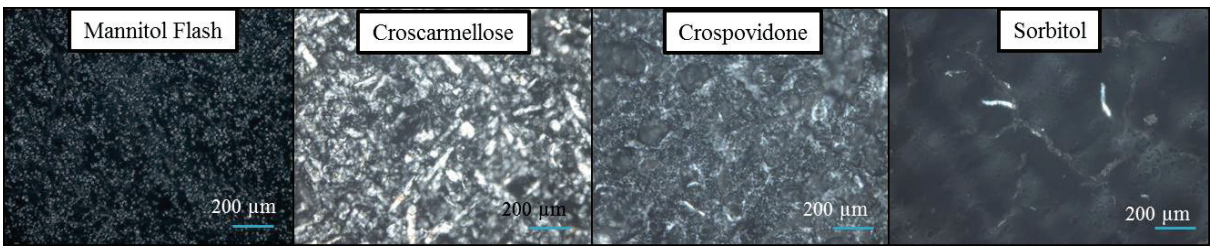


Figure 35 : Images obtenues en microscopie polarisante de l'ODF à base d'HPMC avec différents agents de désintégration (Mannitol Flash, Corscarmellose, Crospovidone) et remplissage (sorbitol).

Ces essais préliminaires de formulation nous ont donc permis de sélectionner 4 formulations pour le développement d'ODF pour l'administration orale de la TBZ chez l'enfant, que sont les formulations à base : d'HydroxyPropylMethylCellulose (HPMC-ODF), de PolyVinylPyrrolidone K90 (PVP-ODF), de Pullulan (PUL-ODF) et d'HydroxyEthylCellulose (HEC-ODF). La composition finale de ces formules est donnée dans Table 1 (**Cf. paragraphe 2.2 Publication**). Ces ODF sont facilement maniables et transportables, présentent un taux d'humidité résiduelle inférieur à 10% et un temps de désintégration inférieur à 1 minute. Leurs caractéristiques sont résumées sur le graphique radar en Figure 36.

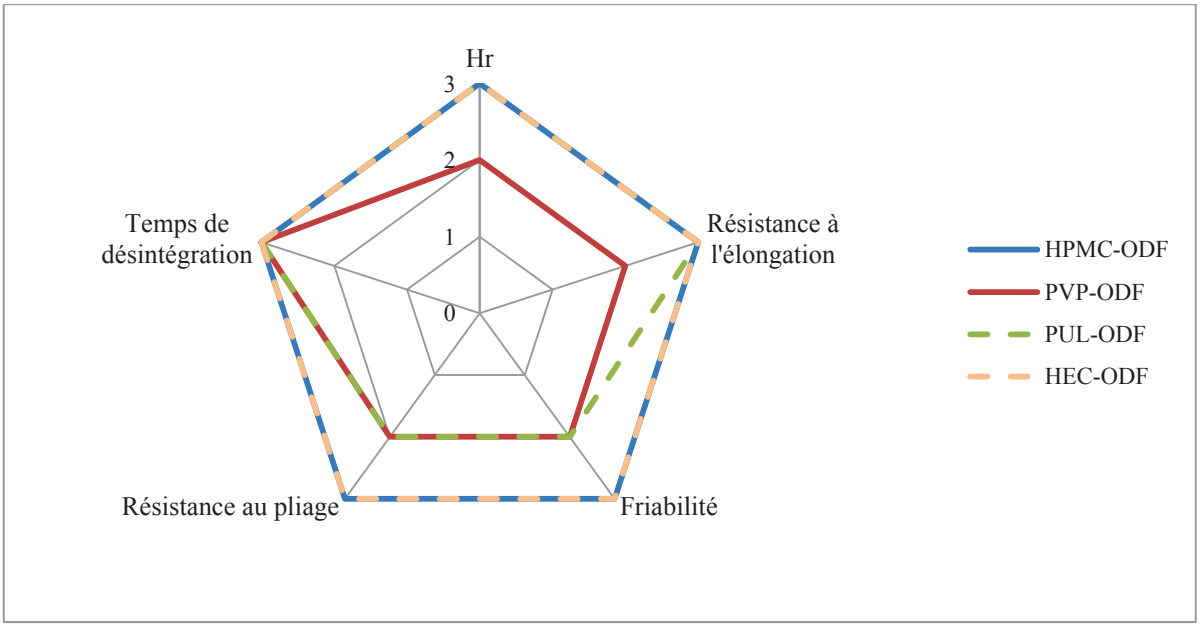


Figure 36 : Propriétés finales des ODF selon la nature de polymère matriciel utilisé.

Ces ODF vont faire l'objet d'analyses plus poussées permettant de caractériser leurs propriétés physico-chimiques, mécaniques et biopharmaceutiques afin d'étudier la faisabilité et la stabilité d'une telle formulation pour l'administration de la TBZ aux enfants. Décrite dans la partie suivante, cette étude a abouti à la publication d'un article dans Journal of Pharmacy and Pharmacology en 2016 (Annexe 2). La mise en évidence de la TBZ à l'état amorphe dans les ODF, ainsi que l'évolution de cet état au cours du temps selon la nature du polymère utilisé, nous a menés vers une nouvelle étude présentée en chapitre 3. Elle consiste à caractériser les ODF comme des dispersions solides amorphes dans le but d'une part de déterminer le rôle des constituants principaux de la formulation ; et d'autre part, expliquer l'évolution des ODF selon la nature des polymères utilisés. Cette étude est présentée sous forme d'un article scientifique soumis dans International Journal of Pharmaceutics

actuellement en cours de révision. Enfin, dans le dernier chapitre de la partie expérimentale, l'incorporation de la TBZ dans des cyclodextrines est réalisée dans le but d'améliorer la stabilité de la formulation et les propriétés organoleptiques des ODF.

2 Formulation de films orodispersibles pour la population pédiatrique –Etude de faisabilité et de stabilité pour la Tétrabénazine.

2.1 Résumé de la publication

Comme nous l'avons vu précédemment, la Tétrabénazine est un PA pour lequel aucune forme galénique n'avait été développée pour la population pédiatrique lors du lancement de cette étude en 2013. Récemment elle a fait l'objet d'un PPI. Les films orodispersibles, présentant de nombreux avantages, ont été choisis pour administrer ce PA. Après avoir testé plusieurs polymères hydrophiles comme base de nos films, 4 candidats présentant des résultats encourageants, et connus pour être de bons agents filmogènes, ont été retenus (Bala *et al.*, 2013 ; Dixit *et al.*, 2009) : l'HPMC, la PVP K90, le PUL et l'HEC. Lors des études prélimaires les formulations ont été optimisées en ajoutant des excipients comme le glycérol, pour l'amélioration de la flexibilité des films à base d'HPMC, PVP et PUL ; et le sorbitol, pour augmenter la vitesse de désintégration des films à base d'HPMC et HEC. Une fois le choix des agents filmogènes et des adjuvants de formulation établi la caractérisation plus approfondie des ODF a pu être réalisée à différents niveaux :

- ✓ **Caractérisations morphologiques et mécaniques** des films dans leur globalité afin de décrire leurs propriétés organoleptiques (homogénéité du film, coloration, sensation au toucher telle que la rugosité ou le collant), leur épaisseur, leur taux d'humidité résiduelle (Analyse Thermo-Gravimétrique-TGA), ainsi que la maniabilité des films en caractérisant leur flexibilité et leur résistance par la détermination du module d'Young (Analyse Mécanique Dynamique- DMA).
- ✓ **Caractérisations biopharmaceutiques,** regroupant l'uniformité de dosage en TBZ et le temps de désintégration des films et de dissolution du PA dans différents milieux (gastriques et salivaires).
- ✓ **Caractérisation de l'état du PA** afin de définir si celui-ci est présent sous sa forme cristalline ou amorphe. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a été utilisée pour observer la présence, ou non, du pic de fusion de la TBZ et la microscopie polarisante a été utilisé pour mettre en évidence la présence de cristaux dans les films.
- ✓ **Caractérisation des interactions entre le PA et les excipients** à l'aide de la spectrométrie infra-rouge à transformée de fourrier (FT-IR).

Ces caractérisations ont été effectuées pour chaque ODF (n=3), directement après leur fabrication et après 1, 3 et 6 mois de conservation à 40°C, 75% HR. Cela permettra d'observer les différences obtenues entre les ODF afin de déterminer quel(s) polymère(s) est(sont) le(s) mieux adapté(s) pour la formulation de la TBZ mais aussi d'évaluer l'évolution des propriétés des films durant 6 mois de conservation (40 °C et 75% HR).

Résultats des caractérisations des ODF après fabrication (T=0).

Après fabrication, les ODF obtenus sont homogènes, transparents et non collants. Le taux d'humidité résiduelle se situe entre 3,1 et 6% selon les formulations et le temps de désintégration n'excède jamais 50 secondes. Cette désintégration rapide vise à améliorer la libération du PA pour promouvoir à la fois l'absorption buccale et l'absorption gastro-intestinale lorsque les résidus des ODF seront avalés. Cette désintégration rapide permet également d'assurer le confort et la commodité de l'administration (Sayed *et al.*, 2013 ; Cilurzo *et al.*, 2008). En terme de flexibilité, le classement établi (HPMC-ODF>HEC-ODF>PUL-ODF>PVP-ODF) montre que l'HPMC-ODF est le plus souple. Concernant la rigidité des films, les modules d'Young obtenus sont comparables aux valeurs données par la littérature (Qiao Jun Low *et al.*, 2013) et le classement des ODF, du plus rigide au moins rigide, est le suivant : HPMC-ODF>PUL-ODF>PVP-ODF>HEC-ODF. La quantité de PA dosée dans les ODF (4 cm^2), par spectrophotométrie UV-visible, se situe entre 15,0 et 16,9 mg pour 100 mg d'ODF. Etant donné que, suivant le type de polymère, la masse des ODF varie entre 60 et 80mg, la quantité de TBZ fixée dans le cahier des charges (12,5mg) est bien retrouvée. Dans le milieu gastrique (HCL 0,1M, pH 1,2), l'intégralité (100%) de la TBZ est libérée, qu'elle soit sous forme de PA pur en poudre ou d'ODF. Cette observation semble logique car la TBZ est soluble en milieu acide, mais cette expérience permet aussi de confirmer qu'aucune perte en PA n'est constatée lors de la fabrication des ODF. Concernant le profil de libération de la TBZ en milieu salivaire (pH 6,8), une très nette augmentation de la dissolution du PA est observée lorsque celui-ci est intégré dans un ODF. En effet, après 2h, seulement 40% de la TBZ pure est dissoute dans le milieu salivaire, tandis que la TBZ formulée dans les ODF, quel que soit le polymère utilisé, présente un taux de libération d'environ 85%. Cette augmentation de la libération de la TBZ peut être expliquée par deux facteurs (de façon indépendante ou synergique) :

- ✓ La présence des polymères hydrophiles qui permettent d'augmenter la mouillabilité des particules de PA (Cilurzo *et al.*, 2008) ;
- ✓ L'état de cristallinité de la TBZ dans les ODF (Kianfar *et al.*, 2012).

Ainsi, l'étude de l'état physique de la TBZ (DSC, microscopie polarisante) a montré qu'elle se trouvait à l'état amorphe dans les ODF et explique l'augmentation de sa vitesse de dissolution dans le milieu salivaire (Xu *et al.*, 2014). Enfin, des interactions entre la TBZ et les excipients ont été mises en évidence par FT-IR. La bande caractéristique de la fonction carbonyle de la TBZ est effectivement décalée vers des longueurs d'ondes plus faibles.

Résultats des caractérisations des ODF en cours de stabilité à 1, 3 et 6 mois.

Au temps initial, aucune différence majeure n'a été constatée entre les formulations, même si l'ODF à base d'HPMC semble le plus intéressant en terme de propriétés mécaniques. Au cours de cette étude de stabilité, la recristallisation de la TBZ a été observée dans les ODF à base de PVP dès 1 mois, et d'HEC après 3 mois de conservation. Les observations liées à la recristallisation sont les suivantes :

- ✓ Opacification des ODF ;
- ✓ Apparition du pic de fusion de la TBZ (DSC) ;
- ✓ Apparition de cristaux (microscopie polarisante) ;
- ✓ Diminution du taux de libération de la TBZ dans le milieu salivaire ;
- ✓ Apparition de la bande correspondant aux ν(C=0) du carbonyle de la TBZ pure, témoignant de la perte des interactions entre le PA et les excipients.

Dans les ODF à base d'HPMC et PUL, aucune de ces observations n'a été constatée témoignant du maintien de l'état amorphe de la TBZ et des propriétés initiales. Néanmoins, le jaunissement des ODF a été observé quelle que soit la matrice de polymère utilisée. Il peut être corrélé aux résultats obtenus par Bouerzg *et al.*, qui observaient ce jaunissement suite à une exposition intense de la TBZ à la lumière. Des expériences complémentaires en chromatographie liquide couplée à un spectre de masse (LC-MS), ont été conduites afin de détecter la présence de produits de dégradation (Cf partie **1.4. Etude LC-MS**).

Dans cette étude, la caractérisation des propriétés physicochimiques, mécaniques, biopharmaceutiques de l'ODF, a été effectuée. La mise en évidence de la TBZ à l'état amorphe dans les films a permis d'expliquer l'augmentation de la vitesse de dissolution et du taux de libération du PA dans le milieu salivaire. En effet, les ODF peuvent ainsi être définis comme un système dans lequel le support polymère et le PA sont à l'état amorphe. Ces systèmes, appelés dispersions solides amorphes, sont utilisés pour améliorer la dissolution des

PA faiblement hydrosolubles. Cependant, ils sont connus pour leur instabilité du fait de leur état métastable qui tend à se réorganiser vers un état plus stable sous forme de cristaux. C'est ce que l'on observe dans les ODF à base de PVP et HEC. L'ODF à base d'HPMC est le mieux adapté pour la formulation de la TBZ car il offre les meilleures propriétés mécaniques et reste stable après 6 mois de conservation. Cependant, les résultats amènent un certain nombre de questions : Quel est le rôle des polymères dans l'amélioration de la dissolution du PA ? Y-a-t'il une influence de l'acide citrique sur ces propriétés ? Pourquoi la TBZ reste stable dans les films à base d'HPMC et PUL et recristallise dans les ODF à base de PVP et HEC ? Pour tenter de répondre à ces questions, une étude plus approfondie basée sur la caractérisation de l'état de dispersions solides amorphes des ODF sera présentée dans le chapitre 3.

2.2 Publication

Article publié dans Journal of Pharmacy and Pharmacology :

Senta-Loÿs, Z., Bourgeois, S., Paillet-Mattei, C., Agusti, G., Briançon, S., Fessi, H., 2016. Formulation of orodispersible films for pediatric therapy-investigation of feasibility and stability for tetrabenazine as drug model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. doi: 10.1111/jphp.12627.

FORMULATION OF ORODISPERSIBLE FILMS FOR PEDIATRIC THERAPY-INVESTIGATION OF FEASIBILITY AND STABILITY FOR TETRABENAZINE AS DRUG MODEL

Z. Senta-Loys[a], S. Bourgeois [a, b], C. Pailler-Mattei [b,c], S. Briancon [a, b], H. Fessi [a, b]

[a] Université de Lyon, Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), UMR CNRS 5007, F-69622, Villeurbanne, France

[b] Université de Lyon, Université Lyon 1, ISPB-Faculté de Pharmacie, F-69008, Lyon, France

[c] Université de Lyon, Ecole Centrale de Lyon, Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes, UMR CNRS 5513, F-69134, Ecully, France

ABSTRACT

Objectives Orodispersible films (ODF) were formulated to facilitate Tetrabenazine (TBZ) administration to pediatric population for the treatment of hyperkinetic movement disorders.

Methods ODF were obtained by solvent casting/evaporation method using 4 different polymers (HPMC, PVP, Pullulan and HEC). Physicochemical, mechanical and biopharmaceutical characterizations as well as API state in ODF by thermal analysis were investigated to define and compare formulations. ODF stability was also monitored during 6 months to follow evolution of properties.

Key findings Analyses at T0 showed few differences between formulations: results of physicochemical and mechanical characterizations were almost similar for each formulation and TBZ appeared at the amorphous state in all cases. ODF delivery system allowed a major improvement of TBZ dissolution profile in buccal conditions compared to pure drug. However, after 3 and 6 months of stability, a TBZ recrystallization occurred for formulations based on PVP and HEC associated with a decrease of drug release in saliva conditions.

Conclusions HPMC-ODF (F1) appeared as the best formulation. Indeed, physicochemical, mechanical and biopharmaceutical characteristic remained intact. In addition, TBZ remained in amorphous state during stability study.

Key words: Pediatric medicine, Orodispersible film, Tetrabenazine, PVP, HPMC

1. INTRODUCTION

Pediatric population is highly diverse since it ranges from newborn to adolescence. For years, problems due to drug administration for pediatric population were not considered [1]. However, nowadays development of pharmaceutical dosage forms for pediatric appears as a great challenge. Drug administration in pediatric population (<12 years) often requires to manipulate extemporaneously dosage forms for adult. Therefore, the Food and Drug Administration (FDA) undertook to establish the first guidelines, in December 1994, commonly referred as ‘‘The Pediatric Rules” [2]. These rules described the way to adjust medication for children and therefore to encourage pharmaceutical industries to develop dosage forms specific to pediatric population. Due to this awareness, in 2007, EMA publishes a legislative framework to ensure the safety of the pediatric population and promote the development of appropriate drugs. This document mainly concerns pediatric oral formulations with 17 types of formulation [1]. The choice of the most suitable form is made according to the age of the child, the physicochemical properties of the drug, taste and the amount of drug to be administered. Oral medicines are administered in different forms, among them are: suspension, syrup, chewable tablet, capsule and microcapsule, granule, and orodispersible formulation. 90% of pediatric formulations are the liquid forms because they are easier to swallow for children and easy to divide for adjusting the dose to weight of the child [3]. However, liquid oral forms are unstable and subject to high risk of contamination, and they require specific devices for administration. Therefore, the development of solid forms called "ready-to-use" presents a main interest for pediatric population. In this study, we focused on the design of orodispersible films (ODF) as an innovative dosage form suitable for pediatric population. ODF is one of the newest dosage forms that appeared on the market. This new form of drug administration offers advantages such as: no water needed for administration, enhanced pediatric population compliance (>6 years), possibility of local action, dose accuracy compared to syrup, control of manufacturing processes, easy to handle and easily portable [4, 5].

For the ODF preparation, the film casting/evaporation method is the most commonly used because it is simple to implement and does not require any particular device at the laboratory scale [6]. Two solvents of the film-forming polymers are widely used: water and ethanol or a mixture of both. Ethanol presents interest for faster drying but it has side effects on the pediatric population. Even more than adults, the use of non-toxic, non-irritating organic polymers formulations are essential for the pediatric population. Thus, biopolymers are

widely preferred for the design of films such as polysaccharides or proteins. The polymers usually encountered are cellulose derivatives (hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) [7, 8], hydroxypropylcellulose (HPC) [9]...), pullulan (PUL) [10], gelatin [11] and also synthetic polymers like polyvinylpyrrolidone (PVP) [12]. The choice of polymer is essential for the design of fast dissolving films; they may be used alone or in combination [13, 14] to achieve the desired properties [15]. The robustness of the films depends on the choice of the polymer and the formulation process. Choice of excipients requires particular attention in pediatric formulations because they may have a different effect on the child development [16, 17]. Indeed, polyols can cause diarrhea and malabsorption, propylene glycol induces cardiovascular risk and respiratory problems [18].

The development of ODF for oral administration of Tetrabenazine (TBZ) to children was investigated. TBZ is a monoamine-depleting agent discovered in the 1950s and was approved for the treatment of neuroses and psychoses/schizophrenia. TBZ was initially investigated as a potentially more efficacious, better tolerated treatment for schizophrenia than reserpine in lower than 20 open-label [19] and comparative trials. It was subsequently approved for this indication. Moreover, TBZ is currently approved for its use in the treatment of a wide range of hyperkinetic movement disorders in several countries [20]. TBZ is available in unscored 12.5mg tablets and scored 25mg tablets [21]. Nowadays, no form has been developed for the child and TBZ was administrated by crushing adult tablets. Incorporation of TBZ in ODF formulation would simplify drug administration. However, the development of dosage form of TBZ presents many limitations due to its poor water solubility, poor wettability and its high sensitivity to light, heat and moisture.

The objective of this study was to develop and characterize an innovative drug delivery system for pediatric administration of TBZ based on TBZ-loaded ODF formulation with minimal and well-tolerated excipients for pediatric application, especially without organic solvent to avoid undesired hazards of residual solvents. As described in several studies, organic solvents were generally used for the formulation of ODF. In our study, aqueous solvent was preferred to ensure the safety of the pediatric population. ODF were formulated with various hydrophilic polymer matrices in which the API was included (HPMC, Hydroxyethylcellulose (HEC), Pullulan, PVP). To select the optimal formulation, several film characteristics were considered and followed during 6 months such as their physicochemical and mechanical properties, disintegration time, residual moisture content, TBZ content, the in vitro release of TBZ, TBZ state and the possible interactions between API and excipients.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Four types of hydrophilic polymer were studied for ODF formulation: Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) Vivapharm® E15 from JRS Pharma, Hydroxyethylcellulose (HEC) Natrosol® 250 L and Povidone K90 (PVP K90) from Ashland and Pullulan (PUL) (Hayashibara Company) [15]. Glycerol and Sorbitol, respectively used as a plasticizer and disintegrant were purchased from Cooper (France).

2.2. Methods

2.2.1. ODF preparation

ODF were obtained by the casting/evaporation method. Firstly, the film-forming polymer and other excipients were dispersed under magnetic stirring to obtain a gel [6]. Then, TBZ was dissolved in deionized water with citric acid (1.5 mole equivalent) and was incorporated in gel. The second step consisted of gel casting on a smooth surface (Petri dishes). Finally, the gel was dried to form a film. After drying, the film was removed from the holder and cut to obtain a surface area of 4 cm^2. The composition of the films is given in Table 1. Sorbitol was added in some formulations (HPMC-ODF (F1) and HEC-ODF (F4)) to enhance disintegration of ODF.

Table 1: Different formulations of ODF studied. Amount was expressed as a percentage of solid weight in films.

FORMULATION	POLYMER MATRIX (%)	TBZ (%)	CITRIC ACID (%)	GLYCEROL (%)	SORBITOL (%)
HPMC-ODF (F1)	50	15	15	12	8
PVP-ODF (F2)	54.35	16.3	16.3	13.05	-
PUL-ODF (F3)	54.35	16.3	16.3	13.05	-
HEC-ODF (F4)	56.8	17.05	17.05	-	9.1

2.2.2. Physicochemical and mechanical properties

Mechanical and morphological investigation

In order to determine morphological and mechanical characteristics the following properties of ODF, were studied: homogeneity, color, transparency, surface aspect, thickness, folding endurance and elongation modulus. Properties such as homogeneity, color, transparency and surface of ODF were evaluated visually. The ODF surface was 2×2 cm^2. The thickness was

measured with a Digimatic Micrometer IP65 (Mitutoyo). The average thickness was obtained by taking three measurements on each sample (each formulation was reproduced three times). The folding resistance was expressed as the number of steps during which the film was folded without breaking [12]. Dynamic Mechanical Analysis (Metravib DMA 50™) tests were performed on the four polymer film samples (HPMC-ODF (F1), PVP-ODF (F2), PUL-ODF (F3), HEC-ODF (F4)) to estimate their Young's modulus, E. The samples dimensions were 20x30xe mm (e is the thickness of the sample). The thickness of each sample was measured before testing. The tests were carried out at constant temperature 25°C for different frequencies (from 0.1 to 30 Hz).

ODF disintegration time

Orodispersible films were placed in a beaker containing 20 mL of salivary medium at 37°C. Simulated saliva was prepared using KH_2PO_4 (12 mM), NaCl (40 mM), $CaCl_2$ (1.5 mM) and pH was adjusted to 6.8 using NaOH [22]. A vortex was created by magnetic stirring every 10s and the state of the film was noted. The disintegration time was defined as the time for the complete disintegration of the film [23].

ODF moisture content

Moisture content (MC) of ODF was measured by thermogravimetric analysis (TGA) (TG 209 F1 ASC, Netzsch). Around 10 mg of ODF (9-11 mg) were placed in pans and heated from 25°C to 150°C, with a rate of 10°C/min. Results were expressed as the mean value of 3 measurements for each sample.

Drug content

ODF ($4cm^2$) was introduced into 150 mL of aqueous solution adjusted to pH 1.3, under stirring. After 15 minutes (total film dissolution), sample was withdrawn, filtered through a 0.45 µm cellulose acetate membrane and the absorbance was measured by UV spectroscopy (UV-1601, UV Visible spectrometer, SHIMADZU) at 282 nm. Drug content was estimated from three batches of each formulation and expressed as mg of TBZ/ 100 mg of ODF.

2.2.3. In vitro drug release

Drug release studies were performed in simulated media at pH 6.8 and pH 1.3 in order to follow the TBZ dissolution in mouth and stomach conditions since a part of the ODF will be swallowed by the patient. Composition of simulated saliva was defined previously. Artificial

gastric media was prepared according to the European Pharmacopeia using 2g of NaCl, 80mL of HCl (1M) and distilled water until 1000 mL (European Pharmacopoeia 8th Edition).

In vitro TBZ release studies were performed on 4 cm2 of ODF introduced in either 150 mL of simulated salivary medium (pH 6.8) or 150 mL of simulated gastric medium (pH 1.3) at 37°C under magnetic at 200 rpm. Samples of 1 mL were withdrawn every 30 seconds during 5 minutes and after 15, 30, 60 and 120 minutes and substituted by 1 mL of dissolution medium [24]. Samples were filtered through a 0.45 µm cellulose acetate membrane (Millipore®) and the TBZ concentration was measured by UV spectroscopy (UV-1601, UV Visible spectrometer, SHIMADZU) at 282 nm. Dissolution experiment was reproduced in triplicate for each formulation to determine release profile and cumulative percentage [23].

2.2.4. API characterization in ODF

Fourier infrared transform spectroscopy

Attenuated total reflection (ATR)-FT-IR (IRPrestige-21, SHIMADZU) was used to highlighting interactions between TBZ and excipients. Measurements were performed on each initial compound and on each formulation of ODF. Samples were place on a crystal, pressed and spectra were recorded. Background was obtained using a fleshly cleaned crystal. Analyses were conducted in frequency range between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1}. Each analysis was repeated three times.

Thermal analysis

In order to characterize TBZ physical state in ODF, Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) was used. It was performed by DSC Q200 (TA instruments) equipped with a refrigerated cooling accessory (RCS90) and a data analyzer (Universal Analysis 2000, TA instruments). The equipment was calibrated with Indium. Inert atmosphere was maintained by nitrogen at a flow rate of 20 mL/min. An empty aluminum pan was used as reference. Samples (pure TBZ, physical mixture and TBZ-loaded in ODF) were modulated at 0.2°C every 60 s with heating rate of 5°C/min. TBZ and ODF (9-11 mg) were placed in hermetically sealed aluminum pans and heated from 10 to 155°C to characterize the physical state of API in ODF.

Polarizing microscopy

For highlight the presence of crystals in ODF, polarizing microscopy (Leica DMLM) was used.

2.2.5. Investigation of ODF stability

ODF were stored in sealed aluminum strip and stability (ICH Q1-R2) was investigated at 40°C; 75% HR (accelerated storage conditions) during 6 months. Film samples of each formulation were withdrawn at 1, 3 and 6 months. Physicochemical and mechanical characterization, dissolution behavior, FT-IR spectra and thermal analyses were considered during this period to determine stability of ODF and TBZ.

2.2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using the R software (The R foundation) with a threshold of 5% corresponding to the alpha risk. As all data could not be normalized, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed. In order to determine significant differences ($p<0.05$) between two parameters, a multiple comparison post hoc test (kruskalmc) was conducted. Statistical analyses were investigated on dissolution results between pure drug and each type of ODF and between ODF at T=0 in salivary and gastric media. In addition, tests were conducted on the drug release profile, in salivary and gastric media, for each ODF formulation during their storage (at 1, 3 and 6 months). Statistical analyses were also performed on drug content variation in ODF during stability studies.

3. RESULTS

3.1. Physicochemical and mechanical properties

ODF properties immediately after preparation, T=1 month, T=3 months and T=6 months of storage are presented in table 2. Analyses were conducted on ODF with a surface of 4 cm2 and a mass range from 60 to 80 mg. Concerning morphological characterization, at T0 all ODF were homogenous and transparent but an opacification can be observed after 1 month for PVP-ODF (F2) and 3 months for HEC-ODF (F4) (table 2). For every formulation, a yellowing more or less important was noted after 1 month of storage. ODF flexibility was determined by folding endurance and rigidity was measured by DMA. After preparation, HPMC-ODF presented a higher flexibility than PVP-based formulations. The flexibility of ODF formulations can be classified as follows: HPMC-ODF (F1)>HEC-ODF (F4)>PUL-ODF (F3)>PVP-ODF (F2). Concerning the film rigidity, HPMC-based formulations

presented the highest rigidity and a classification of film rigidity can be suggested as follow: HPMC-ODF (F1)>PUL-ODF (F3) >PVP-ODF (F2) > HEC-ODF (F4). After 6 months of preservation, PUL-ODF (F3) became more brittle.

Even if no significant differences can be observed, the moisture content values of PVP-based appeared slightly higher than others formulations. However these values never exceeded 7% (w/w) and no evolution during storage was noticed.

For each formulation, the disintegration time was lower or equal to 50 seconds at T0 and remained quite similar during the 6 months except for HEC-ODF. Indeed, for HEC-ODF the disintegration time increased after 6 months of storage (60 sec).

At T0, drug contents in ODF were quite similar, varying from 15.0 to 16.9 mg of TBZ for 100 mg of ODF. After 6 months, no drug loss was observed for HPMC-ODF (F1) and PUL-ODF (F3), but for PVP-ODF (F2) and HEC-ODF (F4), a 5% of drug content loss was estimated.

Table 2: Physicochemical characterizations of formulations at T0 and after T= 1, 3 and 6 months of storage.

	MORPHOLOGICAL DESCRIPTION	THICKNESS (μM) (N=9)	FOLDING ENDURANCE (N=3)	YOUNG MODULUS (KPA)	MOISTURE CONTENT (% W/W) (N=3)	DISINTE-GRATION TIME (SEC)	DRUG CONTENT MG_{TBZ}/100 MG_{FILM} (N=3)
HPMC-ODF (F1)	Homogeneous, transparent, slightly yellow, both sides smooth	176±7.5	>100	187.5±19	3.1±1.1	45	15.0±0.15
F1 T= 1 MONTH	Homogeneous, transparent, slightly yellow, both sides smooth	-	>100	-	4.1±0.5	40	15.3±0.2
F1 T= 3 MONTHS	Homogeneous, transparent, more yellow, both sides smooth	-	>100		3.6±0.2	40	15.0±0.2
F1 T= 6 MONTHS	-	-	>100	-	3.1±0.8	40	15.1±0.1
PVP-ODF (F2)	Homogeneous, transparent, colorless, both sides smooth	122±4.3	25±5	106±19	5.6±1.15	35	16.2±0.1
F2 T=1 MONTH	Not homogeneous, opaque areas, colorless, both sides smooth, more flexible	-	47±3	-	7.1±0.2	35	16.0±0.2
F2 T= 3 MONTHS	Homogeneous, opaque, slightly yellow, both sides smooth, more flexible	-	58±5		6.0±0.4	35	15.4±0.3
F2 T= 6 MONTHS	-	-	59±3	-	5.7±0.7	35	15.5±0.2
PUL-ODF (F3)	Homogeneous, transparent, colorless, both sides smooth	124±11.3	46±10	137±21	4.5±0.31	30	15.9±0.2
F3 T= 1 MONTH	Homogeneous, transparent, slightly yellow, both sides smooth	-	32±5	-	2.7±0.5	30	15.9±0.2
F3 T= 3 MONTHS	Homogeneous, transparent, slightly yellow, both sides smooth	-	34±6		4.7±0.05	30	15.9±0.2
F3 T= 6 MONTHS	-	-	31±5	-	5.6±0.9	30	16.0±0.13
HEC-ODF (F4)	Homogeneous, transparent, colorless, both sides smooth	134±7.2	88±5	76±16	4.1±1.3	50	16.9±0.1
F4 T= 1 MONTH	Homogeneous, transparent, colorless, both sides smooth	-	82±6	-	3.8±0.3	45	16.9±0.1
F4 T= 3 MONTHS	Not homogeneous, opaque areas, slightly yellow, both sides smooth	-	79±5		4.4±0.1	45	16.9±0.05
F4 T= 6 MONTHS	-	-	79±3	-	4.8±0.2	60	16.1±0.2

3.2. TBZ release profiles

As shown in Figure 1(a), in the salivary medium, the pure TBZ had a slow dissolution profile with only 20% of the drug dissolved after 15 minutes. In the same conditions, the dissolution of TBZ-loaded in ODF was faster since approximately 85% of the total amount of TBZ was released during the first 5 minutes, regardless of formulations. Statistical study showed significant differences between pure drug and ODF drug release. In addition, significant differences were observed between PVP-ODF and PUL-ODF from 4 minutes of kinetic release. However, after 3 months of storage, the amount of TBZ released from PVP-ODF (F2) appears lower, with only 75% of TBZ dissolved at 5 minutes (Figure 1(b)). For the PVP-ODF this same observation were made from 1 month (data not shown) and 6 months (Figure 1(c)). However, no significant differences were observed for PVP-ODF at T=1, 3 and 6 months compared to T=0. During 6 months, dissolution behavior for HPMC and PUL-ODF remained similar and no significant differences were observed. A slight decrease of drug released was induced for HEC-ODF(F4) after 3 months of storage (Figure 1(b)) without being significantly different compared to T=0, but this trend increased after 6 months with only 70% of TBZ released after 15 minutes (Figure 1(c)). At this time, significant differences were observed compared to T=0.

In the gastric medium (pH 1.3), the dissolution of TBZ was instantaneous in both cases, free or formulated drug (Figure 1(d)). No significant differences were observed between pure drug and ODF. Though, during stability studies, final amount of drug released declined. After 3 months, amount of drug released at 15 minutes decrease by 8±3% for PVP-ODF and from 6 months 5±1% for PVP-ODF and HEC-ODF (Figure1(c)). These differences between T=0 and T= 6 months for HEC-ODF were statistically significant.

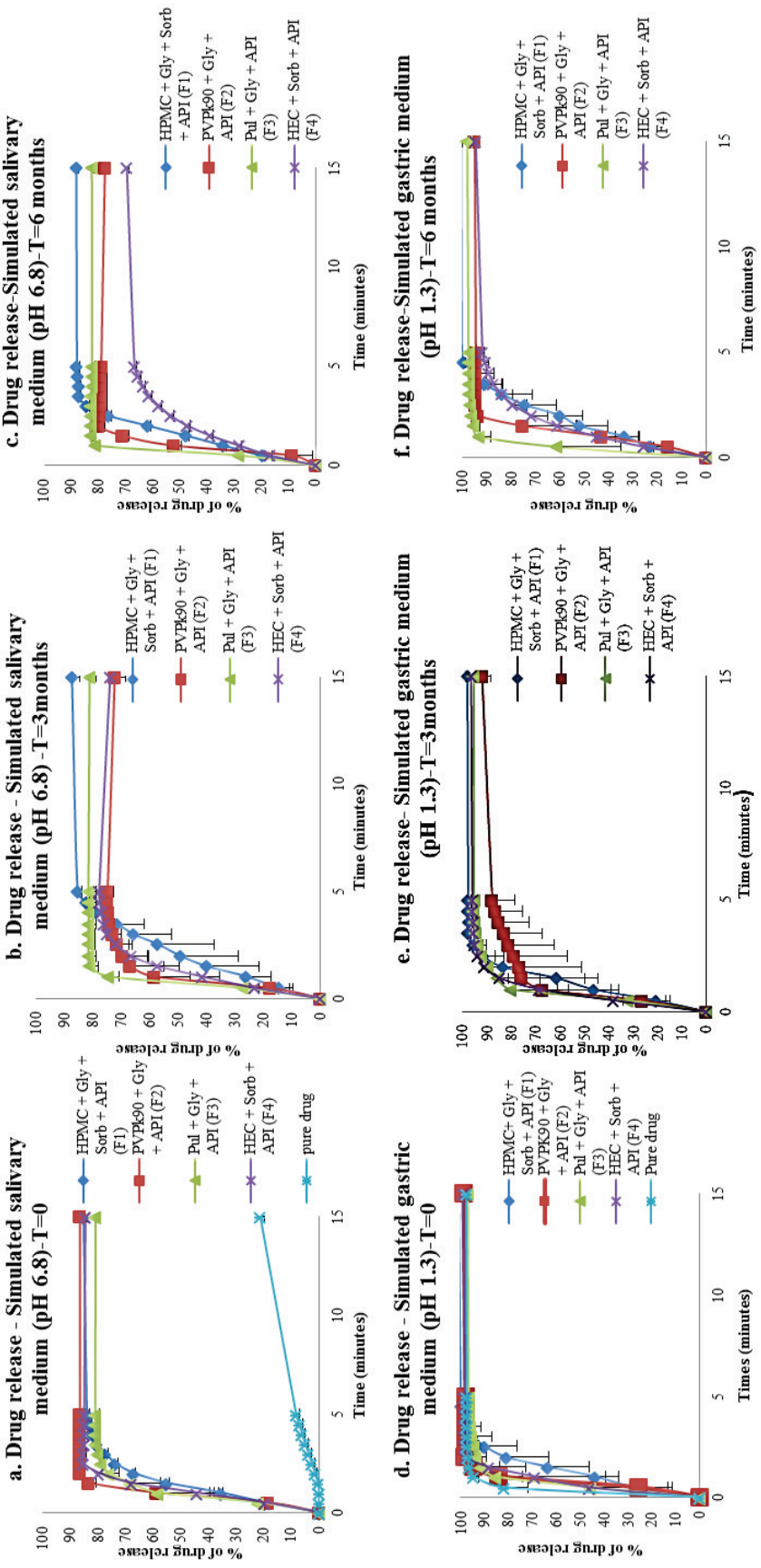


Figure 1: Drug release profiles of the TBZ alone (pure drug) and the TBZ in ODF in salivary at T=0 (a), 3 months (b) and 6 months (c) and in gastric media at T=0 (d), 3 months (e), 6 months (f).

3.3. API characterization in ODF

FT-IR spectroscopy

The characteristic peaks in FT-IR spectra of pure-TBZ, TBZ-CA mixture, PVP blank films and TBZ loaded PVP-ODF at T0 and after 3 months are shown in Figure 2. Peak assignements of FITR of TBZ-excipients physical mixtures and each ODF formulations are presented in Table 3.

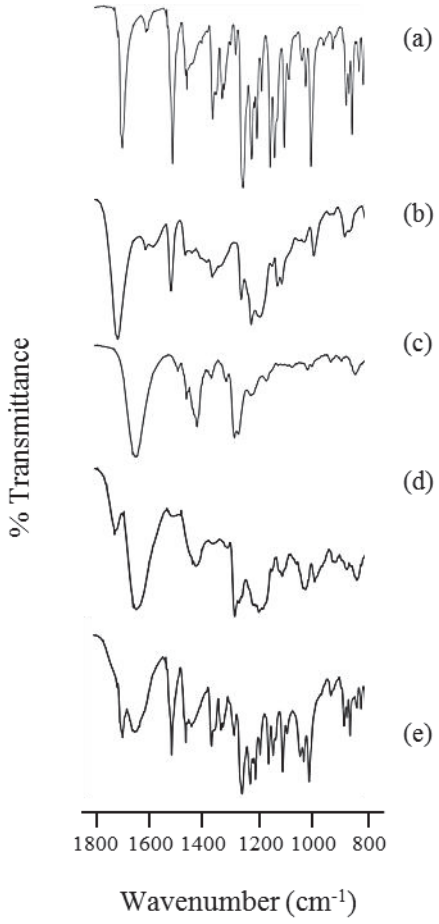


Figure 2: FT-IR spectra of pure TBZ (a), TBZ-CA mixture (b), PVP blank film (c), TBZ-loaded in ODF composed of PVP at T0 (d) and T= 3 months (e).

As shown on Figure 2(a), pure TBZ FT-IR spectrum presented several characteristic peaks : i) at 1697 cm^{-1} and 1257 cm^{-1} corresponding to the stretching of carbonyl (C=O), ii) at 1604, 1514 and 1462 cm^{-1} corresponding to the stretching of aromatics (C=C), iii) at 1226 cm^{-1} corresponding to the stretching of amine (C-N) and, iv) at 1107 cm^{-1} corresponding to the stretching of ether function (C-O-C). Figure 2(b) showed the spectrum of the mixture obtained after solubilization of the TBZ and citric acid in water followed by drying. A merge

of the carbonyl peaks present in the TBZ (1697 cm^{-1}) and citric acid (1691 cm^{-1}) in a more intense peak with a shift towards lower wavelengths (1714 cm^{-1}) was observed. The peaks corresponding to other characteristic functions were not modified. For each type of ODF formulation, the presence of peaks characteristic of aromatic, ether and amine functions was observed (Table 3). Peaks corresponding to carbonyl function observed in the various mixture were retrieved in final formulations. After 1, 3 or 6 months storage, no major changes were observed except for PVP-ODF (F2) and HEC-ODF (F4). At T= 3months carbonyl peaks of the PVP-ODF (F2) formulation were split (Figure 2(e)), and at T = 6 months, a shift of carbonyl peak was observed for HEC-ODF (F4).

Table 3 : Peak positions of different function groups in the IR spectrum for TBZ, CA, mixture TBZ-CA, polymers used in the preparation of ODF and ODF at T0 and after T= 1 month and T=3 months of storage.

Coumpounds/ODF	C=O (cm-1)	C=C (cm-1)	C-N (cm-1)	C-O-C (cm-1)
TBZ	1697; 1257	1605,1514,1462	1226	1107
CA	1691	-	-	-
TBZ + CA	1714; 1261	1612; 1518; 1465	1224	1113
HPMC + Gly + Sorb + CA	1722	-	-	1036
PVP k90 + Gly + CA	1718.5; 1641; 1288	-	1207	-
Pullulan + Gly + CA	1717	-	-	1012
HEC + Sorb + CA	1722	-	-	1050 ; 1022
HPMC-ODF (F1)	1726; 1261	1605, 1518,1450	-	1105; 1047
F1 (3 months)	1726 ; 1263	1612;1517	1226	1109 ; 1037
F1 (6 months)	1723; 1262	1610; 1520; 1410	1225	1039
PVP-ODF (F2)	1726; 1647; 1288	1649, 1514	1200	1114
F2 (3 months)	**1693,5 ; 1651 ; 1285 ; 1256**	1514 ; 1462	1226	1107
F2 (6 months)	**1694 ; 1649; 1288; 1256**	1520; 1462	1206	1110 ; 1043
PUL –ODF (F3)	1718; 1261	1598, 1518	1224	1111; 1016
F3 (3 month)	1722; 1261	1602; 1519	1226	1112
F3 (6 months)	1720 ; 1225	1610 ; 1520	1225	1112 ; 1023
HEC-ODF (F4)	1722; 1261	1612,1518,1457	1224	1112; 1026
F4 (3 month)	1722; 1261	1612; 1519	1226	1112; 1024
F4 (6 months)	**1721, 1700 ; 1257**	1610 ; 1514	1226	1107 ; 1010

Thermal analysis

The DSC thermograms of pure TBZ, physical mixtures and TBZ-loaded in ODF are shown in Figure 3. Sharp melting peak of API can be observed at about 129°C (Figure 3(a)). No drug melting peak was observed in the thermograms of ODF formulations (Figure 3(c),(e),(g),(i)),

whereas thermograms of physical mixtures showed a distinct shift peak of TBZ (Figure 3b,d,f,h) towards lower temperatures, at about123°C.

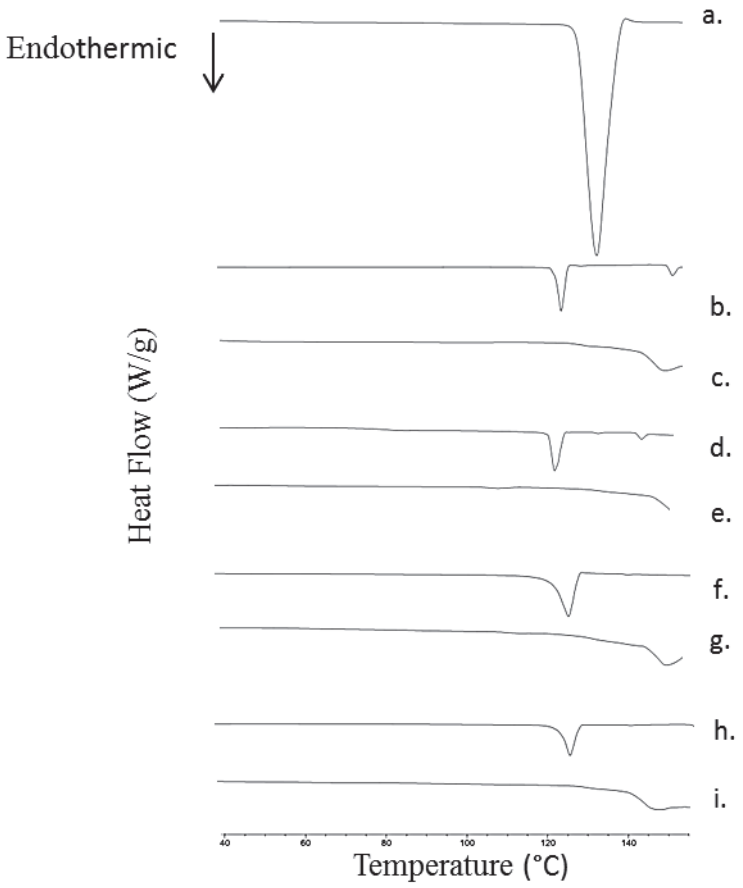


Figure 3: TBZ pure (a), physical mixtures TBZ/HPMC, TBZ/PVPK90, TBZ/Pullulan, TBZ/HEC (respectively b,d,f,h) and TBZ-loaded OF composed of HPMC, PVPK90, Pullulan and HEC(respectively c,e,g,i).

After 6 months of stability, no melting peak of TBZ was observed for HPMC-ODF (F1) and PUL-ODF (F3). However, endothermic peak was present for PVP-ODF (F2) (Figure 4(b),(c),(d)) at about 114°C from 1 month and became more intense after 3 months. For HEC-ODF (F4), endothermic peak at 114°C appeared after 6 months only (Figure 4(e)).

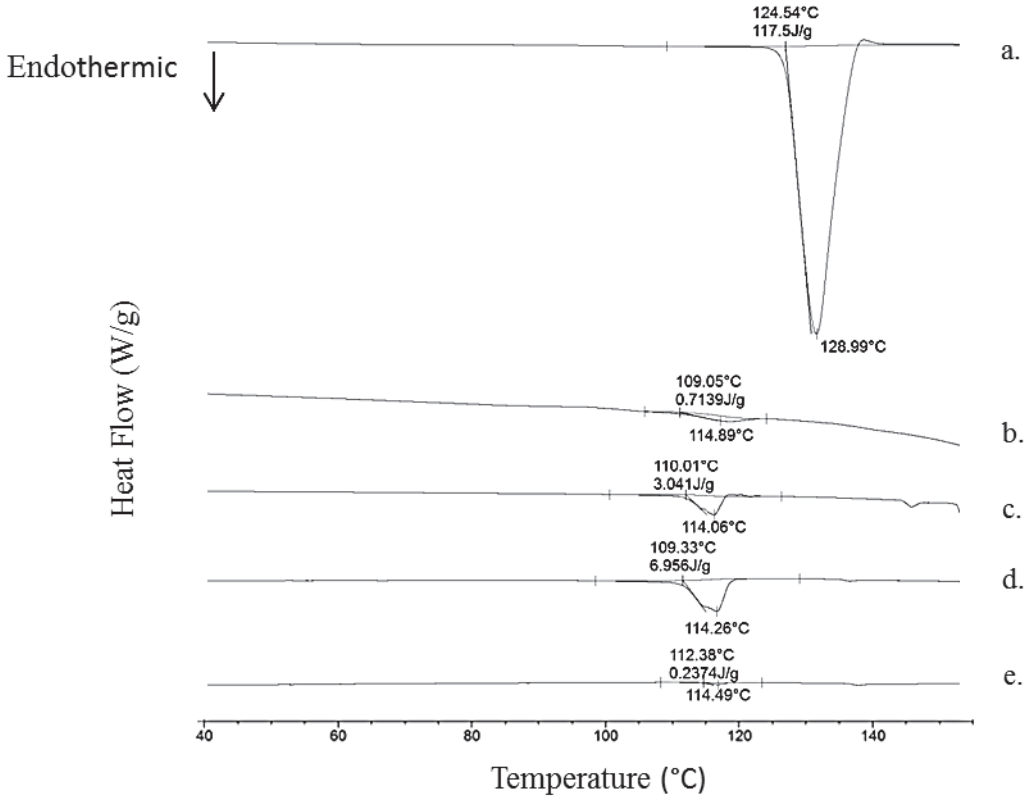


Figure 4: TBZ pure (a), TBZ-loaded in OF composed of PVPK90 (F2) at T= 1, 3, 6 months (b, c, d respectively) and TBZ-loaded in OF composed of HEC (F4) at T=6months (e).

Polarizing microscopy

By polarizing microscopy (Figure 5(a)), no crystals were observed in ODF at T0 whatever the formulation. But, after 1 month, crystals appeared in PVP-ODF (F2) and grow with time up to occupy the entire surface of the film. For HEC-ODF (F4)(Figure 5(b)), the drug started to recrystallize after 3 months while for HPMC-ODF (F1) and PUL-ODF (F3) no crystals were observed during all the stability study **(**Figure 5(b),(c)).

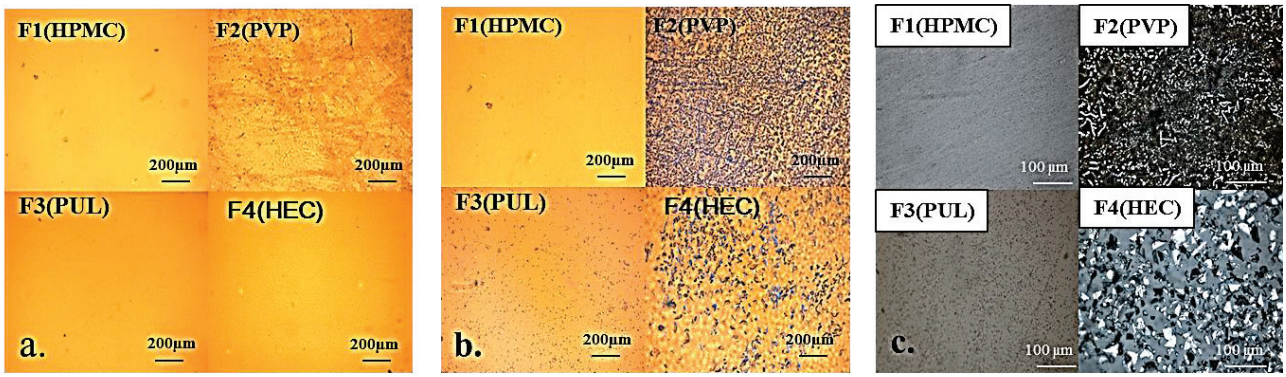


Figure 5 : Polarized light microscope images of F1 F2, F3 and F4 at T=0 (a); 3 months (b) and 6 months (c).

4. DISCUSSION

Four formulations of ODF for pediatric administration of tetrabenazine were developed using 4 different film forming agents: HPMC, PVP K90, Pullulan and HEC. These polymers were chosen for their well-described ability to form thin and resistant films, their high hydrosolubility and their safety [4, 5]. After preparation, each film presented suitable morphological properties with a homogenous and transparent aspect. A slight yellowing was observed at T0 for HMPC formulation mainly due to the polymer coloration. During preformulation experiments, we observed that the addition of TBZ in the polymeric matrix increased the brittleness of HPMC, PVP and PUL-ODF (data not shown). However, the incorporation of a plasticizer like glycerol in these formulations has restored the mechanical properties allowing the manipulation of film without risk of breakage. These mechanical properties were characterized in this study by both the folding endurance evaluation and the Young's modulus quantification (table 2). The folding endurance gives an indication of the flexibility and so the brittleness of the film. HPMC-ODF appeared as the more flexible formulation since it was not broken after more than 100 foldings. PVP-ODF was the less flexible (around 46 foldings) despite the use of plasticizer. Rigidity and strength of each ODF formulation can be also compared by their Young's modulus. Young's modulus values obtained for ODF were closed to the values providing from the literature [25]. The four ODF formulations presented low values of Young's modulus (between 80 and 190 kPa) confirming their high flexibility. However, HPMC-ODF appeared as the strongest ODF. The same observations were described in the literature. Woertz et al. demonstrated that the maximum force and the tensile strength were higher for the HPMC films compared to HPC films, for example [26]. Moisture content and plasticizers could explain these Young's modulus values by improving the mobility of the polymer chains. Moreover, solid content in ODF could increase the Young's modulus values as described by Sievens-Figueroa et al [8]. In our case the highest value of Young's modulus was obtained for the HPMC-ODF which had the highest solid content.

No loss of TBZ occurred during the fabrication process of ODF since as expected the average drug content in ODF was around 12.5 mg/film of 4 cm^2, corresponding to a load of TBZ between 15.0 and 16.9 % (w/w) depending of ODF thickness. Biopharmaceutical trends of ODF were also considered in this study. Each ODF formulation was quickly disintegrated in saliva simulated conditions at 37°C, with mean disintegration times lower than 50s. This rapid disintegration aimed to improve the release of the drug for both oromucosal absorption and

further gastrointestinal absorption when ODF residues are swallowed. This rapid disintegration also ensures comfort and convenience of administration [23, 27].

In vitro drug release studies in salivary conditions, underlined the major effect of the ODF form on TBZ dissolution improvement. For the 4 formulations around 85% of TBZ was released after 5 minutes whereas only 10% of pure TBZ was dissolved and 38.8 ± 1.2% after 1 hour. This slow dissolution of pure TBZ is due to its poor solubility at pH 6.8. Statistical analyses showed significant differences between pure drug and ODF testifying enhancement of drug solubility in salivary medium. Moreover, significant differences between PVP-ODF and PUL-ODF indicated that drug release in PVP-ODF was significantly greater than PUL-ODF in terms of solubility enhancement. The incorporation of TBZ in polymeric matrix to form ODF led to a major improvement of drug dissolution properties and then to its better bioavailability in oromucosal environment. This improvement of dissolution properties of TBZ may be explained by the state of TBZ in ODF. Same observations were made by Cilurzo *et al.* and Kianfar et al., who studied the dissolution profile of water insoluble drug incorporated in maltodextrins [27], carrageenan and poloxamer [28] ODF. They assumed that its improvement was mainly due to the hydrophilic nature of the polymeric matrix allowing an enhancement of the API wettability and also to the state of the API in the ODF. Drugs in ODF were either dispersed in the matrix or solubilized [26]. In our case, TBZ was previously solubilized in water with citric acid and then introduced in the polymer matrix. After drying, TBZ remained dissolved in the polymer matrix. This hypothesis was confirmed by polarized microscopy analyzes since no crystal was observed in the 4 film formulations. Same observations also derived from thermal analyses. Indeed, at T0, no melting peaks corresponding to API were observed on DSC thermograms for all ODF (Figure 3). TBZ in ODF was in amorphous state allowing the improvement of drug dissolution [29]. In addition, analysis of physical mixtures of the excipients with the API showed a distinct shift of the drug melting peak. This observation suggested interactions between TBZ and polymers [30]. Moreover FT-IR results at T0 confirmed this intermolecular interaction in ODF between excipients and TBZ since a shift of the carbonyl peak was observed (Figure 2).

To summarize, at T0, only few differences were highlighted between properties of the various ODF. All the ODF were homogeneous, presented suitable mechanical properties for easily handling. Moreover, whatever the film forming polymer used, TBZ was in amorphous state in the ODF allowing an accelerated release of the API in a mimicking buccal environment. However, the formulation of ODF implies some challenges in term of polymeric films and

API stability. Therefore, to provide elements for discriminating formulations, stability tests were carried out during 6 months in accelerated storage conditions (40°C and 75% HR) according to the ICH guidelines. After 3 months of storage, the amount of TBZ-loaded in PVP-ODF decreased by 5% and the same trend was observed for HEC-ODF after 6 months. While these differences were not statistically significant, these slight decreases of the drug content was associated to an opacification of PVP- and HEC-ODF. For HPMC-ODF and PUL-ODF the TBZ content remained unchanged and no opacification was observed after 6 months. However, a slight yellowing of the films was observed for HMPC, PUL and HEC-ODF that could result from the occurrence of some impurities. However, this yellowing of TBZ was not necessarily associated to a loose of the drug amount as previously described by Bourezg *et al.* [31]. Some modifications of the TBZ dissolution behaviors at pH 6.8 were also observed for PVP- and HEC-ODF during stability studies. After 3 months, a decrease of the TBZ amount released occurred for ODF-PVP with a mean of 75% of TBZ dissolved after 5 minutes compared to 87% for the newly prepared film, but this difference was not statistically significant. The decrease is more important with HEC-ODF after 6 months of storage since only 69% of the TBZ content was dissolved in 5 minutes. Indeed, significant differences was observed for HEC-ODF between T=0 and T=6 months, in salivary and gastric media, showing a slower release profile of TBZ after storage for this formulation. However no significant modifications of the TBZ release profile were observed for HMPC- and PUL-ODF after 6 months of storage. These major changes on PVP-ODF or HEC-ODF properties could be explained by the evolution of API state in the film. Indeed, thermal and microscopy polarizing analyses (Figures 3 and 4) demonstrated the emergence of crystals in films. In addition, FT-IR showed, after 3 months for PVP-ODF and 6 months for HEC-ODF, duplication of the peak corresponding to carbonyl. These two peaks corresponded to the carbonyl wavelength of both pure TBZ and polymer blank film. The apparition of these peaks reflected the loss of molecular interactions between drug and polymer that would promote molecular mobility, increasing drug-drug interactions and TBZ recrystallization.

In the first place (at T0), TBZ was under an amorphous state in the four ODF formulations, probably subsequent to the formation of solid dispersions. This amorphous state led to the improvement of TBZ dissolution properties [32]. To maintain these biopharmaceutical properties the challenge is to inhibit drug crystallization in films. In the case of solid dispersions, the inhibition of the API recrystallization is mainly due to the strength of drug-polymer interactions predominant under drug-drug interactions [30]. However, for several

reasons, high hygroscopy of the polymer, poor drug-polymer miscibility, API recrystallization often occurs. In our study TBZ recrystallization surprisingly occurred in PVP-ODF, despite many authors have suggested the use of PVP as a good polymer to inhibit drug crystallization [33, 34]. On the opposite, no TBZ recrystallization was observed in our study for HMPC-ODF. Meng *et al.* also observed a better stability of their model drug curcumin (CUR) in a HPMC-CUR system than in a PVP-CUR. They suggested that with HPMC, the polymer-drug interactions were strong enough to avoid drug-drug or polymer-polymer interactions and then subsequent recrystallization of the drug [32]. Besides the strength of polymer-drug interactions, the type of interactions, such as ionic or H-bond interactions, also affects the drug stability. Some authors described that the ability of polymers to form H-bond with drug, avoiding drug-drug dimerization, played a major role in the crystallization inhibition of the drug [35]. Meng *et al.* suggested that molecular interactions by H-bond, occurring between drug and polymer, can be correlated to the number of the potential hydrogen bond donors or receptors of the polymer and the drug. In our case, TBZ has 4 hydrogen bond receptors [32]. According to Meng *et al.*, PVP monomer has 1 hydrogen bond receptor and HPMC monomer has 5 hydrogen bond receptors and 1 hydrogen bond donor. Therefore, for PVP the number of potential functional group which might interact with TBZ is minor compared to HPMC. This might explain recrystallization of TBZ in PVP-ODF and its better stability in HMPC [32]. In addition, moisture increases the molecular mobility of the particles and promotes molecule rearrangement to form aggregates that will organize in crystals [30]. Moisture present during the manufacture and preservation induced phase separation in particular when the polymer is very hygroscopic and the API hydrophobic [30]. Rearrangement of API could be anticipated by study of miscibility and molecular interactions capacities [32]. Further investigations have to be performed in our case in order to investigate the formation of solid dispersions and their stability for each polymer formulations.

5. CONCLUSION

In this study four formulations of ODF for children were developed with several polymer matrices. Evaluation of the ODF properties during 6 months allowed identifying optimal formulations based on the HMPC and Pullulan matrices (F1 and F3). Indeed, these ODF kept all characteristics obtained at T0: physicochemical and mechanical aspect, dissolution behaviors in salivary and gastric media and amorphous state of the drug in films even after 6 months of storage. For others formulations with PVP and HEC, a TBZ recrystallization was observed after 3 or 6 months leading to a loss of the dissolution improvement effect of ODF. Maintain API in amorphous state in ODF represents a major challenge to ensure the stability of drug and ODF biopharmaceutical properties.

REFERENCES

1. Strickley R *et al.*. Pediatric Drugs—a Review of Commercially Available Oral Formulations. *J Pharm Sci.* 2008; 97(5): 1731–74. doi:10.1002/jps.21101.
2. Food and Drug Administration, Specific Requirements on Content and Format of Labeling for Human Prescription Drugs; Revision of ``Pediatric Use'' Subsection in the Labeling; Final Rule. Federal Register Volume 59, Number 238, December 1994.
3. Ali A et al.. Pediatric Drug Development: Formulation Considerations. *Drug Dev Ind Pharm*.2014; 1–17. doi:10.3109/03639045.2013.850713.
4. Bala R *et al.*. Orally Dissolving Strips: A New Approach to Oral Drug Delivery System. *Int J Pharm Investigation* 2013; 67. doi:10.4103/2230-973X.114897.
5. Dixit R.P, Puthli S.P. Oral Strip Technology: Overview and Future Potential. *J Control Release 2009*; 139(2): 94–107. doi:10.1016/j.jconrel.2009.06.014.
6. Morales J.O, McConville J.T. Manufacture and Characterization of Mucoadhesive Buccal Films. Eur J Pharm Biopharm 2011; 77 (2): 187–99. doi:10.1016/j.ejpb.2010.11.023.
7. Shen B *et al.*. Development and Characterization of an Orodispersible Film Containing Drug Nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 85(3): 1348–56. doi:10.1016/j.ejpb.2013.09.019.
8. Sievens-Figueroa L *et al.*. Preparation and Characterization of Hydroxypropyl Methyl Cellulose Films Containing Stable BCS Class II Drug Nanoparticles for Pharmaceutical Applications, *Int J Pharm* 2012; 423(2): 496–508. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.001.
9. Qiao Jun Low A *et al.*. Effect of Type and Ratio of Solubilising Polymer on Characteristics of Hot-Melt Extruded Orodispersible Films. *Int J Pharm* 2013; 455 (1–2): 138–47. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.046.
10. Sakata Y, Otsuka M. Evaluation of Relationship between Molecular Behaviour and Mechanical Strength of Pullulan Films. *Int J Pharm* 2009; 374(1–2): 33–38. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.02.019.
11. Okabe H *et al.*. Development of an Easily Swallowed Film Formulation. *Int J Pharm* 2008; 355(1–2): 62–66. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.11.038.
12. Raju D.B, Prem Kumar G. Polyvinylpyrrolidone Oral Films of Enrofloxacin: Film Characterization and Drug Release. *Int J Pharm* 2014; 471: 146–52. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.05.033.
13. Karavas E *et al.*. Application of PVP/HPMC Miscible Blends with Enhanced Mucoadhesive Properties for Adjusting Drug Release in Predictable Pulsatile Chronotherapeutics. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 64(1): 115–26. doi:10.1016/j.ejpb.2005.12.013.
14. Kun Luo *et al.*. Mucoadhesive and Elastic Films Based on Blends of Chitosan and Hydroxyethylcellulose. *Macromol Biosci* 2008; 8 (2): 184–92. doi:10.1002/mabi.200700185.
15. Pathare Y.S. *et al.*. Polymers Used for Fast Disintegrating Oral Films : A Review. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2013; 21(1): 169–178.
16. Fabiano V *et al.*. Paediatric Pharmacology: Remember the Excipients. *Pharm Res* 2011; 63(5): 362–65. doi:10.1016/j.phrs.2011.01.006.
17. Walsh J *et al.*. Playing Hide and Seek with Poorly Tasting Paediatric Medicines: Do Not Forget the Excipients. *Adv Drug Deliv Rev* 2014. doi:10.1016/j.addr.2014.02.012.
18. -European Medicines Agency, Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use, EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev. 2, adopted July 2013.

19. Guay D. Tetrabenazine, a Monoamine-Depleting Drug Used in the Treatment of Hyperkinetic Movement Disorders. *Am J Geriatr Pharmacother* 2010; 8(4): 331–73. doi:10.1016/j.amjopharm.2010.08.006.

20. Jain S *et al.*. Tetrabenazine Therapy of Pediatric Hyperkinetic Movement Disorders. *Mov Disord* 2006. 21(11): 1966–72. doi:10.1002/mds.21063.

21. Chen J. *et al.*. Tetrabenazine for the Treatment of Hyperkinetic Movement Disorders: A Review of the Literature. *Clin Thera* 2012; 34(7). doi:10.1016/j.clinthera.2012.06.010.

22. Gittings S *et al.*. Dissolution Methodology for Taste Masked Oral Dosage Forms. *J Control Release* 2014; 173: 32–42. doi:10.1016/j.jconrel.2013.10.030.

23. Sayed S *et al.*. Fast-Dissolving Sublingual Films of Terbutaline Sulfate: Formulation and In Vitro/In Vivo Evaluation. *Mol Pharm* 2013; 10: 2942–47. doi:10.1021/mp4000713.

24. Nalluri B.N *et al.*. Development and Evaluation of Mouth Dissolving Films of Sumatriptan Succinate for Better Therapeutic Efficacy. *J Appl Pharml Sci Ed* 2013. DOI: 10.7324/JAPS.2013.3828.

25. Woertz C *et al.*. Development of Orodispersible Polymer Films with Focus on the Solid State Characterization of Crystalline Loperamide. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 94: 52–63. doi:10.1016/j.ejpb.2015.04.036.

26. Cilurzo F *et al.*. Fast Dissolving Films Made of Maltodextrins. *Eur J Pharm and Biopharm* 2008; 70(3): 895–900. doi:10.1016/j.ejpb.2008.06.032.

27. Kianfar F *et al.*. Novel Films for Drug Delivery via the Buccal Mucosa Using Model Soluble and Insoluble Drugs. *Drug Dev Ind Pharm* 2012; 38(10): 1207–20. doi:10.3109/03639045.2011.644294.

28. Xu L *et al.*. Formulation and in Vitro Characterization of Novel Sildenafil Citrate-Loaded Polyvinyl Alcohol-Polyethylene Glycol Graft Copolymer-Based Orally Dissolving Films. *Int J Pharm* 2014; 473: 398–406. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.07.037.

29. Baird J, Taylor L. Evaluation of Amorphous Solid Dispersion Properties Using Thermal Analysis Techniques. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64(5): 396–421. doi:10.1016/j.addr.2011.07.009.

30. Bourezg Z *et al.*. Structural Elucidation of Two Photolytic Degradation Products Oftetrabenazine. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 91: 138–43. doi:10.1016/j.jpba.2013.12.032.

31. Meng F *et al.*. Investigation and Correlation of Drug Polymer Miscibility and Molecular Interactions by Various Approaches for the Preparation of Amorphous Solid Dispersions. *Eur J Pharm Sci* 2015; 71: 12–24. doi:10.1016/j.ejps.2015.02.003.

32. Yoshioka M *et al.*. Inhibition of indomethacin crystallization in poly(vinylpyrrolidone) coprecipitates. *J Pharm Sci* 1995; 84 (8): 983–986. doi:10.1002/jps.2600840814

33. Khougaz K, Clas SD. Crystallization inhibition in solid dispersions of MK-0591 and poly(vinylpyrrolidone) polymers. *J Pharm Sci* 2000; 89: 1325–1334. doi:10.1002/1520-6017(200010)89:10<1325::AID-JPS10>3.3.CO;2-X

34. Matsumoto T, Zografi G. Physical properties of solid molecular dispersions of indomethacin with poly(vinylpyrrolidone) and poly(vinylpyrrolidone-co-vinylacetate) in relation to indomethacin crystallization. *Pharm Res* 1999; 16: 1722–1728. doi: 10.1023/A:1018906132279

2.3 Résultats complémentaires : caractérisation des produits de dégradation de la TBZ par LC-MS

Lors de l'étude de stabilité réalisée dans la partie précédente (article), un jaunissement des films orodispersibles (ODF) a été observé, laissant penser que la TBZ a pu se dégrader au cours du temps. Afin de vérifier l'intégrité de la TBZ dans les films à T=0 et durant la durée de conservation à 40°C et 75%HR, la TBZ a été analysée par LC-MS. Cette étude s'est appuyée sur une collaboration réalisée entre le LAGEP et l'EA 4446, laboratoire B2MC (Bioactive Molecules and Medicinal Chemistry). En effet, des travaux précédents entre ces 2 unités, portant sur l'étude de la stabilité de la TBZ en conditions de stress (photolytique, acido-basique, oxydatif, thermique) ont été réalisés et publiés (Bourezg *et al.*, 2014). Les résultats de cette étude ont montré que l'exposition intense à la lumière entraînait le jaunissement de la TBZ en solution aqueuse. En plus du jaunissement, deux produits de dégradation ont été isolés et caractérisés par LC-MS : la DTBZ (1,11b-dedihydrotetrabenazine) ayant un m/z = 316,2 et la TTBZ (1, 3, 4,11b-detetrahydrotetrabenazine) ayant un m/z= 314,2. Dans une autre étude réalisée par ces deux équipes (données non communiquées), l'analyse de la TBZ solubilisée en milieu aqueux acide avait révélé l'apparition d'un composé de même masse molaire que la TBZ avec un temps de rétention plus important. La proportion de ce composé inconnu, que l'on appellera TBZ*, était de l'ordre de 15 à 20%. Dans cette partie, nous chercherons d'une part à observer la présence d'un composé avec un temps de rétention plus important et d'autre part, à suivre l'apparition des produits de dégradation au cours du temps.

2.3.1 **Préparation des échantillons**

Afin d'extraire la TBZ présente dans les ODF, un film est découpé et pesé pour obtenir une masse d'environ 10mg. Ces 10mg de film sont placés dans un tube à hémolyse avec 2mL d'ACN. L'échantillon est agité à l'aide d'un vortex durant 1 minute à 3000 rpm. La solution est alors récupérée, diluée dans de l'ACN pour obtenir une concentration en TBZ de 0,5 mg/mL et filtrée à l'aide d'une membrane filtrante en nylon de porosité 0.22µm (Millipore®).

2.3.2 **Méthode LC-MS**

La LC-MS est une technique d'analyse couplant une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et un spectromètre de masse (MS). Grâce à cette technique, il sera possible de séparer et détecter les composants d'une solution (HPLC) mais aussi de déterminer la masse (m/z) des composés séparés (MS). L'analyse en chromatographie liquide

a été effectuée grâce à une uHPLC (ultra High Performance Liquid Chromatography) Agilent 1920 Infinity (Agilent Technologies, USA). La méthode utilisée pour déterminer la masse du (ou des) composé(s) présent(s) dans les films a été mise au point par l'EA 4446. Les conditions d'analyse sont les mêmes que celles décrites par Bourezg *et al.* (Annexe 3).

2.3.3 **Résultats et discussion**

2.3.3.1 *Caractérisation de la TBZ dans les films orodispersibles*

Le Tableau 20 regroupe les résultats obtenus en LC-MS (spectrométrie de masse Secondary Ion Monitring-SIM) pour la TBZ pure solubilisée dans de l'ACN et la TBZ extraite des ODF. L'analyse de la TBZ pure solubilisée dans de l'ACN a montré la présence d'un seul pic à un temps de rétention d'environ 3 minutes (Figure 37a). Le spectre de la TBZ extraite des films directement après fabrication, a montré la présence de la TBZ* (Figure 37b), de même masse molaire que la TBZ commercialisée mais avec un temps de rétention plus important, dans des proportions de l'ordre de 14 à 17,5%. Ces analyses confirment les résultats antérieurs obtenus dans un milieu aqueux acide.

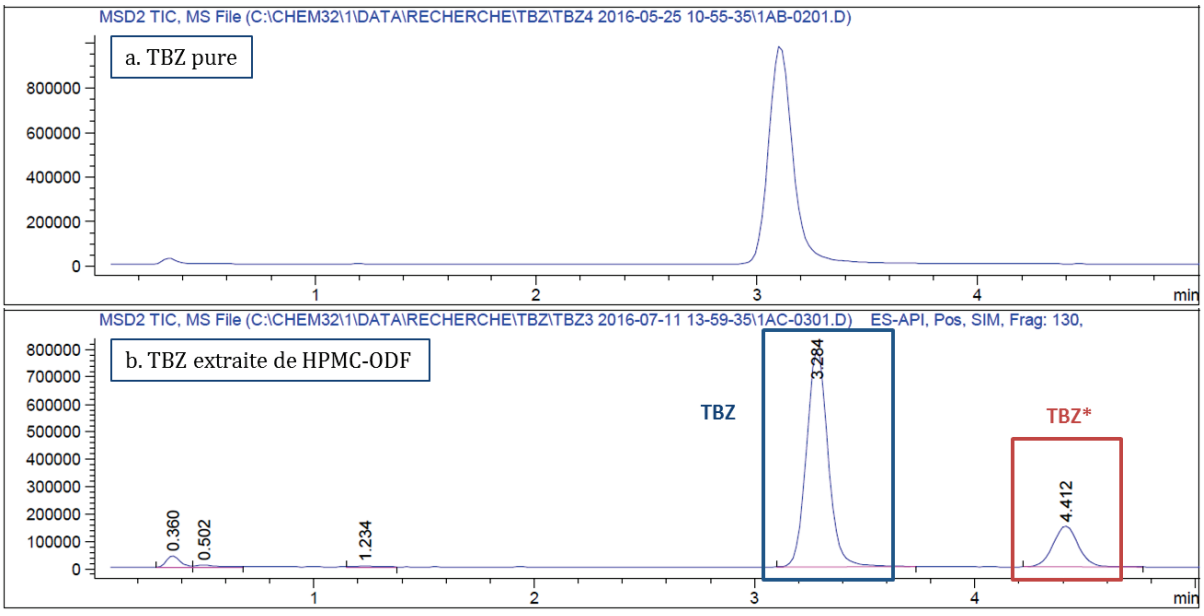


Figure 37 : Chromatogramme de la TBZ pure solubilisée dans ACN (a) et de la TBZ extraite de HPMC-ODF (b).

Après 6 mois de conservation à 40°C et 75%HR, une diminution de la TBZ* a été observée, dès 3 mois pour le film composé de PVP, et dès 6 mois pour le film composé d'HEC (Tableau 20). En parallèle, la quantité de TBZ croît. Ces résultats sont liés à la recristallisation de la TBZ observée précédemment. En effet, dans les films constitués de PVP et d'HEC

l'émergence de cristaux avait été constatée. La diminution de la TBZ* montre que la TBZ sous sa forme initiale tend à se réorganiser dans ces matrices. Cela montre que ce composé formé en milieu acide n'est pas un produit de dégradation.

Tableau 20 : Résultats LC-MS des pics de la TBZ contenue dans les films à T=0, T=3 mois et T=6 mois. Tr1 correspond à la TBZ (318,2 [TBZ+H] +) et Tr2 correspond à la TBZ* (m/z 318,2).

Echantillon	Observation visuelle	Tr1 MSD2	%	Tr2 MSD2	%
TBZ	Limpide, sans couleur	3	100	-	-
Films à T=0, Tamb, extraction dans ACN (n=3)					
F1	Homogène, transparent, légèrement jaune	3.289	78.4±0.9	4.417	17.4±0.3
F2	Homogène, transparent, Sans couleur	3.269	83.2± 2.3	4.392	14.2± 2.2
F3	Homogène, transparent, Sans couleur	3.259	81.2±0.5	4.482	17.2± 0.3
F4	Homogène, transparent, Sans couleur	3.267	82.3±0.9	4.402	14.6±0.2
Films à T=3mois, conservation à 40°C, 75%HR					
F1	Homogène, transparent, jaune	2.887	74.2± 0.7	3.687	17.2± 0.4
F2	Homogène, opaque, légèrement jaune	2.885	91.2 ±0.6	3.680	4.4± 0.5
F3	Homogène, transparent, légèrement jaune	2.857	79.7± 0.3	3.631	15.7± 0.1
F4	Non homogène, zone opaque, légèrement jaune	2.865	81.0± 0.3	3.640	14.2± 0.3
Films à T=6mois, conservation à 40°C, 75%HR					
F1	Homogène, transparent, jaune	3.108	80.1± 0.1	4.126	16.3±0.1
F2	Homogène, opaque, légèrement jaune	3.111	89.5± 0.7	4.128	6.5±0.6
F3	Homogène, transparent, légèrement jaune	3.116	84.3± 0.1	4.135	14.1± 0.6
F4	Non homogène, zone opaque, légèrement jaune	3.117	92.65±0.7	4.139	6.0±0.7

Des analyses avec des conditions de stress acide différentes (solubilisation dans un acide fort et un acide dilué, chauffage à 70°C durant 16 et 70 heures) ont été réalisées. Elles ont montré que le composé TBZ* apparaissait dans les mêmes proportions quelles que soient les conditions. L'hypothèse émise, serait qu'en milieu acide, la TBZ sous forme *cis* (RS/SR) se formerait. Il y aurait alors un équilibre entre la forme *cis* et *trans* (RR/SS) dans les proportions 15%/85%. En effet, la TBZ est commercialisée sous la forme racémique *trans* du fait de l'instabilité thermodynamique de l'isomère *cis* (Openshaw and Whittaker, 1963). L'instabilité

stéréogénique du noyau 2-oxobenzo[a]quinolizine substitué en position 3 en milieu acide a été décrite à partir d'une expérimentation antérieure par Oppolzer *et al.*, en 1987. Ainsi, l'interconversion de la *trans*-TBZ via la structure isoquinolinium ouverte en cis-TBZ peut être envisagée. Celle-ci impliquerait une racémisation au niveau des deux centres 11b et 3 par réaction de Mannich réversible (C-11b) et par énolisation réversible (C-3) (Figure 38).

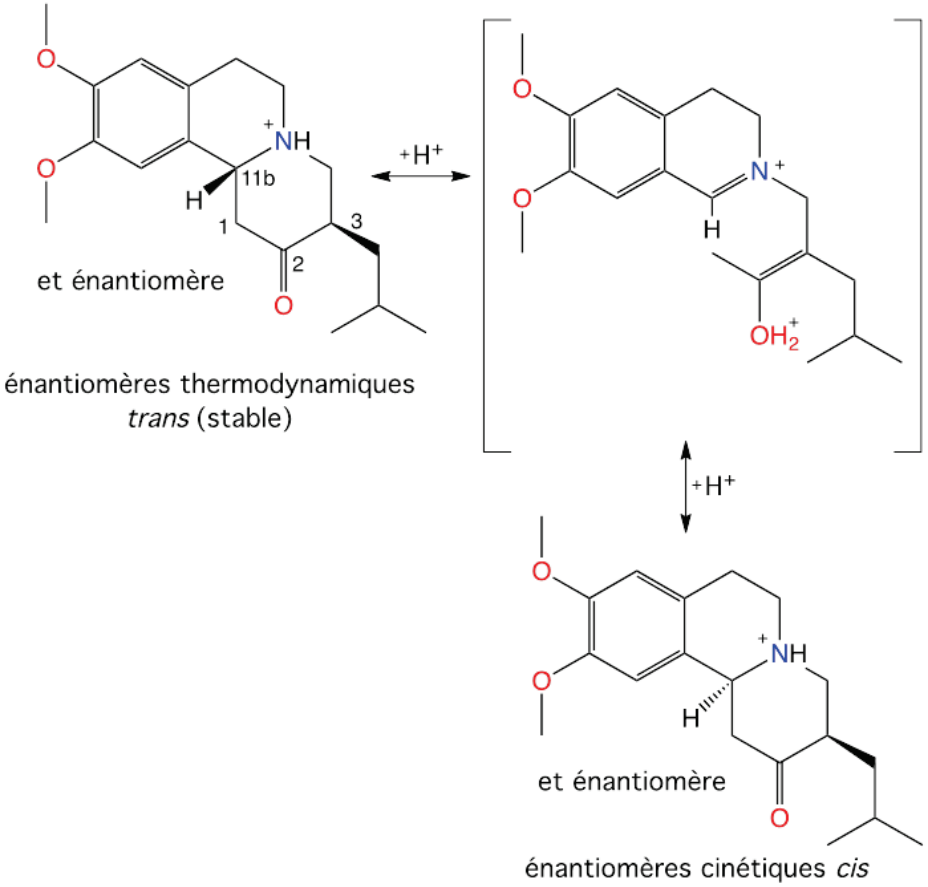


Figure 38 : Interprétation mécanistique de la formation de la cis-TBZ en milieu acide.

Afin de confirmer cette hypothèse, une étude RMN-^{1}H (B. Fenet, Centre Commun de RMN de Lyon 1) a été effectuée pour caractériser le comportement de la TBZ dans une solution d'acide citrique (1,5M) dans l'eau lourde. Le spectre obtenu a été comparé à celui de la TBZ solubilisée dans du DMSO dans lequel elle est stable (Figure 39). Le spectre de la TBZ solubilisée en milieu acide montre une variation importante des déplacements chimiques de certains protons de la TBZ, en particulier le H-11b identifié par une asterisque dans la Figure 39. En effet, le proton positionné en 11b de la *trans*-TBZ est déplacé de 3,2 ppm à 4,2 ppm en milieu acide car l'amine est protonée. De plus, l'apparition de pics correpondant au H-11b de la cis-TBZ et de la forme intermédiaire est observée entre 4,3 et 4,7 ppm. Plusieurs pics

apparaissent aussi entre 1,5 et 2ppm. Ces observations témoignent ainsi de la formation d'au moins deux composés supplémentaires dans cette solution aqueuse. L'analyse en RMN ^{1}H a mis en évidence une instabilité de la TBZ en milieu acide immédiate qui n'évolue pas pendant une nuit d'aquisition. Cela peut témoigner de la présence d'un équilibre entre la *trans*-TBZ et la *cis*-TBZ en milieu acide. Des spectres complémentaires ont été obtenus en TOCSY (B.Fenet, Centre Commun de RMN de Lyon 1) mais n'ont pas permis d'identifier avec certitude la nature des composés apparus en milieu acide.

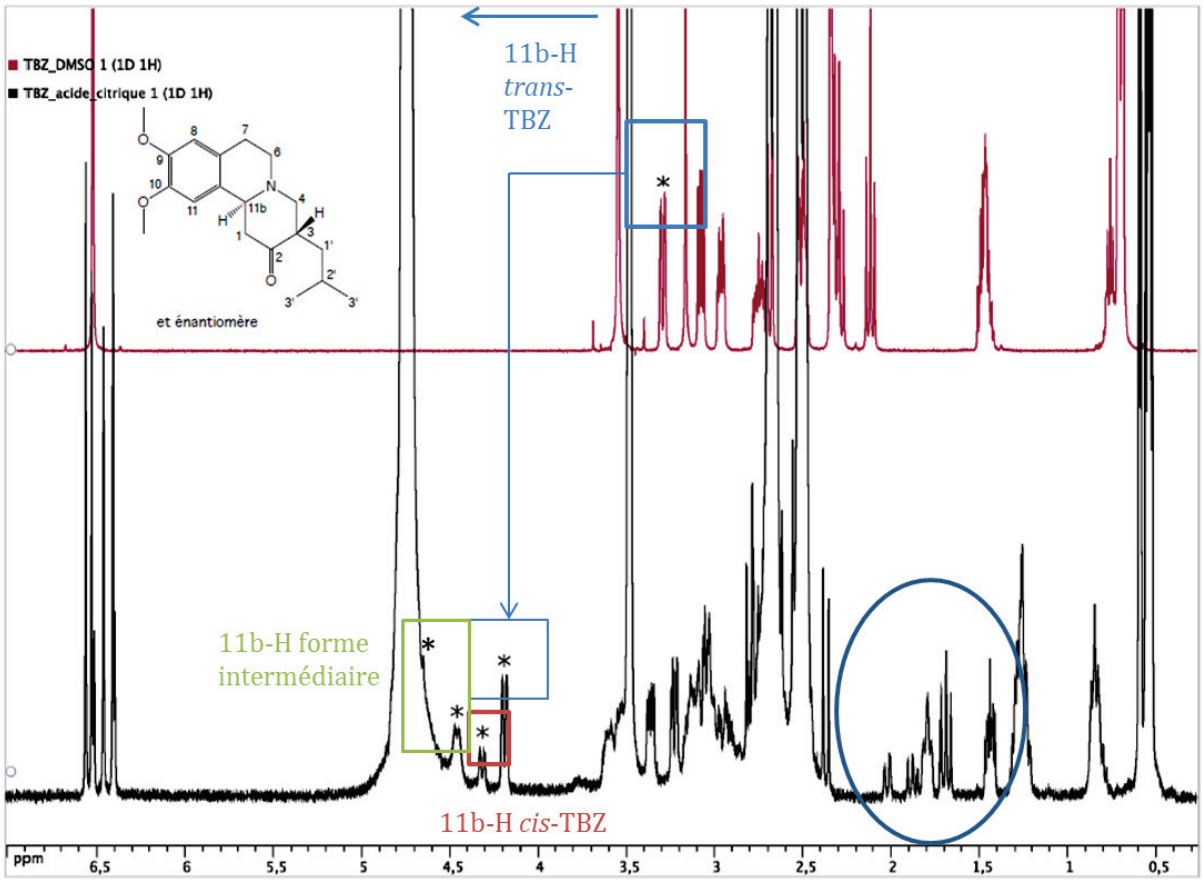


Figure 39 : Spectre RMN 1H de la TBZ dans le DMSO-d6 et dans D20+acide citrique (1,5M).

Le problème que pourrait poser la présence de la *cis*-TBZ dans les formulations serait la modification de la biodisponibilité de la TBZ. Or, le milieu gastrique est acide et il a été montré que la *cis*-TBZ se formait quelle que soit la nature du milieu acide. On peut alors supposer que lors de son administration par voie orale, la TBZ va subir l'interconversion décrite précédemment. De plus, puisqu'il s'agit d'un équilibre en milieu acide, on peut penser que les proportions en cis-TBZ ne seront pas différentes, que la TBZ soit administrée sous forme de sels ou de films orodispersibles.

2.3.3.2 *Caractérisation des produits de dégradations de la TBZ*

Dans un deuxième temps, la présence de DTBZ et TTBZ a été observée afin de déterminer l'émergence de ces produits de dégradation en fonction du temps. L'étude réalisée par Bourezg *et al.*, avait montré que la TBZ se dégradait par voie photolytique. Cette constatation était d'une part caractérisée par le jaunissement de la solution de TBZ exposée à une lumière intense et par l'apparition de deux composés dans les chromatogrammes pour un m/z=316,2 (DTBZ) et 314,2 (TTBZ). Les ODF ont été conservés à l'abri de la lumière à une température de 40°C et 75%HR mais un jaunissement a tout de même été observé en fonction du temps. Dans la Figure 40, les pourcentages en TTBZ et DTBZ dans les ODF en fonction du temps ont été répertoriés. Aucune tendance ne semble ressortir de ce suivi. En effet, à T=0, le pourcentage de TTBZ varie entre 0,3 et 1% et diminue en fonction du temps pour devenir nul à T=6 mois pour la TBZ extraite dans les films composés de PVP, PUL et HEC. Concernant le pourcentage de DTBZ, il ne suit pas non plus en tendance en fonction du temps hormis dans le cas du film constitué de PVP. Cependant, de façon global, la DTBZ est en quantité plus importante dans les films constitués d'HPMC (respectivement de 2,5% et 1,56 % au bout de 3 mois et 6 mois) et PVP (respectivement de 1,8% et 2,8% au bout de 3 mois et 6 mois) que dans le film de PUL où le pourcentage semble rester stable (0,4%) et d'HEC où la DTBZ n'est pas détectée ou vraiment à l'état de trace à T=3 mois (0,1%).

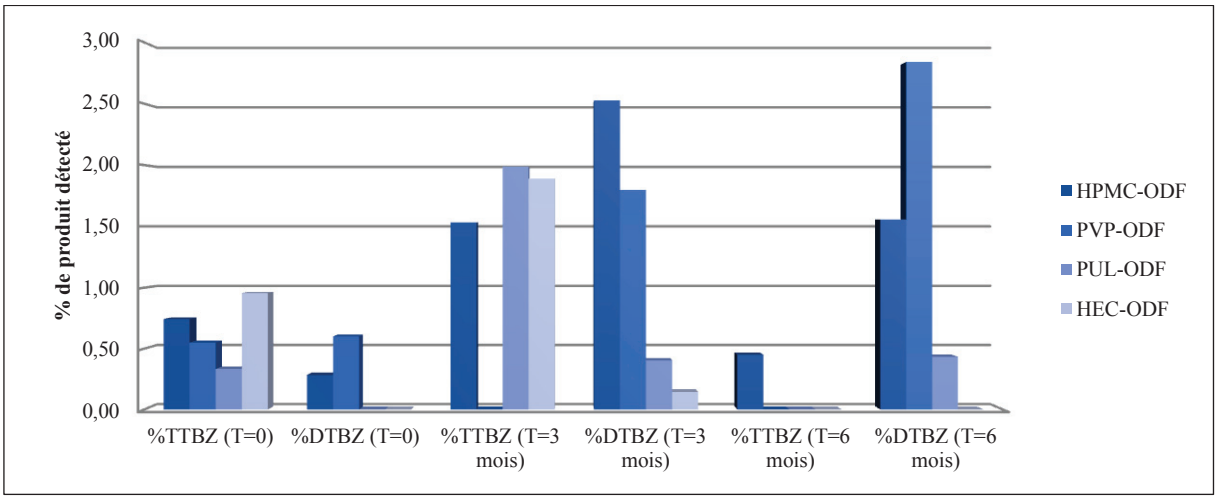


Figure 40 : Evolution des produits de dégradation de la TBZ durant 6 mois de conservation.

L'étude n'a pas permis de mettre en évidence une tendance quant à l'évolution des produits de dégradation dans les films orodispersibles au cours du temps. La conversion de la DTBZ en TBZ n'est pas possible, ainsi, l'évolution des produits de dégradation semble être due aux

limites expérimentales de la méthode. Cela peut être expliqué par une mauvaise extraction de la TBZ. Cependant, la présence de produits de dégradation est tout de même observée, et ce dès T=0 alors que dans la TBZ sous forme de poudre, ces produits ne sont pas présents. Il aurait été intéressant de placer la TBZ sous forme de poudre en stabilité durant 6 mois pour vérifier si aucun composé n'apparaissait dans le temps.

3 Dispersions solides amorphes sous forme de films orodispersibles

3.1 Résumé de l'étude

Dans le chapitre précédent, les ODF fabriqués pour l'administration pédiatrique de TBZ, ont permis d'augmenter la vitesse et le taux de libération du PA dans un milieu aqueux simulant le milieu salivaire (pH 6,8). Cette observation a pu être expliquée par la présence de la TBZ à l'état amorphe dans les ODF. Les systèmes constitués d'un support amorphe et d'un PA amorphe sont appelés dispersions solides amorphes (SD). Les SD amorphes sont connues pour améliorer considérablement la dissolution des PA très peu hydrosolubles (BCS type II), permettant ainsi de promouvoir leur biodisponibilité (Vasconcelos *et al.*, 2007; Leuner and Dressman, 2000; Serajuddin, 1999). Cependant, ces systèmes sont peu stables car ils se trouvent dans un état amorphe, métastable, qui tend à évoluer vers un état cristallin plus stable (Démuth *et al.*., 2015; Guo *et al.*, 2013). C'est ce qui a pu être observé lors de l'étude de stabilité avec la recristallisation de la TBZ dans les ODF à base de PVP et d'HEC. Cependant, la forme amorphe de la TBZ a été conservée dans le cas des HPMC-ODF et PUL-ODF. L'objectif de cette étude est donc de déterminer le rôle des 2 principaux composés (acide citrique et polymère) dans l'amélioration de la dissolution de la TBZ, ainsi que dans le maintien de l'état amorphe du PA lors de sa libération du film et au cours de sa conservation.

Ces ODF, peuvent être considérés comme des systèmes ternaires (TS) : PA-Acide citrique-Polymère. Dans cette étude, ils ont été comparés à la TBZ pure en poudre, à un mélange TBZ-Acide citrique (TBZ-CA), solubilisé dans de l'eau puis séché sous hotte, et à des systèmes binaires (BS) constitués de TBZ et polymère sous forme de films (sans acide citrique). Les résultats obtenus lors des études de libération de la TBZ à partir de ces différents systèmes ont montré que les BS ne permettaient pas (HPMC-BS et PUL-BS), ou peu (PVP-BS et HEC-BS), d'améliorer la dissolution de la TBZ. Cela est dû au fait que la simple incorporation de la TBZ dans le gel de polymère n'a pas permis de la rendre amorphe. On observe ainsi la présence de cristaux dans les films en DSC, DRX et microscopie polarisante. Concernant le mélange TBZ-CA, un pic de dissolution dès 1 minute a été observé (80% de TBZ libérée), suivie d'une chute du taux de dissolution jusqu'à atteindre, après 120 minutes, le même pourcentage de TBZ dissoute qu'avec le contrôle de TBZ pure en poudre (40%). Ce profil de dissolution est typique des formes amorphes avec, dans un premier temps, une libération rapide du PA du fait que la barrière énergétique soit facile à franchir. Ensuite, l'état dissous n'étant pas maintenu, le PA précipite pour retourner sous sa forme cristalline, plus stable.

Dans les TS, on a pu observer un profil de dissolution type des SD, appelé « Spring and Parachute », avec :

- ✓ Une augmentation importante du taux de dissolution de la TBZ (~85%) : L'état amorphe du PA, obtenu suite à sa solubilisation dans l'eau acidifiée, permet de produire une solution sursaturée dans le milieu de dissolution (Lu and Zografi, 1998 ; Tran *et al.*, 2010).
- ✓ Un maintien du taux de libération durant au moins 2h : L'état amorphe est stabilisé dans le milieu de dissolution grâce à la structure tridimensionnelle des chaînes polymériques qui permettent de prévenir la dévitrification de cet état (Demuth *et al.*., 2015 ; Baghel *et al.*, 2016).

Après 6 mois de conservation, 3 comportements ont été observés :

1. HPMC-TS a montré un profil de libération similaire au profil initial (T=0). De plus, aucun cristal n'a été mis en évidence en DRX et DSC. Le système HPMC-TS est donc stable dans le temps.
2. Pour PUL-TS, après avoir atteint le taux de libération initial, il est apparu une chute progressive de la quantité de TBZ dans le milieu de dissolution atteignant 55% au bout de 2h. Les analyses DRX et DSC n'ont pas révélé la présence de cristaux dans le système.
3. PVP-TS et HEC-TS ont montré une diminution du taux de libération par rapport à T=0. De plus, des cristaux de TBZ ont été mis en évidence par DSC et DRX.

La stabilité des SD peut être influencée par deux principaux facteurs : **la miscibilité** entre les constituants et leur **capacité à former des liaisons hydrogène**.

La miscibilité est la capacité de divers constituants à se mélanger. Elle a été déterminée, de façon théorique, en calculant les paramètres de solubilité par les méthodes de Fedors et Van Krevelen. Les résultats ont montré que la TBZ était miscible avec l'HPMC et la PVP, partiellement miscible (Fedors) ou immiscible (Van Krevelen) avec l'HEC, et immiscible avec l'acide citrique et le PUL. Expérimentalement, la miscibilité de deux composants peut être étudiée par la détermination du nombre de température de transition vitreuse (Tg) présente dans le système et l'observation de l'abaissement du point de fusion du PA. Ainsi, lorsque le système est caractérisé par une seule Tg, cela indique la présence d'une seule phase homogène traduisant une bonne miscibilité des constituants. A l'inverse, plusieurs Tg

reflètent la présence de phases non-miscibles entre elles. Dans notre étude, les TS à base d'HPMC, PVP et HEC ont été caractérisés par une seule Tg démontrant l'homogénéité de ces systèmes. Tandis que pour PUL-TS et la mixture TBZ-CA, la présence de deux Tg a été constatée témoignant d'une séparation de phase entre les constituants. De plus, le polymère possède une Tg importante et par vitrification peut induire une augmentation de la Tg du système. Cet effet peut avoir une influence sur la stabilité des SD. Dans HEC-TS, la Tg est très basse (Tg= -26,4°C) et équivalente à la Tg du mélange TBZ-CA, ainsi, l'HEC n'a pas d'effet vitrifiant sur le système (Yoo *et al.*, 2009). La caractérisation de l'abaissement du point de fusion a été réalisée sur les mélanges physiques suivants : TBZ/CA, TBZ/Polymères et TBZ/CA/Polymères à différents ratios. Si les constituants n'étaient pas miscibles, aucun abaissement du point de fusion ne serait observé car il n'y aurait pas de changement dans le potentiel chimique lors de la fusion (Prasad *et al.*, 2014). Dans notre cas, l'abaissement du point de fusion a été observé pour tous les systèmes. Cela ne permet pas de conclure sur une miscibilité entre les constituants mais plutôt sur la présence d'interactions moléculaires dans le système (Marsac *et al.*, 2006).

La capacité du polymère à former des liaisons hydrogènes avec le PA permet de diminuer sa mobilité moléculaire, et par conséquent, augmenter la stabilité de la SD formée. La TBZ dispose de 4 sites récepteurs d'hydrogènes. Ainsi, la capacité à former des liaisons hydrogène avec la TBZ dépendra du nombre de sites donneurs d'hydrogène du polymère. L'HPMC, l'HEC et le PUL disposent respectivement de 1, 3 et 3 sites donneurs d'hydrogène, tandis que la PVP n'en a pas. Cela peut expliquer la recristallisation rapide de la TBZ dans le film de PVP (< 1 mois). En spectroscopie infra-rouge, le décalage de la bande caractéristique du groupement carbonyle de la TBZ vers des longueurs d'ondes plus élevées, a été observé dans les BS à base d'HPMC, PUL et HEC. Cette observation est caractéristique de la formation de liaisons hydrogène. Dans PVP-BS, aucun décalage des bandes de la TBZ n'a été constaté confirmant l'absence d'interactions moléculaires de type liaison hydrogène.

Pour conclure, les paramètres relatifs à la miscibilité des constituants et à leur capacité à former des liaisons hydrogène sont présentés dans le Tableau 21. Au vu de ces résultats, on peut dire que la présence d'interactions de type liaisons hydrogène est nécessaire pour maintenir l'état amorphe de la TBZ dans les SD. L'effet vitrifiant du polymère sur le système semble aussi être est un facteur important dans la stabilisation des SD amorphes. Dans notre étude, la non-miscibilité entre le PUL et la TBZ n'a pas induit de recristallisation de la TBZ lors du stockage. Cependant, la TBZ précipite dans le milieu de dissolution reflétant une

mauvaise cohésion du système. Enfin, l'HPMC-TS regroupe tous les facteurs assurant la bonne stabilité des SD amorphes. Cela est en accord avec les résultats expérimentaux qui montrent qu'après 6 mois de conservation, les propriétés initiales du système n'ont pas évolué. Ainsi, en étudiant la miscibilité, la capacité à former des liaisons hydrogène et l'effet vitrifiant, on peut prédire la stabilité des SD.

Tableau 21 : Facteurs physicochimiques influençant la stabilité des SD.

Polymère – Etat physique de la TBZ à T= 6mois	**Miscibilité théorique avec la TBZ**	**Abaissement de la température de fusion de la TBZ**	**Nombre de phase (nombre de Tg) du système**	**Effet vitrifiant sur le système**	**Capacité théorique à former des liaisons hydrogènes avec la TBZ**	**Liaisons hydrogènes (Det. avec FT-IR)**
HPMC - **Amorphe**	Oui	Oui	1	Oui	Oui	Oui
PVP – **Cristallin**	Oui	Oui	1	Oui	Non	Non
PUL – **Amorphe**	Non	Oui	2	Oui	Oui	Oui
HEC – **Cristallin**	Partiel	Oui	1	Non	Oui	Oui

3.2 Publication

Article publié dans International Journal of Pharmaceutics :

Senta-Loÿs, Z., Bourgeois, S., Valour, J.P., Briançon; S., Fessi, H., 2017. Orodispersible films based on amorphous solid dispersions of Tetrabenazine. *International Journal of Pharmaceutics.* 518, no. 1–2 : 242–52. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.12.036.

AMORPHOUS SOLID DISPERSIONS SYSTEM AS ORODISPERSIBLE FILMS FOR ORAL DELIVERY OF TETRABENAZINE

Zoé SENTA-LOYS[a], Sandrine BOURGEOIS* [a, b], Jean-Pierre VALOUR [a], Stéphanie BRIANÇON [a, b], Hatem FESSI [a, b]

[a] Université de Lyon, Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), UMR CNRS 5007, F-69622, Villeurbanne, France
[b] Université de Lyon, Université Lyon 1, ISPB-Faculté de Pharmacie, F-69008, Lyon, France
*corresponding author

ABSTRACT

In this work, the formation and stability of amorphous solid dispersions (SDs) as orodispersible films (ODF) were investigated using Tetrabenazine (TBZ) as a poor water soluble drug. The influence of polymer nature and pH-modifier incorporation to form and maintain SDs was investigated.

TBZ-loaded ODF were formulated using 4 different polymers (HPMC, PVP, Pullulan, and HEC). Binary systems (BS) were obtained mixing the drug with different polymers, while ternary (TS) systems were also obtained using citric acid solution to solubilize TBZ. Drug dissolution studies, thermal analysis and X-ray diffraction were carried out to characterize the physical state of API in ODF.

ODF made of TS allowed a major improvement of TBZ dissolution profile in buccal conditions compared to a pure drug or BS. DSC and X-ray diffraction revealed that API was in amorphous state in TS while remained crystalline in BS. Following 6 months of storage, TBZ recrystallization occurred for PVP-TS and HEC-TS which induced a decrease of drug release in saliva conditions. HPMC and PUL TS maintained API in amorphous state during 6 months. Briefly, amorphous SDs were obtained by the pre-dissolution of the drug in acidified water and dispersion in polymeric matrices. The miscibility and potential interaction between TBZ and polymers have been identified as important factor to explain stability differences.

Key words: Amorphous solid dispersion, Orodispersible film, Tetrabenazine, Citric acid, HPMC, PVP

1. INTRODUCTION

Oral dosage forms are the most commonly used drug delivery systems intended for systemic effect resulting from gastro-intestinal absorption of drugs. Among different strategies to improve the bioavailability of orally administered drugs, solid dispersions (SDs) have been developed (Vasconcelos *et al.*, 2007; Leuner and Dressman, 2000; Serajuddin, 1999). They can be defined as dispersion of one or more active in an inert carrier or matrix which can be encountered in amorphous or crystalline state (Chiou and Riegelman, 1971). The main advantage of SDs compared to the conventional oral forms is related with the enhancement of drug release from the system. This effect can be obtained by i) reducing the size of the API, ii) improving the wettability of the drug iii) promoting the porosity of the SDs and iv) including an API in an amorphous state (Craig, 2002). So far, this promising strategy has been established only for few actives due to the complexity of the manufacturing steps and the instability of the SDs during storage conditions (Démuth *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2013).

Within this context, a particular SDs form namely Orodispersible films (ODF) have been developed to improve the dissolution rate of the API which can be in the amorphous state, while controlling the stability problems choosing appropriate polymeric supports. Comparing with conventional oral dosage forms, ODF offer several advantages as: no water need for administration, enhancement of patient compliance, possibility of local action, dose accuracy compared to syrup and control of manufacturing processes (Bala *et al.*, 2013). Moreover, as they are easy to swallow, ODF have gained acceptance in case of pediatrics patients (Preis *et al.*, 2012).

In a previous study, we already describe the design and development of ODF for drug delivery using tetrabenazine as a model drug (Senta-Loys *et al.*, 2016). Firstly, the drug was solubilized in slightly acid condition used citric acid, and then, 4 different ODF made of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC E15), polyvinylpyrrolidone (PVP K90), pullulan (PUL) and hydroxyethylcellulose (HEC) have been obtained. In all cases, in salivary medium TBZ delivery from ODF was dramatically improved. In addition, the lack of crystals in polarizing microscopy and no melting TBZ peak following DSC analysis, suggested that the API was in an amorphous state. Following 6 month of storage, TBZ recrystallize when formulated in ODF made of PVP K90 and HEC.

The main goal of this work has been to characterize the amorphous solid dispersion of ODF exploring the influence of citric acid and different hydrophilic polymers (HPMC E15, PVP K90, PUL and HEC) in the enhancement of TBZ delivery.

Two types of systems have been obtained. A binary system (BS) made of TBZ dispersed in water and polymer and a ternary system (TS) made of TBZ dissolved in citric acid solution and polymer. For all the systems HPMC E15, PVP K90, PUL and HEC polymer have been tested. Dissolution studies, DSC, X-ray diffraction and SEM were performed on BS and TS to analyze the influence of polymer and citric acid solution on TBZ physical state. Then, the influence of the different polymers on the TBZ stability was evaluated for TS.

TBZ, a poor water soluble compound, is characterized by low-wettability and high sensitivity to light, heat and moisture. TBZ is a monoamine-depleting agent approved for the treatment of neuroses and psychoses like schizophrenia. Moreover, TBZ is currently approved in several countries for a wide range of hyperkinetic movement disorders like Huntington disease (Chen and Swope, 2012). In pediatric population TBZ is also indicated for hyperkinetic movement (Jain *et al.*, 2006), and adult TBZ tablets were administered due to the absence of pediatric forms. The incorporation of TBZ in ODF formulation would simplify drug administration for children while improving dissolution of API.

Globally, the work here presented is aimed at studying the parameters, pH and polymer nature, which influenced the physical state and stability of TBZ when incorporated in the ODF formulations.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Four types of hydrophilic polymer were used for ODF formulation: Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) Vivapharm® E15 from JRS Pharma, Hydroxyethylcellulose (HEC) Natrosol® 250 L and Povidone K90 (PVP K90) from Ashland and Pullulan (PUL) (Hayashibara Company, Japan). Citric acid (CA), glycerol and sorbitol, respectively used as a pH-modifier, plasticizer and disintegrant agent were purchased from Cooper (France).

2.2. Methods

2.2.1. ODF preparation

ODF were obtained by the casting/evaporation method. Firstly, the film-forming polymer and other excipients were dispersed under magnetic stirring to obtain a gel (Morales *et al.*, 2011). Then, TBZ was incorporated in gel in two ways: i) pure TBZ was directly dispersed into the gel to obtain binary system (BS) TBZ-Polymer; ii) TBZ was firstly dissolved in purified water

with citric acid (1.5 mole equivalent) and introduced in the polymeric gel to form a ternary system (TS) TBZ-CA-Polymer. The second step consisted of gel casting on a smooth surface (Petri dishes). Finally, the gel was dried to form a film (under extractor hood at 20°C). After drying, the film was removed from the holder and cut to obtain a surface area of 4 cm^2. The composition of the films is given in Table 1.

Table 1: Different formulation of ODF studied (amount was expressed as a percentage of solid weight in films).

	Polymer matrix (%)	TBZ (%)	Citric acid (%)	Glycerol (%)	Sorbitol (%)
HPMC-BS	58.8	17.7	-	14.1	9.4
PVP-BS	64.9	19.5	-		15.6
PUL-BS	64.9	19.5	-	14.1	15.6
HEC-BS	68.5	20.5	-	-	11
HPMC-TS	50	15	15	12	8
PVP-TS	54.35	16.3	16.3	13.05	-
PUL-TS	54.35	16.3	16.3	13.05	-
HEC-TS	56.8	17.05	17.05	-	9.1

2.2.2. Dissolution studies

Drug release studies were performed in simulated salivary medium at pH 6.8 in order to follow the TBZ dissolution in mouth. Simulated saliva was prepared using KH_2PO_4 (12 mM), NaCl (40 mM), $CaCl_2$ (1.5 mM) and pH was adjusted to 6.8 using NaOH (Gittings *et al.*, 2014). In vitro drug release studies were performed on pure TBZ, TBZ-CA mixture and ODF (BS and TS). Concerning pure TBZ, TBZ-CA mixture, and TS (ODF surface area = 4cm^2) an amount corresponding to 12.5 mg of drug was introduced in 150 mL of simulated salivary medium at 37°C under magnetic stirring at 200 rpm. For BS, all the ODF (20cm^2; ~60mg of TBZ) was introduced in 600 mL of simulated salivary medium, due to the lack of homogeneity of TBZ in BS. Samples of 1 mL were withdrawn every 30 seconds during 5 minutes and at 15, 30, 60 and 120 minutes and substituted by 1 mL of dissolution medium (Sayed *et al.*, 2013). Samples were filtered through a 0.45 µm cellulose acetate membrane (Millipore®) and the TBZ concentration was measured by UV spectroscopy (UV-1601, UV Visible spectrometer, Shimadzu) at 232 nm. Dissolution experiment was reproduced in triplicate for each formulation to determine release profile and cumulative percentage.

In addition, statistical analyses were conducted using the R software (The R foundation) with a threshold of 5% corresponding to the alpha risk. A non-parametric Kruskal-Wallis test was

used. To determine significant differences ($p<0.05$) between two parameters, a multiple comparison post hoc test (kruskalmc) was conducted. Statistical analyses were investigated on dissolution results between pure drug and each type of BS and TS. In addition, tests were performed on the drug release profile for each TS formulation during their storage (at 1, 3 and 6 months).

2.2.3. X-Ray diffraction analyses

X-Ray study was carried out to determine crystalline characteristics of TBZ under the pure form, in binary systems and in ternary systems. It was performed with a Brucker D8-Advance (D8-A25) apparatus with a Ni filter, a voltage of 40kV and a 40mA current. Samples were scanned at a rate of 0.02 over a 2Theta for a range of 5-50°.

2.2.4. DSC analyses

In order to characterize TBZ physical state in binary and ternary systems, Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) was performed by DSC Q200 (TA instruments), equipped with a refrigerated cooling accessory (RCS90) and a data analyzer (Universal Analysis 2000, TA instruments). The equipment was calibrated with Indium. Inert atmosphere was maintained by nitrogen at a flow rate of 20 mL/min. An empty aluminum pan was used as reference.

Determination of API state

Samples (pure TBZ, binary and ternary systems) were modulated at 0.2°C every 60 sec with heating rate of 2°C/min. TBZ and ODF (9-11 mg) were placed in hermetically sealed aluminum pans and heated from 10 to 170°C to characterize the physical state of API in ODF.

Melting point depression studies

Melting point depression was determined with TBZ-Polymer and TBZ-CA physical mixtures at several ratios. Ideally, heat-cool-heat cycles should be used to determine the melting point depression but in the third heat cycle of DSC, no melting endotherm was observed. Therefore, melting point depression was measured in the first heat cycle with 2°C/min.

Determination of glass transition temperature

Glass transition temperature (Tg) of TBZ and citric acid were determined by heat-cool-heat cycles with a first heating rate of 20°C/min from 20 to 140°C, then a cooling rate of 20°C/min from 140 to -80°C was applied and modulation at 0.2°C every 60 sec was started with heating

rate of 2°C/min until 140°C. To determine Tg of TBZ-CA mixture and ternary systems, MDSC was used with a modulation at 0.2°C every 60 sec with heating rate of 2°C/min from -80 to 140°C.

2.2.5. Scanning electron microscopy (SEM) observation

TBZ powder and the ODF surface of BS and TS were analyzed by scanning electron microscopy (Zeiss Merlin Compact, France) at the "Centre Technologique des Microstructures" (CTμ) of the University of Lyon (Villeurbanne, France). Samples were directly fixed on a metal stub using a double sided adhesive tape and coated under vacuum by cathodic sputtering with platinum. The samples were observed by SEM an accelerating voltage of 15 kV.

2.2.6. Stability studies of TBZ-TS flowing 6 months of storage

Ternary systems were stored in sealed aluminum strip and stability was investigated at 40°C; 75% HR (accelerated storage conditions ICH Q1-R2) during 6 months. Film samples of TS were withdrawn at 1, 3 and 6 months. Dissolution profiles, X-ray diffraction and SEM were used to characterize evolution of TS properties during time. Statistical analyses were performed on drug dissolution results as mentioned previously.

2.2.7. Interaction and miscibility studies

FT-IR spectroscopy

Attenuated total reflection (ATR) FT-IR (IRPrestige-21, SHIMADZU) was used to highlight interaction between TBZ and excipients. Measurements were performed on each initial compound and on each formulation of ODF. Samples were placed on a crystal, pressed and spectra were recorded. Background was obtained using a freshly cleaned crystal. Analyses were conducted in frequency range between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1}. Each analysis was carried out in triplicate.

Solubility parameters

The square root of cohesive energy density was defined by the Hildebrand solubility parameter. In this study, Fedors (Fedors, 1974) and Van Krevelen (Van Krevelen, 1990; Garrigues, 2010) group contribution methods were chosen for the calculation. Calculation of solubility parameters was performed for each compounds and the difference of the value of each pair was calculated to determine the affinity between additive and polymer.

Melting point depression

Drug-polymer mixing thermodynamic was investigated by measurements of melting point depression. Indeed, if the drug and polymer were immiscible, no melting drug depression will be observed because no change in the chemical potential of the melting occurred. The method used to determine melting point depression was described in a previous section (2.5 DSC).

3. RESULTS

3.1. Characterization of binary and ternary systems

Characterization of API state in binary systems (without CA) and ternary systems (with CA) were investigated to highlight formation of amorphous solid dispersions.

3.1.1. Dissolution studies

Dissolution profiles of pure TBZ, TBZ-CA mixture, binary and ternary systems were shown in Figure 1.

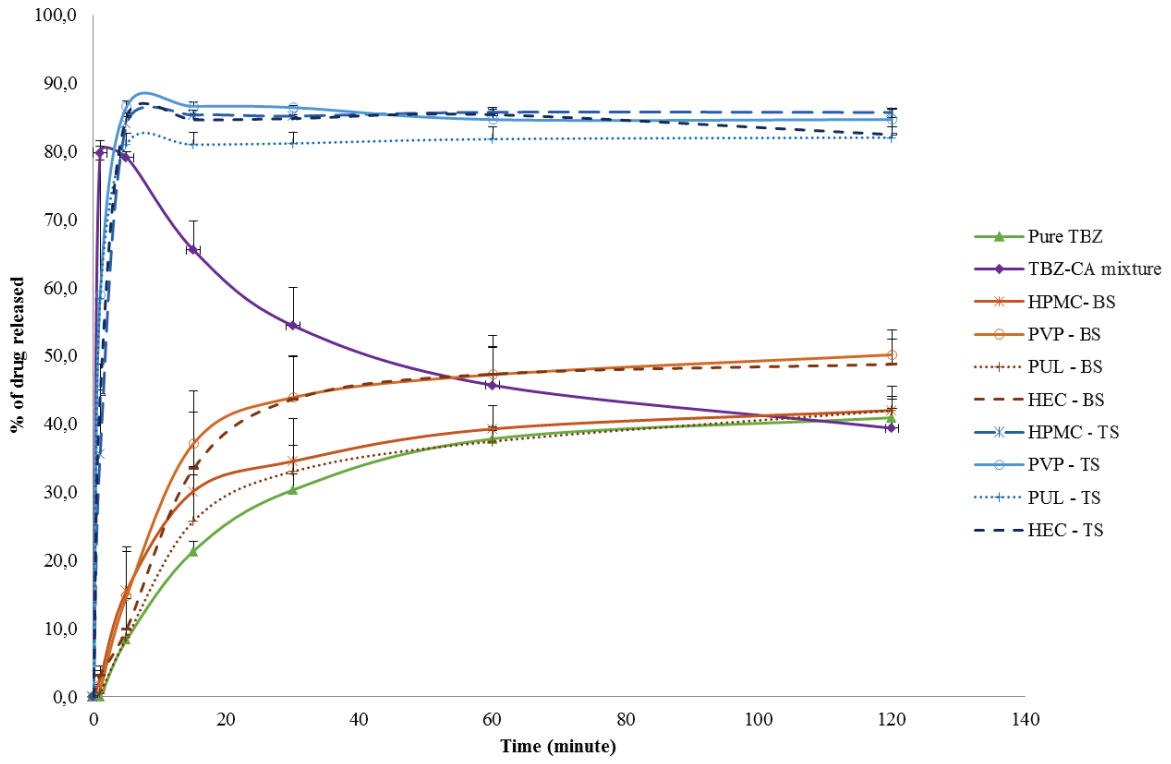


Figure 1: Drug release profile of pure TBZ, TBZ-CA mixture, TBZ-loaded in ODF without (BS) and with CA (TS) in simulated salivary medium (pH 6.8).

Pure TBZ had a slow dissolution profile with approximately 40% of drug released after 2 hours. Concerning TBZ-CA mixture, maximum of TBZ dissolution was obtained immediately

(80±1% of drug released after 1 minute). However, reduction of TBZ concentration was observed after 15 minutes due to the precipitation of TBZ in the dissolution medium. The percentage of drug release retrieved in the medium after 2 h was closed to pure drug samples. In the case of TBZ-CA mixture, the supersaturation of TBZ in simulated salivary medium was not maintained during time. While HPMC-BS showed a faster drug release ($p<0.05$ until 15 min), no significant improvement of API solubility was observed for TBZ loaded in HPMC-BS and Pullulan-BS ($p>0.05$) compared to pure TBZ. However, drug release profile of TBZ loaded in PVP-BS and HEC-BS showed a faster dissolution than pure TBZ, with an enhancement of around 10%, these differences remained significant throughout the dissolution test ($p<0.05$). In the same conditions, the dissolution of TBZ in ternary systems was widely improved since approximately 85% of the total amount of TBZ was released during the first 5 minutes, regardless of formulations. Significant differences ($p<0.05$) were observed between dissolution profile of pure TBZ and each type of TS, at any point. In addition, conversely to TBZ-CA mixture, during dissolution studies of TBZ-ODF (BS or TS) any TBZ precipitation was observed.

3.1.2. X-ray diffraction analyses

The PXRD (X-Ray diffraction pattern) of pure TBZ, citric acid, binary and ternary systems were given in Figure 2.

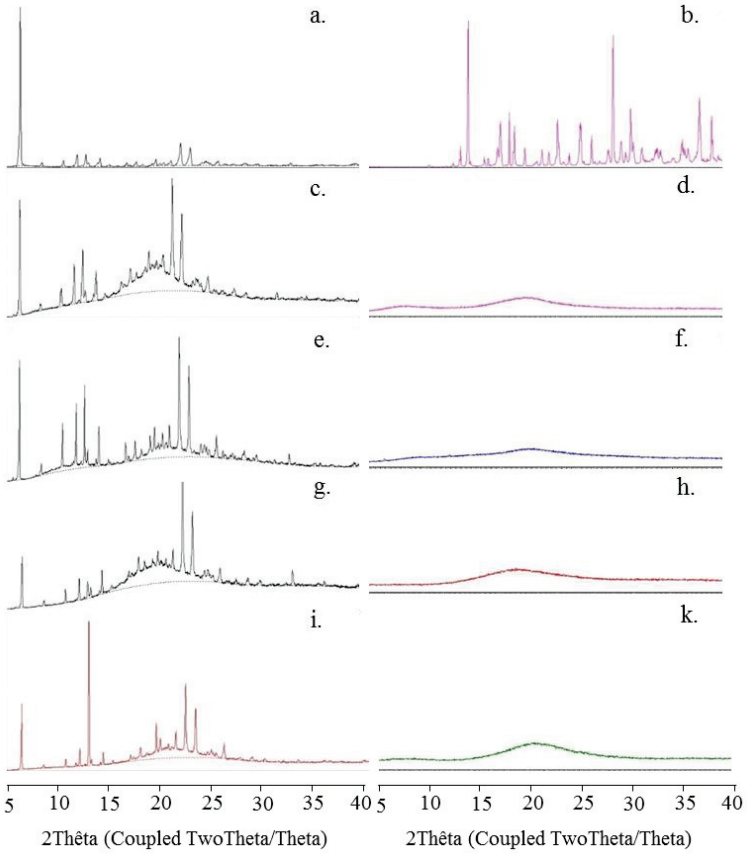


Figure 2: PXRD pattern of pure TBZ (a), Citric acid (b), HPMC-BS (c), HPMC- TS (d), PVP–BS (e), PVP-TS (f), PUL-BS (g), PUL-TS (h), HEC-BS (i) and HEC-TS (k).

Diffractograms of pure TBZ showed a sharp characteristic diffraction peak at 6.4° and two smaller peaks at 22.3° and 23.1° (Figure 2a). The PXRD pattern of CA had two sharp characteristic diffraction peaks at 15° and 29.4° (Figure 2b). Diffractograms of TBZ loaded in binary systems were characteristic of semi-crystalline materials (Figures 2c, 2e, 2g and 2i). Indeed, we can observe a halo pattern without diffraction peak corresponding to the amorphous polymer carrier with characteristic diffraction peaks of crystalline TBZ. Concerning ternary systems, no TBZ crystalline peaks were observed (Figures 2d, 2f, 2h and 2k), indicating that TBZ and CA were in amorphous state.

3.1.3. DSC analyses

The DSC thermograms of pure TBZ, TBZ-CA mixture, binary and ternary systems were shown in Figure 3.

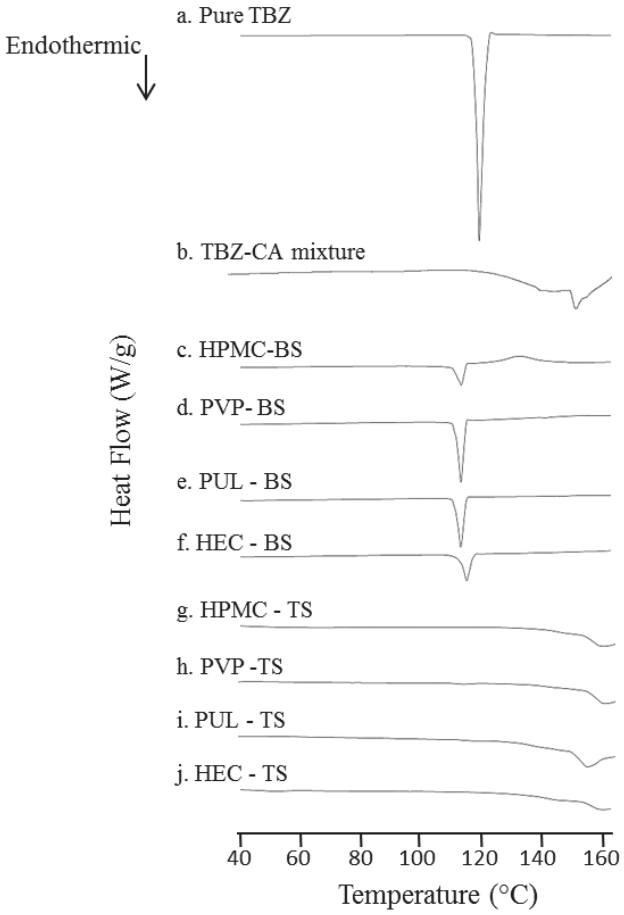


Figure 3: DSC thermograms of pure TBZ (a), TBZ-CA mixture (b), TBZ loaded in ODF without and with CA: HPMC-BS (c), PVP-BS (d), PUL-BS (e), HEC-BS (f), HPMC-TS (g), PVP-TS (h), PUL-TS (i), HEC-TS (j).

Sharp melting peak of API can be observed at 129°C (Figure 3a). Thermograms of binary systems showed a distinct shift peak of TBZ towards lower temperatures, at 122°C, 123°C, 122°C and 124°C for HPMC-BS (Figure 3c), PVP-BS (Figure 3d), PUL-BS (Figure 3e) and HEC-BS (Figure 3f) respectively. A slight exothermic peak corresponding to a reticulation was observed for the formulation with HPMC. In TBZ-CA mixture, no melting drug peak was observed (Figure 3b). As observed on Figures 3g, 3h, 3i and 3j, no melting drug peak was retrieved in thermograms of the ternary systems.

3.1.4. SEM observation

The results of SEM in Figure 4 illustrate the morphology of pure TBZ powder and ODF under the form of HPMC-BS, PVP-BS, HPMC-TS and PVP-TS. Pictures showed presence of large crystals of TBZ in binary systems while only small particles are observed on the surface of ternary systems.

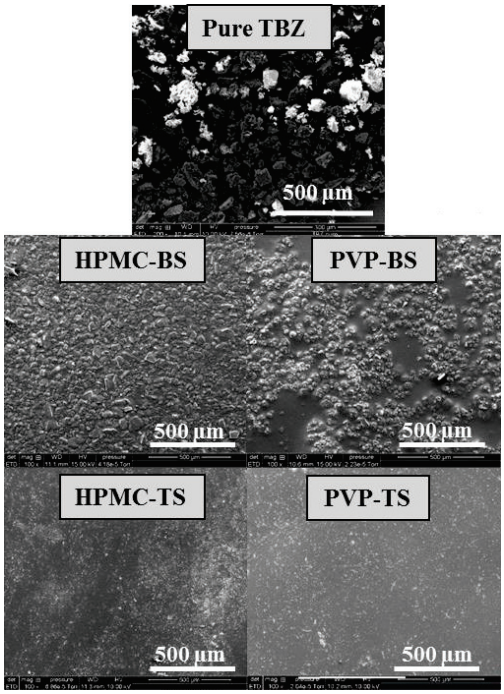


Figure 4: SEM images of pure TBZ, HPMC-BS, PVP-BS, HPMC-TS and PVP-TS.

3.2. Stability studies of TBZ-TS flowing 6 months of storage

To investigate the evolution of the API solid state in ternary systems, dissolution studies, X-Ray analyses and SEM were performed after 6 months of storage of each TS formulation at 40°C, 75% HR.

3.2.1. Dissolution studies

Results of dissolution studies performed on TS after 6 months of storage are shown in Figure 5. After 6 months, dissolution behavior for HPMC-TS remained similar. For PVP-TS a decrease of 15% of the TBZ released was observed with significant differences from 30 min ($p<0.05$). Moreover, a loss of around 25% of TBZ released was also noted for HEC-TS with significant differences at any point ($p<0.05$) (Figure 5). For PUL-TS, the same initial amount of drug released was recovered (80% at 20 min) but a sharp decrease was observed after 30 minutes, probably due to a drug recrystallization in the medium. After 2h only 60% of TBZ remained dissolved.

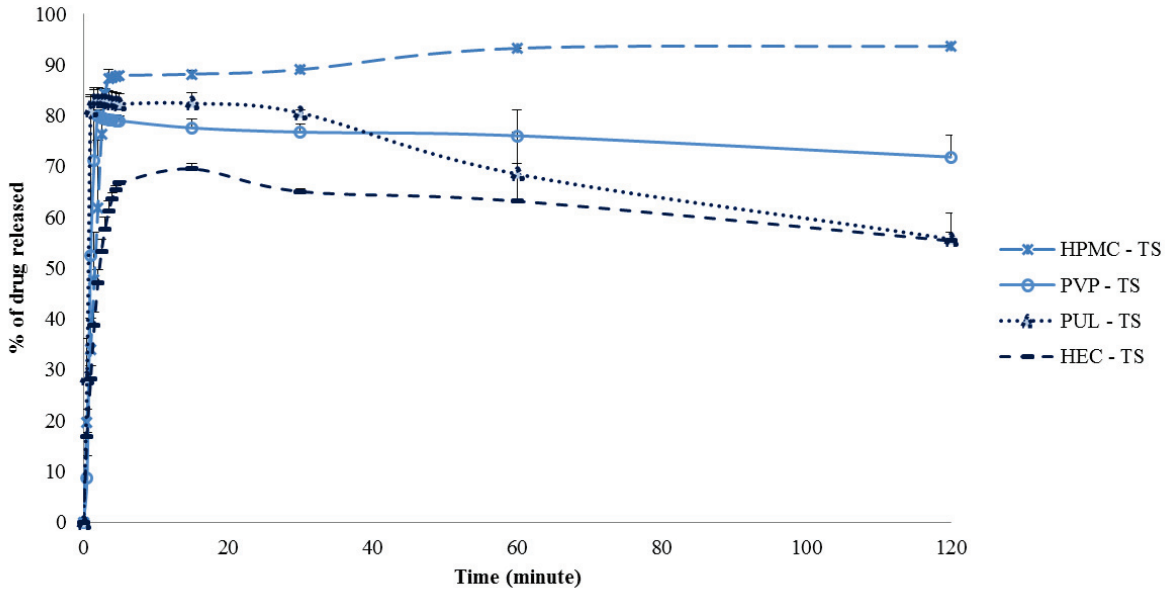


Figure 5: Drug release profile of TBZ in ternary systems after 6 months.

3.2.2. X-Ray diffraction analyses

PXRD pattern of TS during 6 months of storage were shown in Figure 6. For HPMC-TS and PUL-TS, no characteristic diffraction peaks of TBZ were observed during 6 months (Figures 6a, 6b, 6e and 6f). However, for PVP-TS and HEC-TS, the characteristic diffraction peaks of TBZ appeared after 3 months corresponding to the drug crystallization.

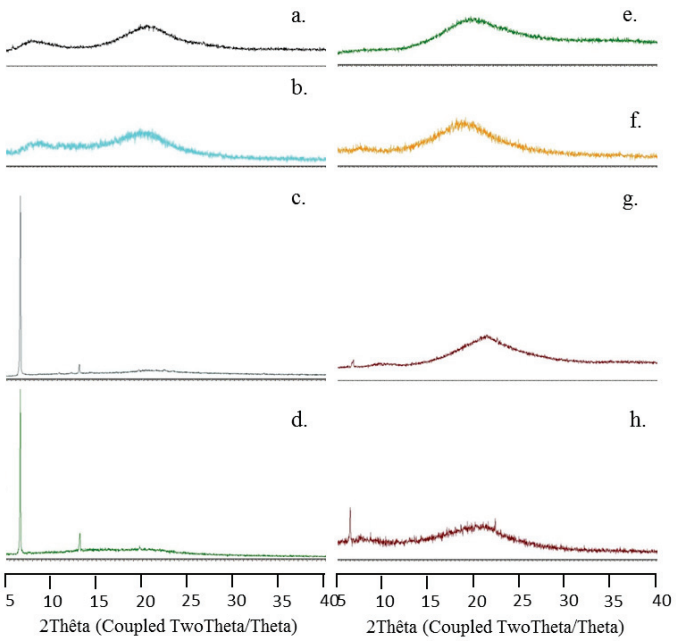


Figure 6: PXRD patterns of HPMC – TS at T=3months (a) and 6months (b); PVP – TS at T=3months(c) and 6months (d); PUL – TS at T=3months (e) and T=6months (f); HEC – TS at T=3months (g) and T=6months (h).

3.2.3. SEM observation

The results of SEM illustrating the morphology of pure TBZ and ODF-TS surface are shown in Figure 7. At T=0, pictures showed presence of small particles on the ODF surfaces. After 6 months, no change was noticed on the HPMC and PUL-TS surfaces, whereas for PVP and HEC-TS surfaces modifications were observed with TBZ crystals apparition in HEC-TS. For PVP-TS the entire matrix seems to have changed.

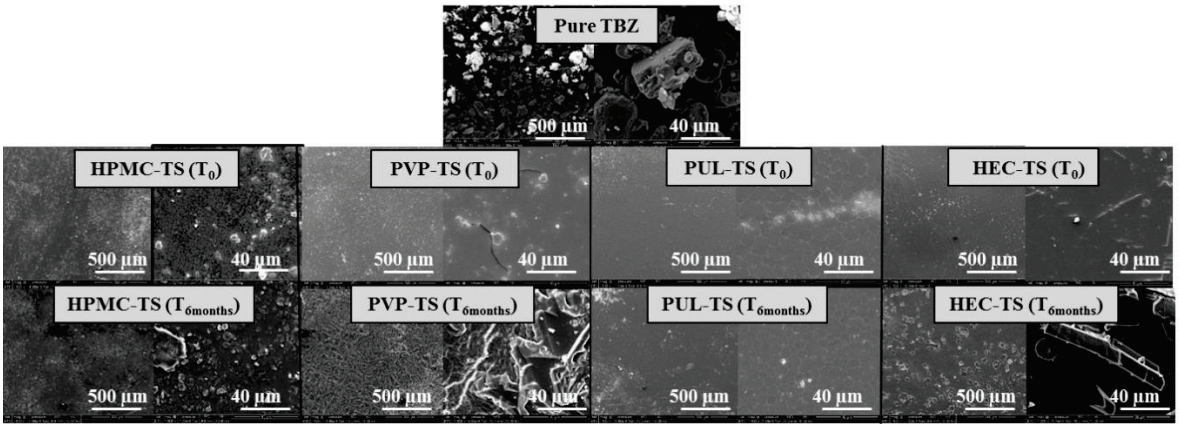


Figure 7: SEM images of pure TBZ and amorphous ternary systems at T=0 and T=6 months.

3.3. Study of miscibility and interaction in ternary systems

Miscibility (solubility parameters, melting drug depression and Tg) and molecular interaction (FT-IR) were characterized to understand feasibility and stability of solid dispersions in ODF.

3.3.1. Solubility parameters

The value of TBZ solubility parameter was δ= 20.83 $MPa^{0.5}$ (Fedors method) and δ= 18.26 $MPa^{0.5}$ with Van Krevelen method. Solubility parameters (δ) of the different carriers (citric acid or polymers) were shown in Table 2, and the differences of δ (Δδ) between carrier and API were determined to assess the miscibility.

Table 2: Solubility parameters (δ) of carriers (citric acid or polymers) and differences (Δδ) compared to the value of TBZ determined using the Fedors and Van Krevelen methods.

	Fedors method			Van krevelen method		
Compounds	δ $(MPa)^{0.5}$	Δδ $(MPa)^{0.5}$	Classification	δ $(MPa)^{0.5}$	Δδ $(MPa)^{0.5}$	Classification
CA	32.25	11.4	Immiscible	31.06	12.8	Immiscible
HPMC E15	23.08	2.2	Miscible	24.7	6.44	Miscible
PVP K90	22.65	1.8	Miscible	21.7	3.44	Miscible
PUL	30.1	9.3	Immiscible	38.48	20	Immiscible
HEC	25.05	4.2	Partially miscible	29.67	11.41	Immiscible

3.3.2. Melting drug depression

DSC thermograms of physical mixtures of TBZ with several ratios of HMPC, PVP K90, Pullulan, HEC and CA were shown in Figure 8.

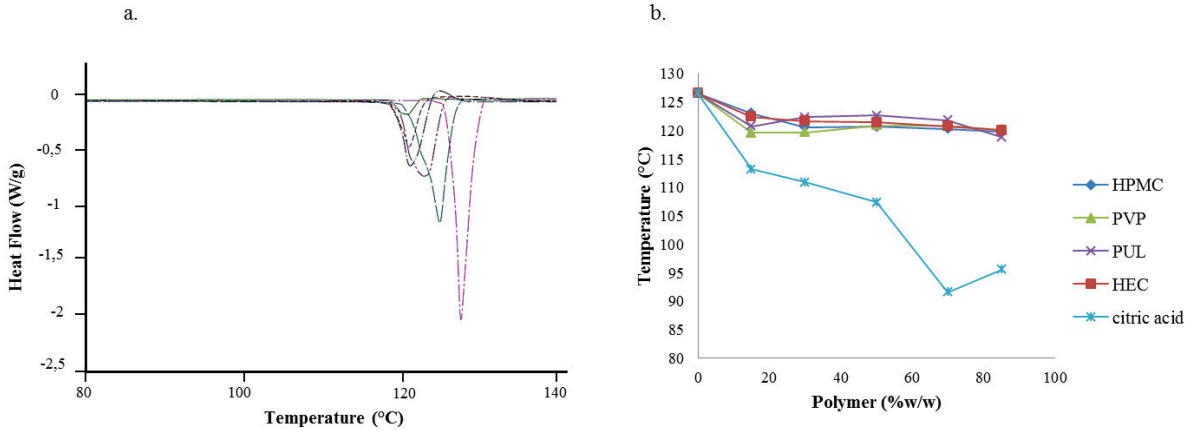


Figure 8: DSC thermograms of physical mixture of Tetrabenazine with increasing %w/w of HPMC measured at a heating rate of 2°C/min (a). Offset of melting drug peak as a function of %w/w of additives (b).

A decrease of TBZ melting point was observed with the increase of the weight fraction of polymer and citric acid. This observation indicated interaction between TBZ and additives testifying of miscibility between compounds.

3.3.3. Determination of glass transition temperature (Tg)

Tg of pure TBZ, CA, polymers (data not shown), TBZ-CA mixture and ternary systems (Figure 9) were determined by MDSC and values were presented in Table 3.

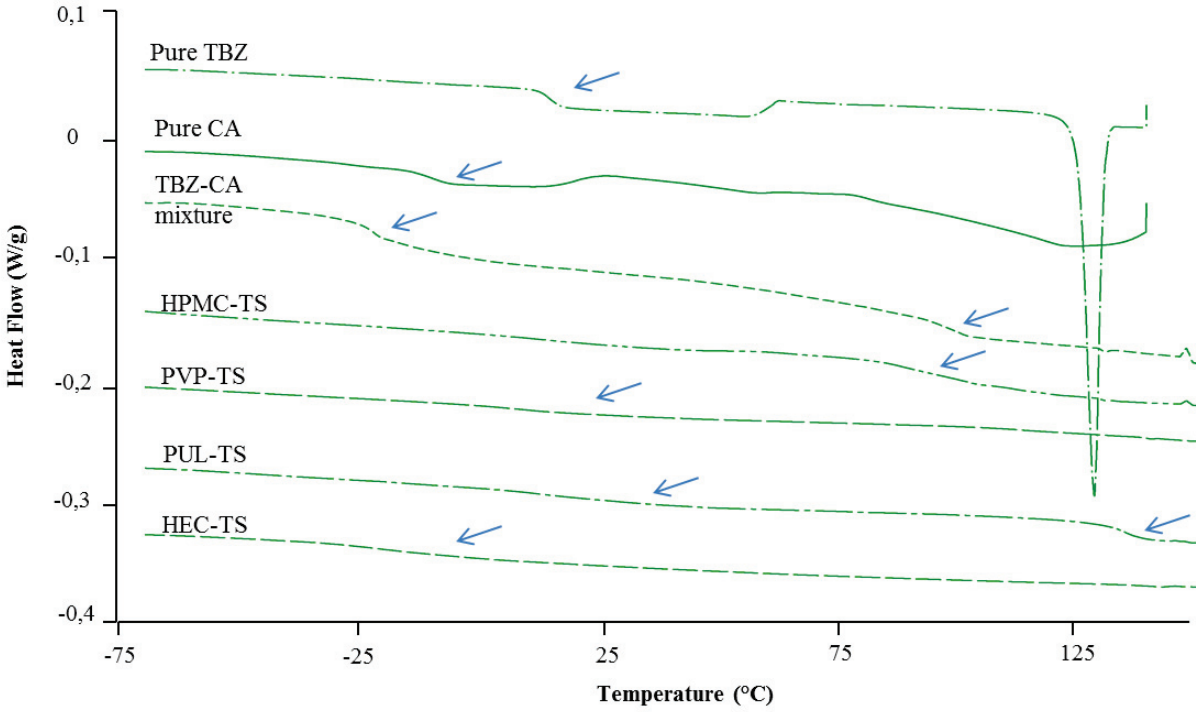


Figure 9: Thermograms of pure TBZ, pure CA, TBZ-CA mixture and ternary systems with MDSC.

MDSC allows identifying reversible event as glass transition; this method was more selective than classical DSC. TBZ-CA mixture and PUL-TS were characterized by two glass transition temperatures while HPMC-, PVP- and HEC-TS have only one Tg. TBZ-CA mixture was characterized by two Tg at -25.9°C and 97°C. PVP- and HEC-TS showed small Tg values, at 7.1°C and -21.4°C respectively. Tg of HPMC-TS was higher at about 90°C. PUL-TS showed two Tg at 7.9°C and 133.2°C.

Table 3: Values of glass transition temperature of initial compounds, TBZ-CA mixture and ternary systems.

Initial compound	Tg (°C)	System	Tg(°C)	Number of Tg
TBZ	10.5°C	**TBZ-CA mixture**	T_{g1}= -25.9°C T_{g2}= 97.0°C	2
CA	-13°C			
HPMC	168°C	**HPMC-TS**	T_g = 88.5	1
PVP	170°C	**PVP-TS**	T_g = 7.1	1
PUL	250°C	**PUL-TS**	T_{g1} = 7.9 T_{g2} = 133.2	2
HEC	120°C	**HEC-TS**	T_g = - 26.4	1

3.4. TBZ-Polymer and TBZ-CA interaction

3.4.1. Infra-red spectroscopy

As shown on Figure 10a, pure TBZ FT-IR spectrum presented several characteristic peaks : i) at 1697 cm^{-1} and 1257 cm^{-1} corresponding to the stretching of carbonyl (C=O), ii) at 1604, 1514 and 1462 cm^{-1} corresponding to the stretching of aromatics (C=C), iii) at 1226 cm^{-1} corresponding to the stretching of amine (C-N) and iv) at 1107 cm^{-1} corresponding to the stretching of ether function (C-O-C).

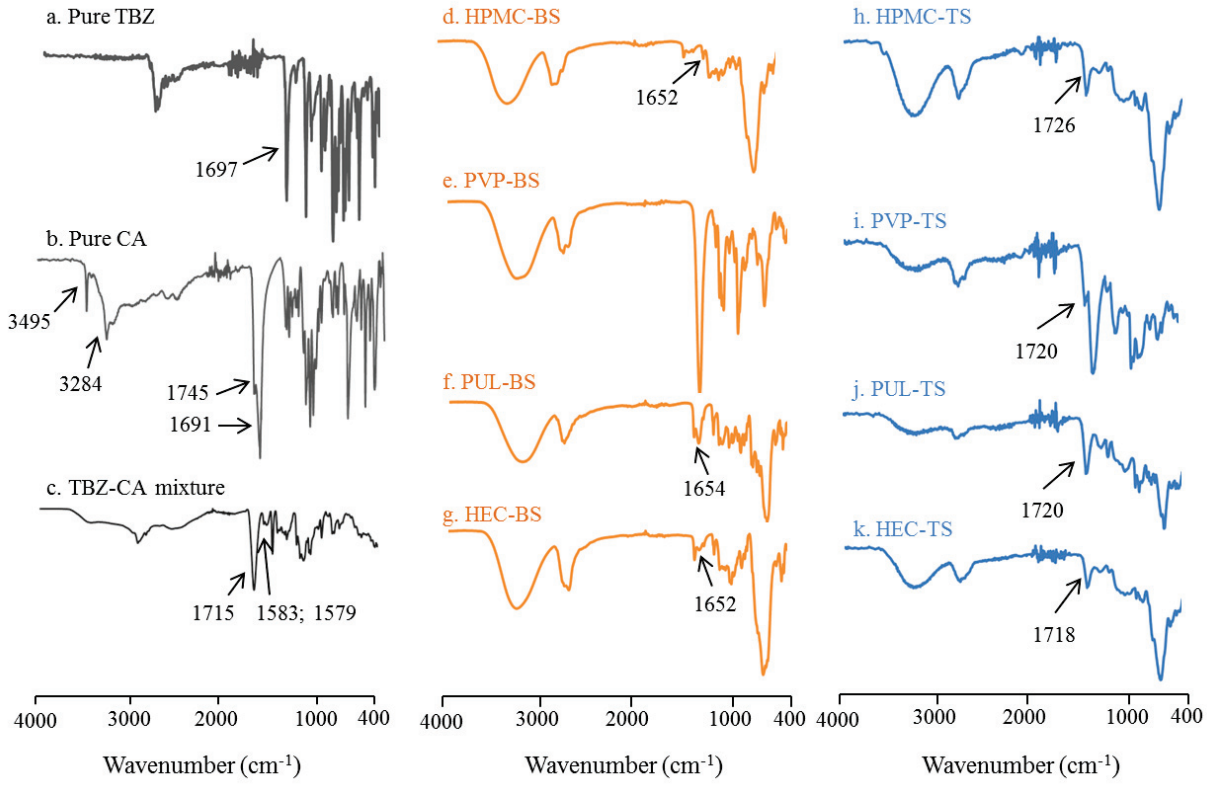


Figure 10: FT-IR spectrum of pure TBZ (a), pure CA (b), TBZ-CA mixture (c), binary (d, e, f, g) and ternary (h, i, j, k) systems.

Pure citric acid showed two distinct OH groups due to the presence of the alcoholic and carboxyl groups, characteristic peaks were respectively observed at 3495 cm^{-1} and 3284 cm^{-1} (Figure 10b). In TBZ-CA mixture, the ν (OH) of carboxyl group disappears and characteristic peaks of ν (COO-) were observed at 1583 and 1579 cm^{-1} (Figure 10c). In addition, a shift of ν(C=O) towards lower wavelength was observed, at 1715 cm^{-1}. In binary systems composed of HPMC, PUL and HEC, peaks characteristic of TBZ were recovered (Figure 10d, f, g). Additional peak corresponding to carbonyl peak was observed towards upper wavelengths (1652 cm^{-1}). In PVP-BS spectrum, only carbonyl peak corresponding to PVP was observed (Figure 10e). TBZ characteristic peak was masked by carbonyl function of PVP or no interaction was detected. In ternary systems, peak corresponding to carbonyl function observed in the TBZ-CA mixture was retrieved (Figure 10 h, i, j, k) with a small shift towards lower wavelengths.

3.4.2. H-bond interaction

Existence of molecular interaction between TBZ and polymers can explain the robustness of solid dispersions. TBZ has 4 hydrogen bonds receptors and the number of potential functional groups for one monomer which might interact with TBZ was given in Table 4. A capacity of cellulose derivatives and PUL to form H-bond interaction with TBZ can be provided by hydroxyl functions of polymers with quinolone and/or cetone and/or ether functions present in TBZ molecule. Conversely, no hydrogen donor is present in PVP polymer and no H-bond may be form with TBZ. In addition, PVP shows only polar groups capable of donating electrons to H- bond and therefore no ability to form H-bond with itself, in contrast to the other polymer used.

Table 4: Potential functional groups of additives might interact with TBZ.

Compounds	H-bond donor	H-bond interaction
Citric acid	4	Yes
HPMC	1	Yes
PVP K90	0	No
PUL	3	Yes
HEC	3	Yes

4. DISCUSSION

4.1. Characterization of binary and ternary systems

In this work four formulations of ODF have been developed using HPMC, PVP K90, PUL and HEC. TBZ, chosen as API model, was solubilized in water or in citric acid solution and then, its incorporation in different polymeric matrix was investigated. TBZ is poorly soluble in aqueous medium at neutral pH and soluble in acidic solutions. This poor solubility in water is reflected by release studies in salivary medium (pH 6.8). As shown in Figure 1, only 40% of the pure drug was dissolved after 2 hours of incubation. When dissolution studies were carried out on a dried mixture of TBZ and CA, the rate of dissolution sharply increased at the beginning, to reach 80% after 1 minute. Then, this rate decreased and after 2 hours the amount of TBZ dissolved in the medium was close to that of the pure TBZ. This decrease was due to the precipitation of the TBZ in the medium. This dissolution profile, characterizes by an initial burst release followed by a decrease in drug solubility, is representative of amorphous drugs and is related with devitrification of API.

In a second step the dissolution rate of TBZ from BS and TS formulated of different polymers was compared. Concerning BS, no enhancement was observed with HPMC and PUL, with no significant differences between dissolution profiles of pure drug and these systems. However, for PVP-BS and HEC-BS, around 50% of TBZ was released after 2 hours. Statistical analyses showed significant differences between pure drug and these two BS, suggesting the enhancement of drug dissolution.

This improvement in drug release with PVP could be explained by the high water solubility of this polymer which can enhance the wettability of TBZ. Improved wettability allows the increase of drug dissolution rate, as already observed with flufenamic acid (Leuner and Dressman, 2000) or gliclazide (Maggi *et al.*, 2015). In addition, PVP have been recognized as solubilizing agent for many poor soluble compounds such as Indomethacin or Naproxen (Paus *et al.*, 2015). However, the impact of the hydrophilic polymers on the TBZ dissolution rate in binary systems remained limited compared to the major improvement of TBZ dissolution obtained with TS. More than 80% of drug was released after 2 hours in case of TBZ formulated with CA in TS due to the solubilizing effect of CA as already demonstrated by Tran *et al.*. However, to obtain a sustained release of TBZ the choice of the polymer plays an important role. Dissolution profiles of TS were called “spring and parachute effect”. Due to their tridimensional structure, polymers prevent devitrification of TBZ amorphous state (Baghel *et al.*, 2016).

DRX analysis showed characteristic diffraction peaks of TBZ in BS reflecting the presence of TBZ in crystalline state. No crystalline peak was observed in diffractograms of TBZ-TS giving evidences that the API remained in the amorphous state irrespective of the polymer used.

In the case of DSC thermograms, TBZ-BS analysis presented a typical melting drug peak for the 4 polymers. In contrast, TBZ-TS analysis did not shown any melting drug peak. In agreement with DRX analyses, TBZ loaded in BS was in crystalline state and TBZ loaded in TS was in amorphous state. This state was due to the addition of CA, as noted by TBZ-CA mixture thermogram (Figure 3b) and is maintained in TS. Indeed, some studies showed that CA can be used as carrier for the preparation of Indomethacin (pKa=4.5) or Isradipine (pKa=5.33) as amorphous solid dispersions (Lu and Zografi, 1998; Tran *et al*., 2010). In our case, TBZ has a pKa value (6.51) closed to these API leading to the same observations. Compared to crystalline state, amorphous state allowed improving wettability of API, leading to an enhancement of drug dissolution because no energy is required to break up the crystal lattice during the dissolution process (Lewis *et al.*, 2009).

Globally, CA provided supersaturation of TBZ in the dissolution medium and the polymers maintained this state during time.

4.2. Characterization of ternary system after 6 months of storage

Polymers also played a crucial role in API stability during storage. After 6 months, TBZ release from TS was evaluated and compared with the initial release profile. A slight decrease of the TBZ released was observed for PVP-TS with 79% of TBZ dissolved after 5 min (Figure 5) compared to 86% for the freshly prepared film (Figure 1). This decrease was more pronounced with HEC-TS since only 67% of the TBZ content was dissolved in 5 min after 6 months of storage, compared to 85% in initial HEC-TS. These differences between dissolution profiles of TBZ in PVP-TS and HEC-TS at T0 and T=6 months were statistically significant. For PUL-TS, initial amount of drug released was recovered after 5 min but a decrease of API percentage was observed as a function of time, with significant differences between PUL-TS at T0 and T= 6 months from 1 hour. These differences in TBZ dissolution rate were related to the precipitation of the drug in aqueous medium. Leuner and Dressman showed that drugs released from SDs determined the formation of a supersaturated solution after dissolution. They suggested that if drugs precipitate, they were under a metastable polymorphic form with higher solubility than the most stable crystal form (Leuner and Dressman, 2000). Concerning HMPC-TS, no significant modification of the TBZ release

profile was observed after 6 months of storage. TBZ in HPMC-TS seems remain stable in the amorphous state. Other authors observed that HPMC was able to prevent albendazole crystallization in a neutral medium (Khori *et al.*, 1999). The major changes observed on PVP-TS or HEC-TS properties could be explained by the evolution of API state in the film. Indeed, X-ray diffraction and thermal analysis showed the formation of crystals following 3 months for PVP- and 6 months for HEC-TS. HPMC and PUL allowed maintaining API in amorphous solid dispersion during 6 months, whereas with PVP and HEC polymers, API was retrieved under a crystalline state (Table 5).

Table 5: Evolution of TBZ State in ternary system during 6 months

Ternary system	T=0	T=3months	T=6months
HPMC-TBZ-CA	A	A	A
PVP-TBZ-CA	A	C	C
PUL-TBZ-CA	A	A	A
HEC-TBZ-CA	A	A	C

4.3. Study of miscibility and interaction in ternary system.

The stabilization of the drug in the amorphous state when formulated in SDs represents a great challenge. The main problem is that the amorphous state is metastable and the API has a tendency to recrystallize to achieve a thermodynamic more stable state (Kou and Zhou, 2014). To solve this problem, hydrophilic polymers have been described. In particular, they can protect and maintain the amorphous state of API by three mechanisms (Demuth *et al.*, 2015): i) acting like a physical barrier; ii) increasing glass transition temperature of the mixture by vitrification due to high Tg value of polymers iii) allowing specific chemical interaction between polymer and drug (e.g. hydrogen bonds, acid-base interaction…). Moreover, the formation of a single continuous phase when the polymer and API were mixed will contribute to the stability of system because physical instability generally begins with a separation of the two different amorphous phases (Janssens and Van den Mooter, 2009).

We determined the miscibility between TBZ and polymers formulate in TS. Fedors and Van Krevelen methods were used to evaluate molecular similarities. These results obtained with these two methods were similar and showed apparent miscibility for TBZ-PVP and TBZ-HPMC systems ($\Delta\delta<7$). System constituted by CA-TBZ and TBZ-PUL were clearly non-miscible; and finally depending on the calculation method employed TBZ-HEC were considered partially or non-miscible.

At the melting point, the chemical potential of crystalline material is equal to the chemical potential of molten material. When the molten drug is miscible with the polymer, the chemical potential of the drug in the solution will be lower than the pure molten drug; this leads to a melting point depression of the drug dissolved in polymer (Prasad *et al.*, 2014). DSC thermograms of TBZ-additives physical mixtures at several ratios are shown in Figure 8. A decrease of TBZ melting point occurred with the increase of the weight fraction of polymer and CA. A melting point depression was observed for all the system. However, from the ratio (30:70) of TBZ-CA mixture, the curve linearity was lost because TBZ melting peak was masked by CA melting peak. Melting drug depression indicated the molecular interaction between API and additives (Marsac *et al.*, 2006) and the effectiveness of miscibility can be classified as follow: CA >>> PUL> HEC> HPMC> PVP.

Studies on glass transition temperature (Tg) allow the characterization of the number of amorphous phases in the system. The presence of two different Tg suggest that two phases are present. Pure TBZ showed a Tg of around 10.5°C, whereas Tg of pure CA was around -13°C. TBZ-CA amorphous system had two Tg. One Tg at -25°C, and another one at 97°C. The first value was lower than Tg of pure CA due to the presence of the plasticizer effect of TBZ. Moreover, the Tg of TBZ-CA mixture is broader and ends in the same temperature range as Tg of pure CA. This observation indicates a good miscibility between CA and TBZ and is also confirmed by the absence of TBZ Tg. The mixture seems to remain miscible without crystallization of compounds. A second Tg was observed at about 97°C in the reversing heat flow. The assumption of an amorphous network formation, resulting from system reticulation during drying, could explained the occurrence of a new phase with a Tg >T ambient. Concerning TS made of HPMC, PVP and HEC, only one Tg was observed. In HPMC-TS and PVP-TS, improvement of Tg value showed an “anti-plasticizing” effect of this polymer. For HEC-TS, Tg was not affected by the addition of the polymer, testifying a low molecular interaction between polymer and TBZ-CA SDs. No “anti-plasticizing” effect of HEC may explain the TBZ crystallization over time (Yoo *et al.*, 2009). Finally, two Tg were observed in PUL-TS reflecting the presence of two amorphous phases in the system.

4.4. TBZ-polymer and TBZ-CA interactions

A capacity of cellulose derivatives and PUL to form H-bond interaction with TBZ can be provided by hydroxyl functions of polymers with TBZ molecule. Conversely, no hydrogen donor is present in PVP polymer and no H-bond may be form with TBZ.

Characterization of TBZ-Polymer BS by FT-IR, showed the presence of carbonyl peak towards upper wavelengths (~1650 cm^{-1}) in the spectra of HPMC-TBZ, PUL-TBZ and HEC-TBZ system. This shift was characteristic of hydrogen bonding. Concerning PVP-TBZ system, no shift was observed indicating that no H-bond interaction between TBZ and PVP.
For TBZ-CA mixture, a merge of carbonyl peak was observed towards lower wavelengths. This result revealed the presence of molecular interaction but not specific H-bond interaction. In this case, acid-base interactions were the most probable. Indeed, in TBZ-CA mixture, the ν (OH) of carboxyl group disappears. At the same time, characteristic peaks of ν (COO^-) were observed at 1583 and 1579 cm^{-1} due to the presence of citric acid in ionized form (Tarakeshwar and Manogaran, 1994). In addition in TBZ-CA mixture, ν (C=0) was observed at 1715 cm^{-1}, this wavelength was characteristic of CA in solution (Tarakeshwar and Manogaran, 1994). Ionized CA form was present in the mixture and can act as counter-ion for TBZ. Mixing TBZ and CA, results in TBZ citrate formation, leading to improve TBZ dissolution. In TS, characteristic peak corresponding to carbonyl function was observed at 1720cm^{-1}. This value was near to carbonyl peak value obtained in TBZ-CA system. Amorphous system acquired when TBZ was mixed with citric acid was maintained in orodipsersible films.

Table 6: Physicochemical factors of ternary systems (Y=Yes; N=No; P=partially).

Polymers used for ternary system	Theoretical miscibility	Melting drug depression	Number of phase (number of Tg)	"Anti-plasticization" Effect	Theoretical hydrogen-bonding capacities	H-Bond (Det. With FT-IR)
HPMC	Y	Y	1	Y	Y	Y
PVP	Y	Y	1	Y	N	N
PUL	N	Y	2	Y	Y	Y
HEC	P	Y	1	N	Y	Y

A summary of the physicochemical parameters of TS are given in Table 6. Concerning HPMC-TS, all the parameter presented are needed to obtain and maintain TBZ in the amorphous state as confirmed by experimental studies. For PVP-TS, the molecular miscibility was demonstrated while molecules mobility was not reduced. In this case, no H-bond interactions were possible which prevents the formation of clusters and finally the crystallization of the TBZ. TBZ and PUL were not miscible, molecular similarities were not confirmed and a single phase cannot be obtained. However, no recrystallization was observed over time indicating the stability of this system. As previously described, the formation of amorphous solid dispersions was due to the dissolution of TBZ with CA. This state was due

to H-bond interaction which occurs between TBZ and PUL. Analyzing drug release profile after 6 months of storage, a rapid precipitation of TBZ in the dissolution medium was observed, reflecting a metastable state of API in this matrix. According to physicochemical parameters of HEC-TS, a stable amorphous system should be obtained. However, emergence of crystals during storage was observed by DSC, DRX and SEM. In this system, no "anti-plasticization" of HEC on ODF could explain instability and recrystallization of TBZ.

5. CONCLUSION

The objective of this work has been to study and identify the parameters that influenced the formation of amorphous ODF loaded with TBZ as a model drug. ODF-BS and TS made of TBZ, polymer and citric acid were formulated using 4 types of hydrophilic polymers (HPMC, PVPK90, PUL, HEC). Physicochemical characterization of BS and TS to determine molecular similarities and mobility of API in ODF has proven the crucial role of CA in the formation of the amorphous state of TBZ. Besides, we demonstrated that the choice of the polymer nature plays an important role in the stability of the amorphous state of TBZ over time. ODF-TS allocated the drug in the amorphous phase. H-bonding were formed between TBZ and HPMC-TS, PUL-TS, and HEC-TS which ensure the retention of amorphous TBZ. However, only HPMC-TS were totally miscible while stabilizing the amorphous TBZ state over time.

REFERENCES

Baghel, S., Cathcart, H., O'Reilly, N.J., 2016. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs, J. Pharm. Sci. 105, 2527-2544.

Bala, R., Pawar, P., Khanna, S., Arora, S., 2013. Orally Dissolving Strips: A New Approach to Oral Drug Delivery System. Int. J. Pharm. Investigation; 3, 67-76.

Chen, J.J., Swope, D. M., 2012. Tetrabenazine for the Treatment of Hyperkinetic Movement Disorders: A Review of the Literature. Clin. Ther. 34, 1487-1504.

Chiou, W., Riegelman, S., 1971. Pharmaceutical Applications of Solid Dispersion Systems. J. Pharm. Sci. 60, 1281-1302.

Craig, D., 2001. The Mechanisms of Drug Release from Solid Dispersions in Water-Soluble Polymers. Int. J. Pharm. 231, 131–44.

Démuth, B., Nagy, Z.K., Balogh, A., Vigh, T., Marosi, G., Verreck, G., Van Assche, I., Brewster, M.E., 2015. Downstream Processing of Polymer-Based Amorphous Solid Dispersions to Generate Tablet Formulations. Int. J. Pharm. 486, 268–86.

Fedors, R., 1974. A Method for Estimating Both the Solubility Parameters and Molar Volumes of Liquids. Polym. Eng. Sci. 14, 147-154.

Garrigues, O., 2010, Site de calcules du paramètre de solubilité moléculaire, Software Engineering 2010. <dumas-00524180>.

Gittings, S., Turnbull, N., Roberts, C.J., Gershkovich, P., 2014. Dissolution Methodology for Taste Masked Oral Dosage Forms. J. Control Release. 173, 32–42.

Guo, Y., Shalaev, E., Smith, S., 2013. Physical Stability of Pharmaceutical Formulations: Solid-State Characterization of Amorphous Dispersions. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 49, 137–44.

Jain, S., Greene, P.E., Frucht, S.T., 2006. Tetrabenazine Therapy of Pediatric Hyperkinetic Movement Disorders. Mov. Disord. 21, 1966–1972.

Janssens, S., Van den Mooter, G., 2009. Review: Physical Chemistry of Solid Dispersions. J. Pharm. Pharmacol. 61, 1571–1586.

Khori, N., Yamayoshi, Y., Xin, H., Iseki, K., Sato, N., Todo, S., Miyazaki, K., 1998. Improving the Oral Bioavailability of Albendazole in Rabbits by the Solid Dispersion Technique." J. Pharm. Pharmacol. 51, 159–64.

Kou, K., Zhou, L., 2014. Stability of Amorphous Solid Dispersion, in: Shah *et al.*. (eds.), Amorphous Solid Dispersions. Springer, New York, pp. 515-523.

Leuner, C., Dressman, J., 2000. Improving Dug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersions. Eur. J. Pharm. and Biopharm. 50, 47–60.

Lewis, D., Udupa, N., Atin, K., 2009. Solid Dispersions : A Review. Pak. J. Pharm. Sci. 22, 234–46.

Lu, Q., Zografi, G., 1998. Phase Behavior of Binary and Ternary Amorphous Mixtures Containing Indomethacin, Citric Acid and PVP. Pharm. Res. 15, 1202-1206.

Maggi, L., Canobbio, A., Bruni, G., Musitelli, G., Conte, U., 2015. Improvement of the Dissolution Behavior of Gliclazide, a Slightly Soluble Drug, Using Solid Dispersions. J. Drug Deliv. Sci. Tec. 26, 17–23.

Marsac, P., Konno, H., Taylor, L., 2006. A Comparison of the Physical Stability of Amorphous Felodipine and Nifedipine Systems. Pharm. Res. 23, 2306–2316.

Morales, J.O, McConville, J.T., 2011. Manufacture and Characterization of Mucoadhesive Buccal Films. Eur J Pharm Biopharm; 77, 187–99.

Paus, R., Prudic, A., Ji, Y., 2015. Influence of Excipients on Solubility and Dissolution of Pharmaceuticals. Int. J. Pharm. 485, 277–87.

Prasad, D., Chauhan, H., Atef, E., 2014. Amorphous Stabilization and Dissolution Enhancement of Amorphous Ternary Solid Dispersions: Combination of Polymers Showing Drug–Polymer Interaction for Synergistic Effects. J. Pharm. Sci. 103, 3511–3523.

Preis, M., Pein, M., and Breitkreutz, J., 2012. Development of a Taste-Masked Orodispersible Film Containing Dimenhydrinate. Pharm. 4, 551–62.

Sayed, S., Howida, KI., Magdy, I.M., El-Milligi, M.F., 2013. Fast-Dissolving Sublingual Films of Terbutaline Sulfate: Formulation and In Vitro/In Vivo Evaluation. Mol. Pharm. 10, 2942–47.

Senta-Loys, Z., Bourgeois, S., Pailler-Mattei, C., Agusti, G., Briançon, S., Fessi, H., 2016. Formulation of orodispersible films for pediatric therapy-Investigation of feasibility and stability for Tetrabenazine as drug model. J Pharm Pharmacol. doi:10.1111/jphp.12627.

Serajuddin, A., 1999. Solid Dispersion of Poorly Water-soluble Drugs: Early Promises, Subsequent Problems, and Recent Breakthroughs. J. Pharm. Sci. 88, 1058–66.

Tarakeshwar, P., Manogaran, S., 1994. Ground state vibrations of citric acid and the citrate trianion-an *ab initio* study. Spectrochim Acta A; 50, 2327-2343.

Tran, T., Tran, P., Choi, H., Han, H., Lee, B., 2010. The Roles of Acidifiers in Solid Dispersions and Physical Mixtures. Int. J. Pharm. 384, 60–66.

Van Krevelen, D.W., 1990. Cohesive properties and solubility in: Van Krevelen, D.W. (Eds.), Properties of polymers: their correlation with chemical structure, their numerical estimation and prediction from additive group contributions. Elsevier, pp. 189-224.

Vasconcelos, T., Sarmento, B., Costa, P., 2007. Solid Dispersions as Strategy to Improve Oral Bioavailability of Poor Water Soluble Drugs. Drug Disc. Today. 12, 1068–1075.

Yoo, S., Krill, S.L., Wang, Z., Telang, C., 2009. Miscibility/stability Considerations in Binary Solid Dispersion Systems Composed of Functional Excipients towards the Design of Multi-Component Amorphous Systems. J. Pharm. Sci. 98, 4711–23.

4 Incorporation dans des cyclodextrines - Amélioration de la stabilité et des propriétés de la TBZ contenue dans un ODF.

Les films orodispersibles développés précédemment contiennent de la TBZ sous forme de dispersion solide (Cf chapitres expérimentaux 2 et 3). La TBZ sous forme de poudre cristalline est très peu soluble en milieu aqueux à pH neutre (20µg/mL). Ainsi, pour des raisons de faisabilité et reproductibilité lors de la fabrication, le PA a été préalablement solubilisé dans de l'eau acidifiée avant d'être incorporé dans le gel de polymère servant de support pour les films. Lors de la caractérisation de ces films, une nette amélioration de la dissolution de la TBZ en milieu salivaire (pH 6,8) a été constatée, et ce, quelle que soit la nature du support de polymère utilisée. L'amélioration de la dissolution a été expliquée par la présence de la TBZ à l'état amorphe dans les films, grâce aux résultats obtenus en DSC, DRX et microscopie polarisante (Senta-loys *et al.*, 2016). Cependant, lors de l'étude de stabilité réalisée à 40°C et 75% d'humidité relative durant 6 mois, la recristallisation de la TBZ a été observée dans certaines matrices. En effet, des cristaux de TBZ sont apparus dès le premier mois de stockage dans le film constitué de PVP et à partir de 3 mois dans le film composé d'HEC. A contrario, aucun cristal n'a été retrouvé dans les films constitués d'HPMC et de Pullulan. Une seconde étude a visé à mettre en évidence les raisons pour lesquelles la TBZ est présente à l'état amorphe dans les films et pourquoi celle-ci tend à recristalliser dans certaines matrices. L'analyse des conditions de fabrication et de stockage a montré que :

- ✓ L'état amorphe a été obtenu grâce à l'addition d'acide citrique pour solubiliser la TBZ. La première étape de solubilisation de la TBZ dans l'eau purifiée acidifiée a permis d'obtenir le PA sous forme dissoute.
- ✓ Cette solution a ensuite été incorporée dans un gel de polymère. L'homogénéisation du mélange a permis de répartir les molécules de TBZ dans la matrice. Le gel obtenu a alors été coulé dans une boîte de Petri et placé sous hotte pour permettre l'évaporation du solvant. Le séchage du gel en film va ainsi permettre de figer les molécules de PA dans la matrice de polymère. A ce stade, le système peut être défini comme une dispersion solide amorphe de type 2, c'est à dire une suspension à l'état vitreux.
- ✓ L'étude de stabilité du PA dans des conditions drastiques a montré l'importance de la nature du polymère utilisé pour la conservation de la TBZ à l'état amorphe. Par exemple, la TBZ recristallise rapidement dans la matrice constituée de PVP K90.

Cette observation a pu être expliquée par une incapacité de la TBZ et de la PVP à former des liaisons hydrogène. Cette absence d'interaction favorise la mobilité moléculaire et donc la recristallisation. Tandis que dans le film composé d'HPMC, la TBZ à l'état amorphe a été conservée durant toute la durée des études de stabilité (6 mois). Cela a pu être expliqué d'une part, par la capacité de l'HPMC à créer des liaisons hydrogène avec la TBZ et, d'autre part, par une augmentation de la barrière énergétique de précipitation qui entraîne une faible mobilité moléculaire.

Les ODF sous forme de SD amorphes, peuvent être définis comme des systèmes ternaires PA-Modificateur de pH-Polymère. Ils ont montré une amélioration de la dissolution du PA dans le milieu salivaire à T=0. Cependant, l'obtention de cet état amorphe engendre deux problèmes. Le premier repose sur l'instabilité des SD amorphes car il s'agit d'un état métastable qui tend à recristalliser au cours du temps (Khou and Zhou, 2014). Le second concerne l'amélioration de la dissolution du PA dans le milieu salivaire. En effet, la saveur ne peut être ressentie par les récepteurs gustatifs que si le composé est à l'état dissous. Ainsi, augmenter la solubilité du PA revient à promouvoir les interactions entre les molécules de PA et les récepteurs sensoriels (Walsh *et al.*, 2014) ce qui représente une contrainte majeure dans le cas du développement d'une forme orale pédiatrique .

Dans le but de réduire le ressenti de l'amertume de la TBZ et améliorer sa stabilité, l'incorporation du PA dans les cyclodextrines (CD) a été envisagée. Les CD sont des oligosaccharides macrocycliques issus de la réduction de dextrine par l'action d'une bactérie appelée *Bacillus amylobacter*. Il existe trois types de CD naturelles composées respectivement de 6, 7 ou 8 unités glycosidiques pour l'α-CD, la β-CD et la γ-CD. Ces cyclodextrines natives sont caractérisées par une structure de cône tronqué avec une cavité de nature hydrophobe et une surface hydrophile. En raison de sa forme et de sa structure moléculaire, la CD présente la capacité unique de piéger une molécule hôte à l'intérieur de sa cavité et d'agir comme un récipient moléculaire et former ainsi des complexes d'inclusion (CI). De nombreuses revues relatent des cyclodextrines et de leurs particularités (Brewster and Loftsson, 2007 ; Loftsson and Duchêne, 2007 ; Carrier *et al.*, 2007 ; Ostero-espinar *et al.*, 2010 ; Loftsson and Brewster, 2010 ; Kurkov and Loftsson, 2013 ; Jambhekar and Breen, 2016). Les CI formés à partir de CD représentent un fort intérêt dans le domaine pharmaceutique. En effet, ils offrent plusieurs avantages (Jambhekar and Breen, 2016) tels que i) augmenter la solubilité des molécules faiblement hydrosolubles ; ii) masquer les caractères organoleptiques d'un PA comme une amertume par exemple (Sohi and Sultana,

2004) et iii) protéger le PA des dégradations thermiques, oxydatives et de la lumière. De plus, elles sont aussi utilisées comme additif dans les dispersions solides (SD) de 3ème génération pour augmenter les performances biopharmaceutiques du système sursaturé (Hallouard *et al.*, 2016). En effet, en séparant les molécules de PA, les CD diminuent leurs risques d'agglomération. Cela permet alors d'inhiber la recristallisation et la précipitation du PA lors de sa libération dans les milieux physiologiques. Ainsi, la formation de CI avec des CD peut à la fois permettre de stabiliser les SD mais aussi masquer le goût du PA en créant une barrière chimique autour du PA sous forme de CI.

L'objectif de cette dernière partie sera de préparer des CI TBZ-CD pour améliorer la stabilité du PA et diminuer la sensation d'amertume. Pour se faire, la première étape sera de déterminer la meilleure affinité du PA avec les différents types de CD (α, β, γ-CD) par la méthode d'Higuchi-Connors (Higuchi and Connors, 1965). La deuxième étape consistera à préparer des complexes à différents ratios PA : CD et de les caractériser afin de déterminer le ratio optimal. Le CI choisi sera ensuite incorporé dans deux gels de polymères différents (HPMC et PVP) pour former les ODF. L'amélioration de la formulation sera caractérisée par une étude de stabilité des films contenant les CI et par un test panel pour déterminer l'effet des CD sur la sensation d'amertume.

4.1 Matériels

L'α-cyclodextrine a été fourni par Interchim (France). La TBZ provient de chez Centaur (Inde). Deux types de polymères ont été utilisés pour la fabrication des ODF : l'Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) de type Vivapharm® E15 fournie par JRS Pharma et la Povidone K90 (PVP K90) fournie par Ashland. L'acide citrique utilisé comme modificateur de pH et les autres excipients utilisés comme plastifiant (glycérol) et agent désintégrant (sorbitol) ont été fourni par Cooper (France).

4.2 Méthodes

4.2.1 **Choix d'un type de CD pour la complexation de la TBZ**

4.2.1.1 *Etude de solubilité*

L'étude de solubilité de la TBZ en présence de CD a été réalisée selon la méthode Higuchi-Connors. Les CD α, β et γ ont été utilisées afin de déterminer le type permettant d'améliorer au mieux la solubilité du PA. Pour ce faire, des solutions de concentrations croissantes en CD ont été réalisées dans 5mL d'eau purifiée (Tableau 22).

Tableau 22 : Gammes de concentrations réalisées pour établir le diagramme de solubilité de la TBZ en fonction du type de CD utilisées.

Type de CD	Concentration en CD (mM)									
αCD	0	7,5	15	30	45	75	90	105	120	150
βCD	0	1,6	4,8	6,4	8	9,6	11,2	12,8	14,4	16
γCD	0	9	18	36	54	90	108	126	144	180

La TBZ a ensuite été ajoutée en excès dans chaque flacon. Les échantillons sont ensuite mis sous agitation à 100 rpm, à 25°C durant 24h. Les surnageants ont été récupérés et filtrés sur une membrane filtrante en nylon de 0,22µm (Millipore®). Les échantillons sont ensuite dilués dans un mélange ACN/EAU (50/50) pour se rapprocher des conditions de la gamme étalon HPLC. La concentration en TBZ est déterminée par HPLC selon la méthode décrit ci-dessous et le profil de phase pour chaque type de CD est tracé. La constante de stabilité (Ks) est estimée d'après la pente obtenue dans les diagrammes de phase selon l'équation d'Higuchi et Connors :

$$Ks = \frac{Pente}{S_0 \times (1 - pente)}$$

Avec S_0= Solubilité de la TBZ dans l'eau à 25°C.

4.2.1.2 *Dosage de la TBZ*

Une méthode HPLC a été mise au point pour déterminer la concentration de TBZ. Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- ✓ Type de colonne : Kinetex, 2,6µm C18 100*4.6mm ;
- ✓ Phase mobile : ACN/EAU (60/40)

- ✓ Débit : 0.7mL/min ;
- ✓ Volume injecté : 5µL ;
- ✓ Température du four : 30°C ;
- ✓ Longueur d'onde : 224 nm ;
- ✓ Temps rétention : 5 minutes ;
- ✓ Durée de l'analyse : 15 minutes.

La méthode a été validée selon l'ICH. Une courbe d'étalonnage a été reproduite 5 fois pour une gamme de concentration en TBZ allant de 2 à 10µg/mL afin de vérifier sa reproductibilité (Annexe 4). La linéarité a été vérifiée dans cette gamme de concentration avec un R^2= 0.9991.

4.2.2 **Préparation de complexes d'inclusion TBZ-αCD et incorporation dans des ODF**

4.2.2.1 *Préparation des complexes d'inclusion*

Dans un premier temps, la TBZ est solubilisée dans de l'eau purifiée contenant de l'acide citrique (1,5 équivalent molaire) afin d'être dans les mêmes conditions que la formulation des ODF préalablement étudiés. L'α-CD est ajoutée quelques minutes après, avec les ratios molaires TBZ : α-CD suivants : (2 :1) ; (1 :1) ; (1 :2) et (1 :3). Ensuite, la suspension obtenue est séchée par spray-drying pour obtenir des complexes d'inclusion à l'état solide. Le séchage a été réalisé sur un mini spray-dryer B-190 (Buchi, Suisse) avec les conditions opératoires suivantes :

- ✓ Température d'entrée = 110°C ;
- ✓ Température de sortie = 88°C ;
- ✓ Débit = 30m^3/h ;
- ✓ Pression = 4 bars.

Les CI sont ensuite récupérés dans le cyclone et le réceptacle et sont stockés dans un dessiccateur à l'abri de la lumière.

4.2.2.2 *Incorporation des complexes d'inclusion dans les films orodispersibles*

Les ODF sont obtenus par la méthode de coulée/évaporation comme décrit précédemment (cf chapitre 1 expérimental). Après avoir solubilisés le polymère et les autres excipients dans de l'eau purifiée, les CI sont incorporés selon deux procédés :

- ✓ Incorporation des CI sous forme de solution (procédé 1): la solution de TBZ dans l'eau acidifiée en présence des CD est directement incorporée dans le gel (Tableau 23).

Tableau 23 : Composition des films orodispersibles avec incorporation des CI sous forme de solution (procédé 1).

	% Polymère	%CD	%TBZ	%CA	% Glycérol	% Sorbitol
HPMC-ODF	51,7	20,7	3,45	3,45	12,5	8,2
PVP-ODF	56,3	22,6	3,75	3,75	13,6	-

- ✓ Incorporation des CI en poudre obtenu après séchage par atomisation (procédé 2): les CI sous forme de poudre, obtenue par spray-drying, sont dispersés dans le gel (Tableau 24).

Tableau 24 : Composition des films orodispersibles avec incorporation des CI en poudre obtenus après séchage par atomisation (procédé 2).

	% Polymère	%CI	% Glycérol	% Sorbitol
HPMC-ODF	51,7	27,6	12,5	8,2
PVP-ODF	56,3	30,1	13,6	-

Après homogénéisation pendant 1 heure à 250 rpm, le gel est coulé dans une boîte de Petri et placé sous hotte afin de faire évaporer le solvant ($T_{ambiante}$, temps~20h). Le film sec est récupéré et placé dans un dessiccateur à l'abri de la lumière.

4.2.3 Caractérisations des CI et ODF

Les CI sont caractérisés par différentes analyses (DSC, DRX, FT-IR, MEB) et comparés avec les mélanges physiques correspondant à leur ratio afin de mettre en évidence l'existence de différences. Cette procédure va permettre de prouver l'existence de CI et de déterminer le ratio TBZ-αCD optimal. Une fois le meilleur ratio choisi, les CI sont incorporés dans les films et caractérisé afin de :

- ➢ Vérifier leur intégrité dans la matrice ;
- ➢ Observer les différences entre les deux procédés de fabrication (incorporation en solution ou à l'état solide) ;
- ➢ Observer l'amélioration de la formulation en déterminant la stabilité de la TBZ dans les ODF au bout d'un mois de conservation. Mais aussi déterminer l'efficacité de masquage du goût de la TBZ dans le film d'HPMC au moyen d'un panel.

- Déterminer l'effet des CD sur la recristallisation de la TBZ.

4.2.3.1 *Analyse DSC*

Afin de mettre en évidence la formation de complexes d'inclusion, la calorimétrie différentielle à balayage modulée (MDSC) a été utilisée. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un appareil de type DSC Q200 (TA instruments), muni d'un système réfrigérant (RCS90) et d'un logiciel (Universal Analysis 2000, TA instruments). L'équipement a été préalablement calibré avec de l'indium. L'atmosphère a été maintenu sous azote a un débit de 20mL/min. Un creuset en aluminium vide scellé a été utilisé comme référence. La TBZ pure, l'α-CD pure, l'α-CD après séchage par atomisation, les mélanges physiques et les CI à différents ratios TBZ-CD et les ODF ont été analysés par DSC afin de caractériser leur état physique. Les échantillons (7-9 mg) ont été placés dans un creuset en aluminium scellé et ont été modulés avec une amplitude de 1°C toutes les 40 secondes, avec une rampe de température allant de 10 à 170°C, à 2°C/min. Toutes les mesures ont été réalisées en triplica.

4.2.3.2 *Analyse DRX*

Les analyses effectuées par diffraction des rayons X ont été conduites pour déterminer les caractéristiques cristallines de la TBZ pure, l'α-CD pure, l'α-CD après séchage par atomisation, les mélanges physiques et les CI à différents ratios. De plus, les expériences ont été réalisées sur les ODF contenant les CI incorporés à l'état solide et en solution. Les mesures ont été effectuées sur un diffractomètre Bruker D8-Advance (D8-A25) dans les conditions suivantes : de 5-50° 2Theta, avec un voltage de 40kV, un courant de 40mA, un pas de 0.02°, des fentes variables avec couverture constante de 4 mm, un filtre Ni et un détecteur LynxEye XE. La durée de la mesure est d'environ 16 minutes. Les analyses ont été effectuées au centre de diffractométrie de l'Université Claude Bernard – Lyon 1(Villeurbanne, France).

4.2.3.3 *FT-IR*

Un spectromètre infra-rouge (IRPrestige-21, SHIMADZU) avec le dispositif de réflexion totale atténuée (ATR-Attenuated Total Reflection) a été utilisé pour mettre en évidence la présence d'interactions entre la TBZ et l'αCD. Ainsi, les mesures ont été effectuées sur les matières premières (TBZ, αCD, CA), les mélanges physiques et les CI à différents ratios et sur les ODF contenant les CI. Les échantillons ont été placés sur le cristal, pressés et le signal a été enregistré. Le blanc a été obtenu en utilisant le cristal fraichement nettoyé. Les analyses

ont été conduites sur des fréquences allant de 4000 à 400 cm^{-1}. Chaque analyse a été répétée trois fois.

4.2.3.4 *Microscopie Electronique à Balayage (MEB)*

Les matières premières et les complexes TBZ-αCD ont été analysés par microscopie électronique à balayage (Zeiss Merlin Compact, France) au Centre Technologique des Microstructures (CTμ) de l'Université Claude Bernard – Lyon 1(Villeurbanne, France) dans le but de caractériser la structure des complexes d'inclusion. Les échantillons ont été directement fixés sur un support en métal à l'aide d'un ruban adhésif double face. Ils ont ensuite été recouverts de platine par pulvérisation cathodique sous vide. Les échantillons ont été observés par MEB avec une accélération de 15 kV.

4.2.3.5 *Microscopie polarisante*

Un microscope polarisant (Leica DMLM) a été utilisé afin de mettre en évidence la présence de cristaux dans les ODF.

4.2.3.6 *Essais de dissolution in vitro*

Les études de dissolution de la TBZ ont été réalisées sur les ODF contenant les CI. Elles ont été conduites en milieu salivaire à pH 6.8 afin de suivre la dissolution de la TBZ complexée dans la cavité buccale. Le milieu salivaire est constitué d'une solution aqueuse de KH_2PO_4 (12 mM), NaCl (40 mM), et $CaCl_2$ (1,5 mM) ajustée à pH 6,8 avec de l'hydroxyde de sodium. Les études de libération du PA ont été effectuées sur un film de 4 cm^2 introduit dans un bécher contenant 50 mL de milieu salivaire, maintenu à 37°C, sous une agitation magnétique de 200rpm. Un échantillon de 1mL a été prélevé à 1, 2, 3, 4, 5, 15 et 30 min et substitué par 1mL de milieu de dissolution. Les échantillons ont été filtrés à l'aide d'une membrane filtrante en acétate de cellulose de 0,45 μm (Millipore®) et la concentration en TBZ a été déterminée à l'aide d'un spectromètre UV (UV-1601, UV Visible spectrometer, SHIMADZU) à λ=232 nm. Les essais de dissolution ont été reproduits trois fois dans le but de déterminer le profil de libération de la TBZ.

Afin d'observer les différences entre les profils de dissolution obtenus, des analyses statistiques ont été conduites à l'aide du logiciel *R*, avec un seuil de 5% correspondant au risque α. Les données obtenues ne suivent pas une loi normale, ainsi le test non paramétrique Kruskal-Wallis a été utilisé. C'est pourquoi, afin de déterminer les différences significatives ($p<0.05$) entre deux paramètres, un test post-hoc (kruskalmc) pour des comparaisons

multiples, a été réalisé. L'analyse statistique a été appliquée sur les résultats de dissolution de la TBZ contenue dans les films sous forme de SD avec et sans la présence de CI, à T=0 et à T=1 mois.

4.2.3.7 *Etude de stabilité*

Dans une étude précédente, la recristallisation de la TBZ a été observée dès le premier mois de conservation avec l'ODF composé de PVP. Afin de déterminer l'influence des CD sur la stabilité de notre PA, les ODF contenant les CI ont été conservés dans un conditionnement Alu-Alu étanche, à 40°C et 75% d'humidité relative durant 1 mois. Des analyses DSC, DRX et de libération du PA ont alors été conduites sur ces ODF afin d'observer leur évolution au bout d'un mois.

4.2.3.8 *Evaluation des caractéristiques organoleptiques par un panel de volontaires*

Différentes formulations ont été soumises à un panel de volontaires afin de déterminer leurs caractéristiques organoleptiques. La composition des ODF testés est présentée dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Composition des ODF administrés au panel.

Formule	HPMC (g)	TBZ (g)	AC (g)	Glycérol (g)	Sorbitol (g)	CD (g)	Aromatisant (g)
F1	1,5	0,113	0,113	0,36	0,24	-	-
F2	1,5	0,113	0,113	0,36	0,24	0,675	-
F3	1,5	0,113	0,113	0,36	0,24	-	0,2
F4	1,5	0,113	0,113	0,360	0,240	0,675	0,260

Le panel de volontaires, constitué de 20 personnes allant de 22 à 31 ans, a été informé de la nature, l'objet, la durée et les risques de l'étude. L'attribution d'une note leur a été demandée pour caractériser l'amertume de la façon suivante :

- 3 ➔ Amertume intense
- 2 ➔ Amertume prononcée
- 1 ➔ Amertume légère
- 0 ➔ Aucune amertume

Quatre formulations contenant la même dose de TBZ (1,5 mg) ont été distribuées de façon aléatoire au panel. Une fois déposé au milieu de la langue, il a été demandé au panel

d'attribuer une note au bout de 10sec, 30sec, 1min, 2min, 3min, 4min et 5min afin de déterminer le temps au bout duquel la sensation d'amertume apparaît et disparaît. En fin de séance, il a été demandé au panel d'établir un classement du film, du plus agréable au moins agréable.

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 **Choix d'un type de CD pour la complexation de la TBZ**

Les Figures 41, 42 et 43 montrent, respectivement, l'évolution de la solubilité de la TBZ en fonction de la concentration en α, β et γ-CD. Les profils de phase pour l'α et la β-CD montrent que la solubilité de la TBZ augmente linéairement en fonction de la concentration en CD, ils sont de type A_L. Les constantes de solubilité de la TBZ en présence de l'α-CD et de la β-CD sont respectivement de 0,036 mM^{-1} et 0,073 mM^{-1}. Le profil de solubilité de la TBZ en présence de γ-CD montre une augmentation de la solubilité suivie d'une chute à partir d'une concentration en CD de 60 mg/mL. Ce comportement est caractéristique du type Bs dans lequel les CI ont précipité.

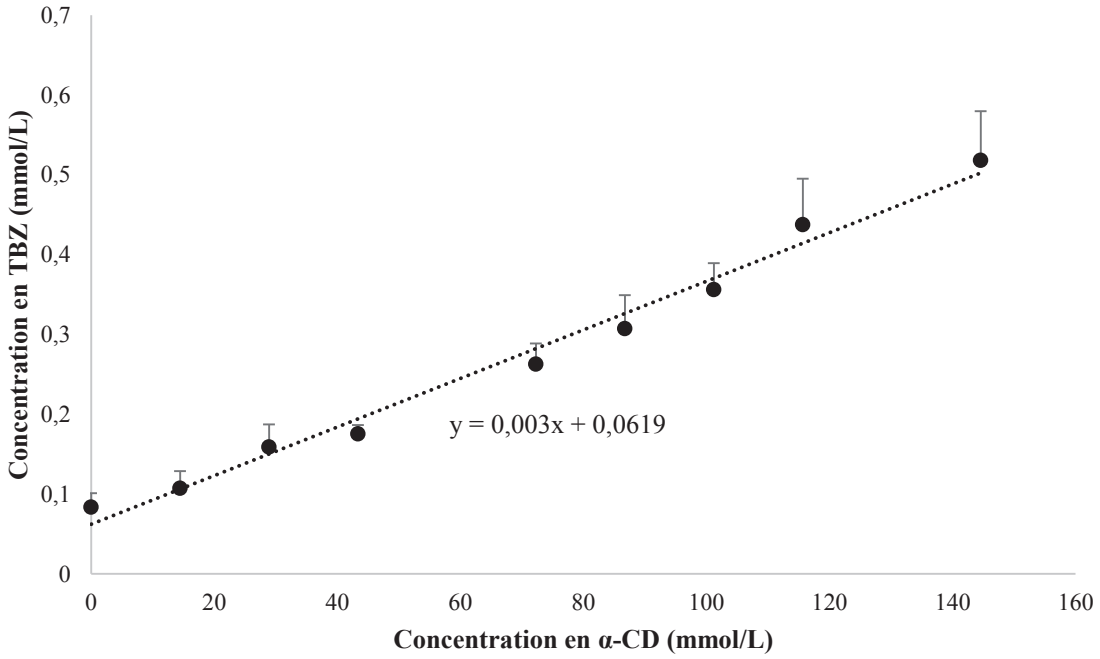


Figure 41 : Evolution de la solubilité de la TBZ en fonction de la concentration en α-CD (n=3).

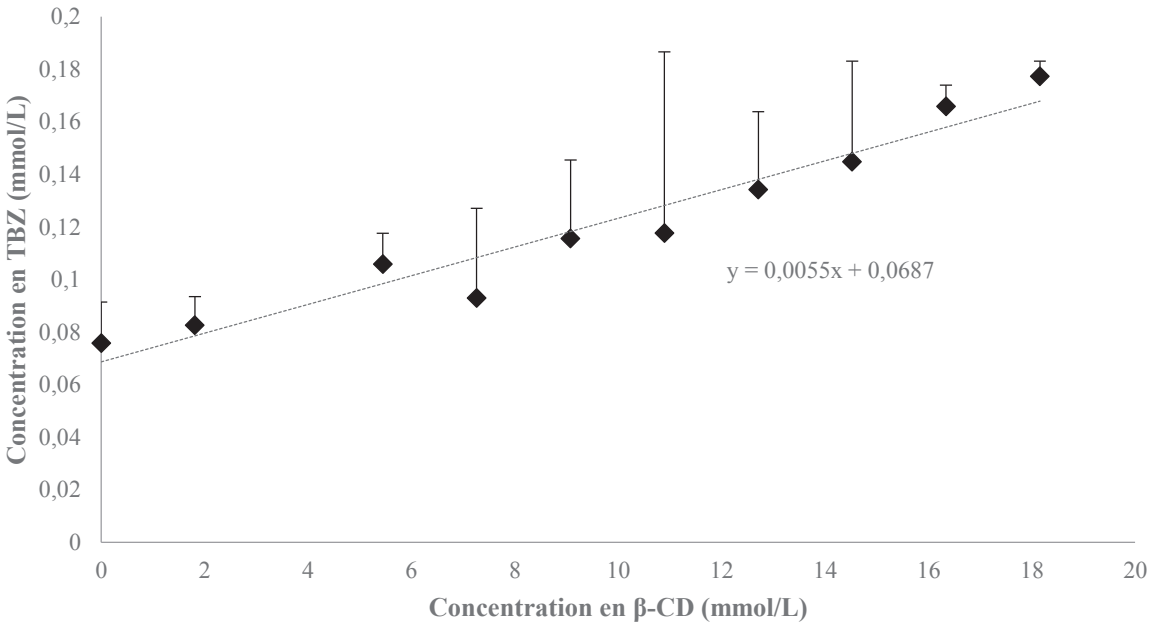


Figure 42 : Evolution de la solubilité de la TBZ en fonction de la concentration en β-CD (n=2).

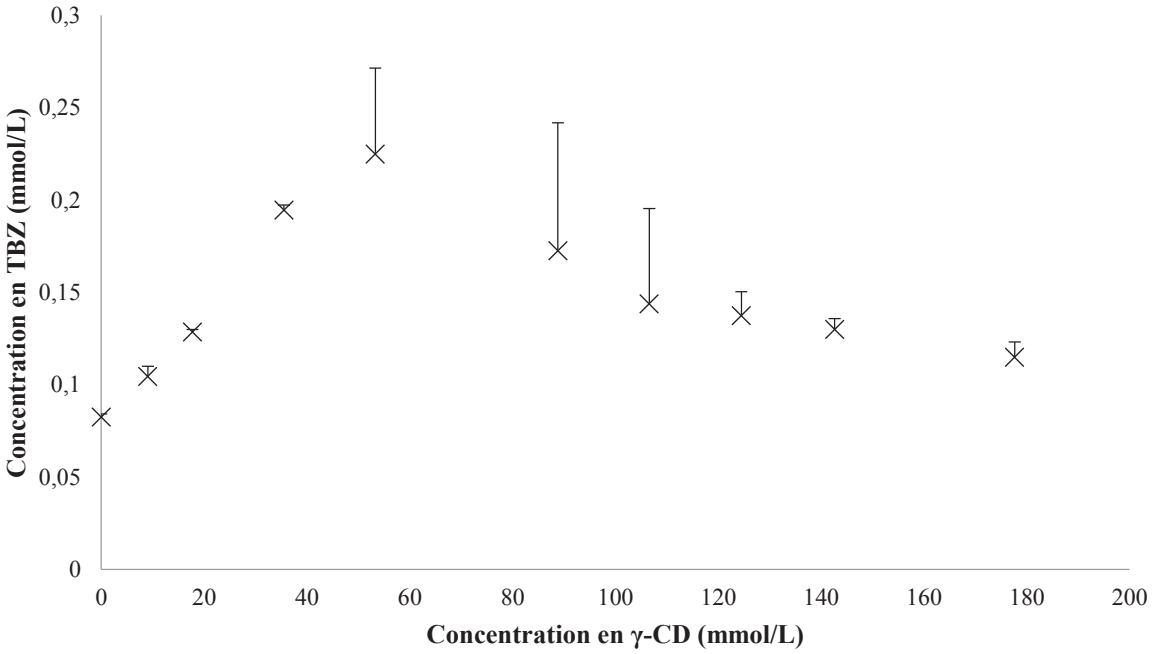


Figure 43 : Evolution de la solubilité de la TBZ en fonction de la concentration en γ-CD (n=2).

Au vu des résultats obtenus lors de l'étude de la solubilité de la TBZ selon la méthode Higuchi-Connors, l'α-CD a été choisie car elle offre une meilleure solubilisation de la TBZ. En effet, la quantité finale de PA dissous atteint 0.52 mmol/L contre 0.18 mmol/L en présence

de la β-CD. La quantité de TBZ solubilisée est plus importante en présence de l'α-CD du fait que cette CD est davantage soluble dans l'eau à 25°C (150 mM) que la β-CD (16 mM). De plus, l'amélioration de la solubilité de la TBZ en présence de l'α-CD peut être expliquée par le fait que ce PA est une petite molécule (M=317,4 g/mol) et que le petit diamètre de la cavité de l'α-CD (4.7-5.3 Å) favorise les interactions entre le PA et la CD.

4.3.2 **Caractérisations des complexes d'inclusion**

Les CI ont été caractérisés à l'état solide (après séchage par atomisation) par différentes techniques (DSC, DRX, FT-IR) et ont été comparés aux composés purs, mélanges physiques et α-CD séchée par atomisation pour mettre en évidence l'existence de différences.

4.3.2.1 *Analyse DSC*

La figure 44 regroupe les thermogrammes obtenus en DSC modulée pour les composés purs (TBZ, acide citrique, α-CD), l'α-CD après séchage par atomisation et les complexes TBZ-α-CD fabriqués à différents ratios. La TBZ est caractérisée par un point de fusion à 127°C. L'α-CD en poudre (cristalline) présente 3 pics endothermiques à 84, 93 et 133°C et une température de transition vitreuse (Tg) à 72°C. Tandis que l'α-CD après avoir été séchée par atomisation présente un pic endothermique à 150°C et une Tg à 128°C. L'acide citrique est caractérisé par deux pics endothermiques à 50 et 130°C. Concernant les CI, aucun pic de fusion correspondant à la TBZ n'est observé. De plus, le seul pic endothermique observé correspond à celui de l'α-CD après séchage. Quel que soit le ratio, les complexes obtenus présentent une forme non cristalline avec un changement d'état. L'apparition d'un pic exothermique est observée à partir du ratio (1 :1). Ces pics sont mal définis pour les ratios (1 :1) et (1 :3), alors que pour le ratio (1 :2) le pic exothermique à 113°C±5 est fin et bien défini. L'apparition d'un pic exothermique témoigne de la formation d'une nouvelle entité chimique différente des matières premières utilisées (Lahiani-Skiba *et al.*, 2007).

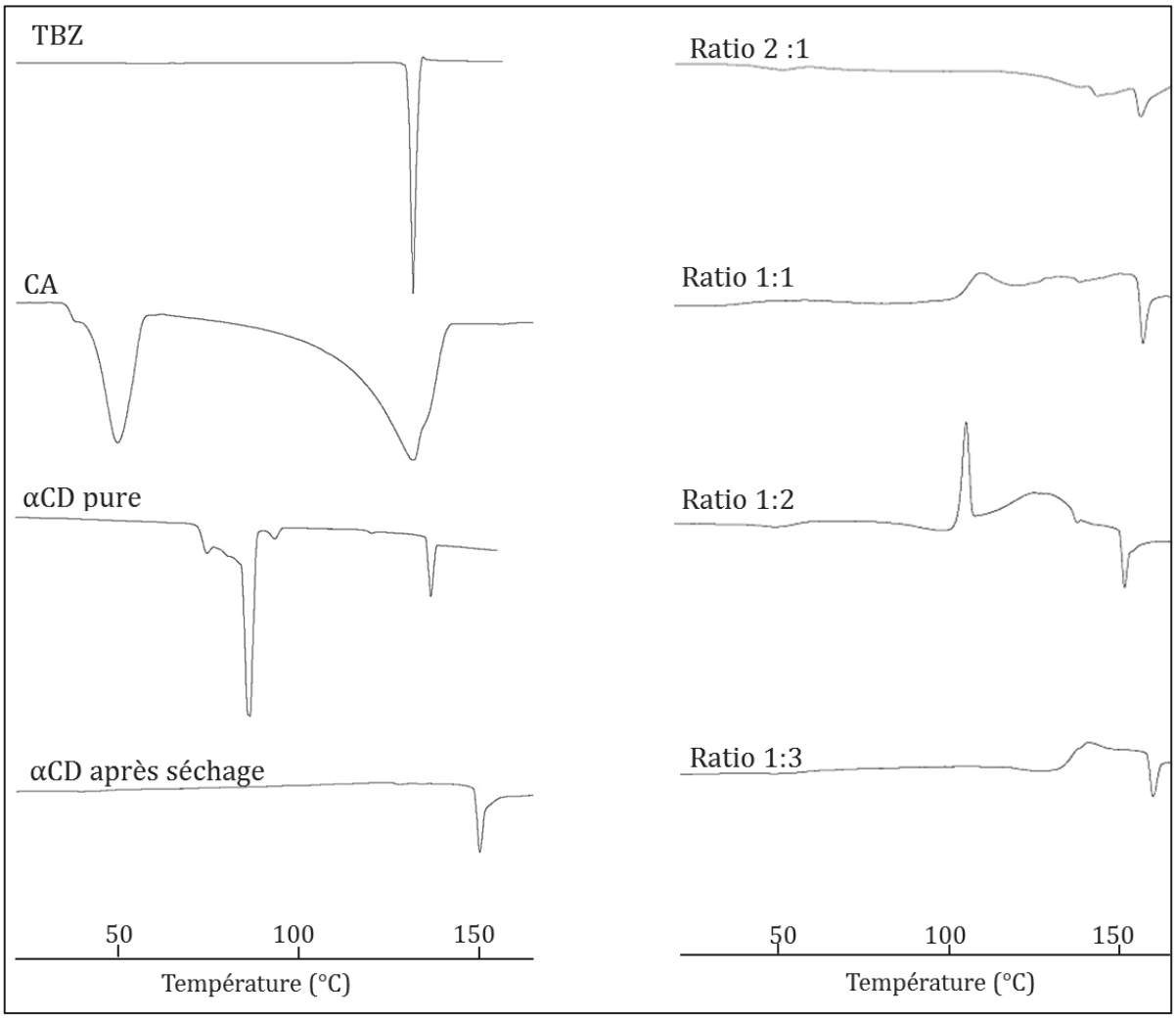


Figure 44 : Courbe DSC des composés purs et des complexes d'inclusion formés à différents ratio TBZ : CD.

4.3.2.2 *Analyse DRX*

La Figure 45 regroupe les diffractogrammes des matières premières (TBZ, acide citrique et α-CD), de l'α-CD après séchage par atomisation et des CI fabriqués à différents ratios. La TBZ pure montre un pic de diffraction intense à 6.4° ainsi que deux pics d'intensité plus faible à 22.3 et 23.1°. L'acide citrique est caractérisé par deux pics de diffraction intenses à 15 et 29.4° et l'α-CD présente plusieurs pics caractéristiques à 12,1 ; 14.2 et 21.6°. Concernant l'α-CD après séchage par atomisation, deux larges pics sont observés reflétant la présence d'un matériau mal cristallisé. De la même façon, pour les CI, les deux pics de diffraction observés sont très larges témoignant ainsi de la présence d'une structure mal cristallisée. Le profil de ces pics est comparable à celui de l'α-CD après séchage par atomisation. La DRX a permis de

mettre en évidence la présence de la TBZ sous forme amorphe dans les CI formés, quel que soit le ratio TBZ-αCD.

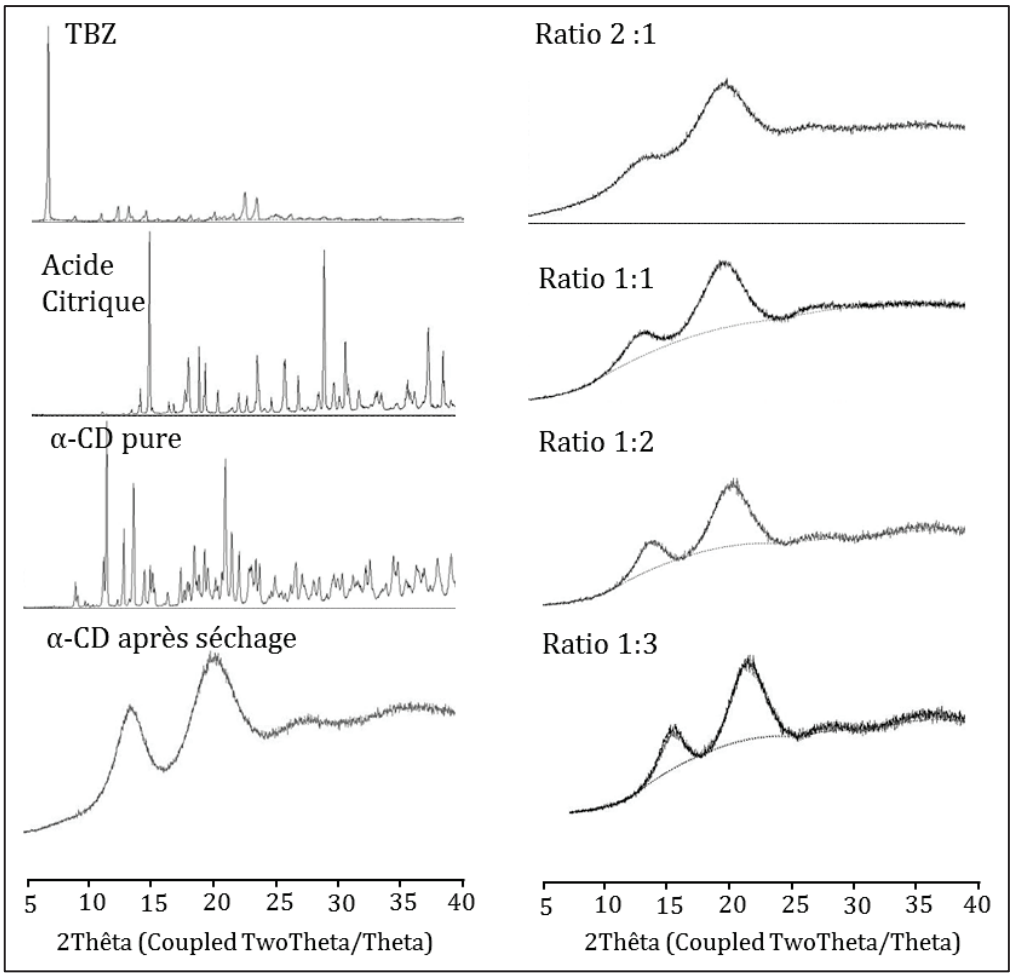


Figure 45 : Diffractogrammes des matières premières (TBZ, acide citrique et α-CD), de l'αCD après séchage par atomisation et des complexes d'inclusion aux différents ratios TBZ : CD.

4.3.2.3 *FT-IR*

L'infra-rouge à transformée de Fourrier est utilisée pour mettre en évidence des interactions entre la TBZ et l'α-CD. Les spectres des composés purs sont disponibles en Annexe 5. Les données des pics caractéristiques de la TBZ et de l'α-CD sont répertoriées dans le Tableau 26 et permettent de déterminer les modifications spectrales entre les composés purs et les CI formés. Le premier changement entre la TBZ pure et les CI s'observe au niveau des vibrations d'élongation du groupement carbonyle. En effet, le pic ν (C=0) se décale vers des longueurs d'ondes plus faibles. Ce décalage avait été observé précédemment dans le mélange TBZ-Acide citrique (1714 cm^{-1}) (Senta-loÿs *et al.*, 2016), et se prononce légèrement dans les CI (1719 cm^{-1}). Cette constatation peut être corrélée au décalage observé pour le groupement OH

de la CD. En effet, l'analyse des complexes d'inclusion à partir du ratio (1 :1) a montré un décalage des vibrations d'élongation OH vers des longueurs d'ondes plus élevées (3336 cm^{-1}) par rapport à l'α-CD (3258cm^{-1}). Cette observation témoigne de la formation de liaisons hydrogène entre les fonctions OH de la CD et le groupement carbonyle de la TBZ. Ensuite, dans les spectres des CI aux ratios (1 :2) et (1 :3), on observe la disparition des bandes de vibrations d'élongation des groupements C-N et C-O-C. Or, ces bandes étaient présentes dans le mélange physique au ratio (1 :2), ainsi, la disparition dans le CI (1 :2) peut attester de l'inclusion de la TBZ dans la CD.

Tableau 26 : Pics caractéristiques de la TBZ et de l'α-CD.

Groupements caractéristiques de la TBZ				
	ν [C=O] (cm^{-1})	**ν [C=C] (cm^{-1})**	**ν [C-N] (cm^{-1})**	**ν [C-O-C] (cm^{-1})**
TBZ	1697; 1257	1605; 1514; 1462	1226	1107
TBZ + CA	1714; 1261	1612; 1518; 1465	1224	1113
MP (2 :1)	1698 ; 1257	1610 ; 1514 ; 1462	1226	1107
MP (1 :1)	1698 ; 1257	1610; 1514; 1462	1226	1107
MP (1 :2)	1697 ; 1257	1514; 1462	1226	1107
MP (1 :3)	1697 ; 1258	1515	-	-
CI (2:1)	1719; 1262	1612; 1519	1228	1120
CI (1:1)	1719; 1262	1612; 1519	1227	-
CI (1:2)	1719,1263	1519	-	-
CI (1:3)	1718	1519	-	-
Groupements caractéristiques de l'α-CD				
	ν [O-H] (cm^{-1})	**ν [CH2] (cm^{-1})**		**ν [C-O] (cm^{-1})**
α-CD	3258	2926	1640	1154; 1029
MP (2 :1)	3259	2919	-	1157 ; 1027
MP (1 :1)	3259	2920	1640	1156 ; 1026
MP (1 :2)	3258	2920	1640	1155 ; 1024
MP (1 :3)	3258	2920	1640	1150 ; 1025
CI (2:1)	3348	2935	-	1150; 1027
CI (1:1)	3336	2930	-	1150; 1027
CI (1:2)	3338	2929	-	1150; 1026
CI (1:3)	3338	2926	-	1150; 1025

4.3.2.4 *MEB*

La microscopie électronique à balayage a permis de visualiser la structure des composés purs, de l'α-CD après séchage par atomisation et des CI au ratio (1 :2) (Figure 46). Les matières

premières se trouvent sous forme de cristaux d'environ 50µm (α-CD et TBZ) tandis que l'α-CD se trouve sous forme de sphères poreuses. Enfin, le CI (1 :2) présente une morphologie sphérique avec des facettes. Cette structure montre l'apparition d'un nouveau composé à base de α-CD et TBZ, ce qui ne peut être qu'un CI.

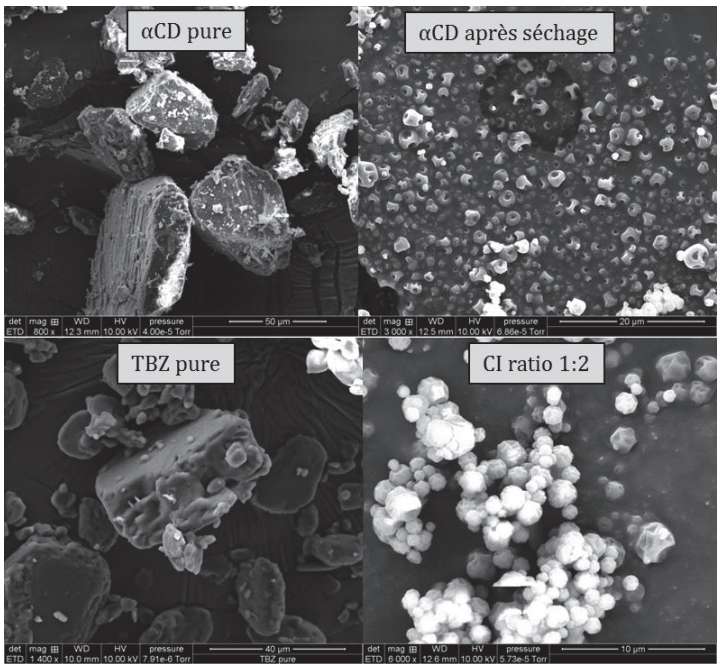


Figure 46 : Images en MEB de la TBZ pure, l'αCD pure et après séchage par atomisation et le CI (1 :2).

4.3.2.5 *Conclusion sur la caractérisation des CI*

En DRX, les diffractogrammes des complexes montrent une allure similaire à l'α-CD obtenue après séchage par atomisation. De plus, aucun pic correspondant à la TBZ n'est observé, ce qui témoigne d'une bonne inclusion du PA dans l'α-CD. Les résultats obtenus en DSC montrent que les CI formés avec un ratio (1 : 2) (TBZ : CD) présentent un pic exothermique. Cette observation témoigne de la formation d'une nouvelle entité chimique laissant penser qu'à ce ratio précis la TBZ et l'α-CD sont incorporées dans les quantités optimales. La FT-IR a mis en évidence l'existence d'interactions entre la TBZ et les α-CD par la formation de liaisons hydrogène entre les groupements carbonyle (TBZ) et OH (α-CD). La disparition des pics caractéristiques des ν [C-N] et ν[C-O-C] dans les CI (1 :2) montrent que la quantité de CD est suffisante pour créer une barrière chimique autour de la TBZ. Enfin, la structure sphérique avec des facettes des CI à un ratio (1 :2) témoignent de la formation d'une seule entité.

4.3.3 **Caractérisations des ODF contenant les CI au ratio (1 :2).**

Les ODF contiennent des CI au ratio (1 : 2) (TBZ : CD). Dans les films d'HPMC et PVP, les CI représentent respectivement 27.6% et 30.1% de la masse totale du film. Dans la suite de l'étude, les ODF dans lesquels les CI ont été incorporés sous forme de solution sont notés HPMC(ou PVP)-ODF + CI (1) pour le procédé de fabrication n°1 ; tandis que dans le cas où les CI ont été incorporés à l'état sec, les films sont notés HPMC (ou PVP)-ODF + CI (2) pour le procédé de fabrication n°2).

4.3.3.1 *DSC*

Comme nous l'avions vu précédemment, la TBZ est à l'état amorphe dans les CI (1 :2). Les thermogrammes des films à base d'HMPC et PVP non chargés et chargés en CI sont présentés dans la Figure 47.

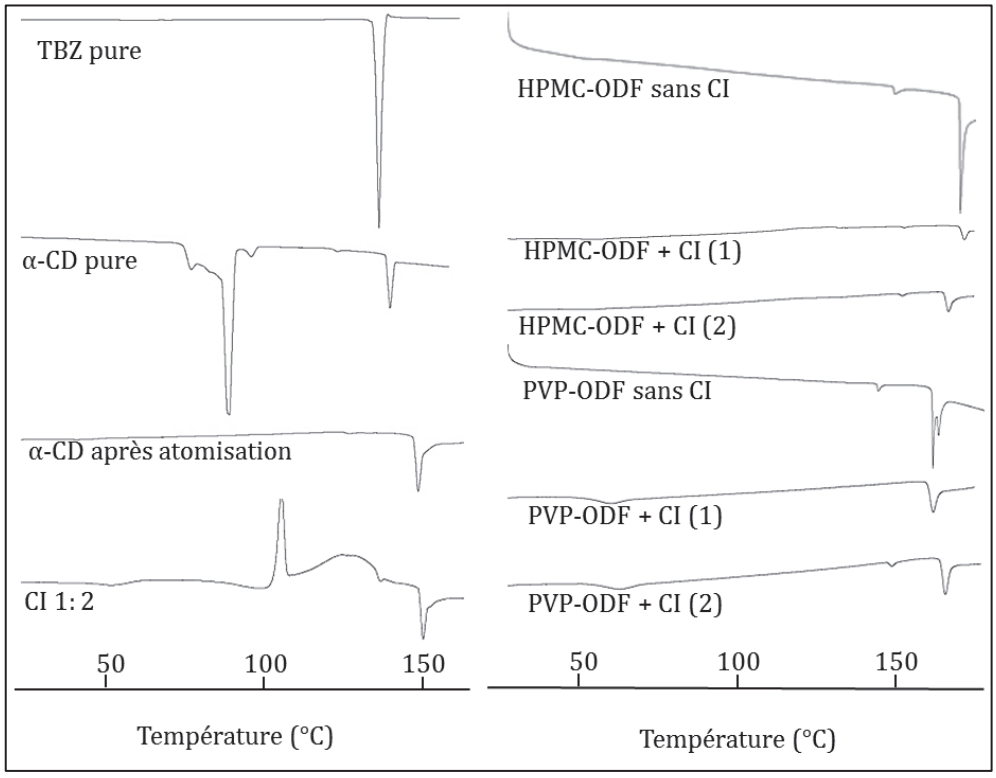


Figure 47 : Thermogrammes des composés purs, du complexe 1 :2, des supports filmogènes non chargés et chargés en CI incorporés sous forme de solution (1) et à l'état sec (2).

Les films blancs sont caractérisés par des Tg à 142,5 °C (HPMC) et à 136°C (PVP) et des températures de dégradation à 164°C (HPMC) et 153°C (PVP). Pour les films chargés en CI, l'absence des pics de fusion de la TBZ ainsi que de l'α-CD est observée témoignant d'un état

amorphe. Les CI n'ont pas précipités lors de leur incorporation dans les ODF et aucune recristallisation n'est observée à T=0.

4.3.3.2 *DRX*

Les diffractogrammes du CI (1 :2), des films blancs, des films chargés avec la TBZ sous forme de SD (2ème génération) et avec les CI (3ème génération) sont comparés afin de caractériser le profil cristallin des CI contenus dans les films d'HPMC (Figure 48) et PVP (Figure 49). Ainsi, les films d'HPMC blancs (HPMC-ODF) et avec TBZ sous forme de SD (HPMC-ODF + TBZ (SD)), sont caractérisés par une structure totalement amorphe. Pour les films contenant les CI (HPMC-ODF + CI (1) et (2)), plusieurs pics mal définis sont observables entre 10 et 25°. Cela témoigne de la présence d'un système mal cristallisé. Cependant, le pic de diffraction intense de la TBZ n'est pas observé et la position des pics ne correspond pas à ceux du CI (1 : 2). La TBZ est donc toujours présente à l'état amorphe (état obtenu par la présence d'acide citrique) mais les CI semblent plus organisés que ceux initialement obtenus. Enfin, les profils cristallins des films contenant les CI sont les mêmes qu'ils soient incorporés à l'état solide ou sous forme de solution.

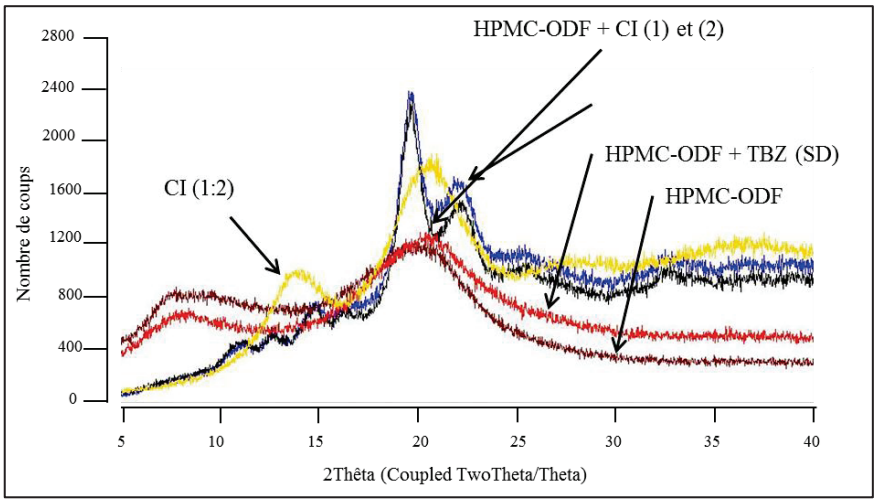


Figure 48 : Observation de la structure cristalline par DRX des ODF contenant les CI avec les procédés (1) et (2), en comparaison avec HPMC-ODF (ODF blanc), HPMC-ODF+TBZ sans ajout de CD et le CI (1 :2).

Concernant les formulations réalisées à l'aide de la PVP, le film blanc (PVP-ODF) est caractérisé par une structure amorphe ; quant au film contenant de la TBZ (PVP-ODF + TBZ) initialement sous forme de SD, l'apparition d'un pic cristallin correspondant à la TBZ est déjà visible. Les profils des CI incorporés dans les films à l'état solide et en solution sont

cependant différents. Le diffractogramme contenant les CI incorporés en solution est similaire à celui du complexe (1 :2), témoignant de la conservation de la structure des complexes lors de la fabrication. En revanche, celui des CI incorporés selon le procédé 2, présente le profil d'un matériel amorphe.

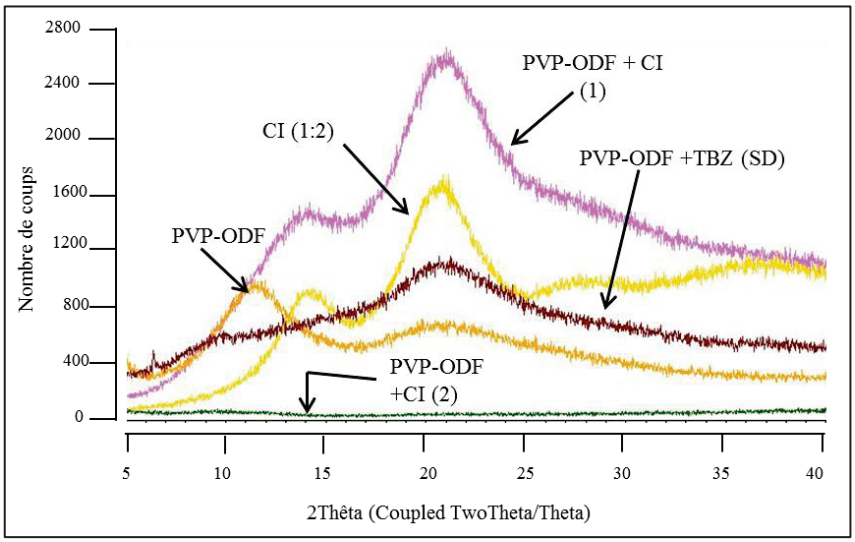


Figure 49 : Observation de la structure cristalline par DRX des ODF contenant les CI avec les procédés (1) et (2), en comparaison avec PVP-ODF (film blanc), PVP-ODF + TBZ sans ajout de CD et le CI (1 : 2).

4.3.3.3 *Microscopie polarisante*

En microscopie polarisante, aucun cristal n'a été mis en évidence dans les films contenant les CI à T=0, quel que soit le procédé de fabrication (Figure 50).

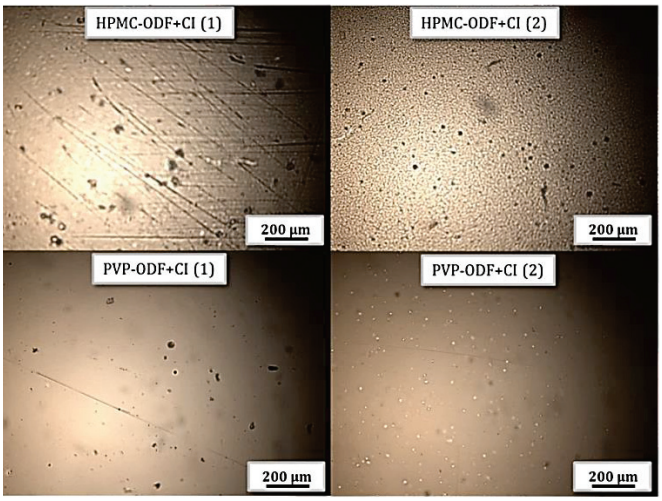


Figure 50 : Images des films contenant les complexes d'inclusion.

4.3.3.4 *FT-IR*

Dans le Tableau 27, les pics caractéristiques des groupements de la TBZ et de l'α-CD ont été recensés. L'analyse FT-IR des ODF montre que le décalage des pics caractéristiques ν(C=0) de la TBZ est toujours présent, ainsi que la disparition des pics caractéristiques des vibrations d'élongation des groupements C-N et C-O-C, sauf pour le film constitué de PVP dans lequel les CI ont été incorporés à l'état solide. Concernant les groupements caractéristiques de l'α-CD, le décalage des pics correspondant aux vibrations d'élongation des alcools est toujours présent, hormis dans le film constitué d'HPMC dans lequel les CI avaient été incorporés en solution. Cette observation peut indiquer la perte des interactions de type liaisons hydrogène entre l'α-CD et la TBZ.

Tableau 27 : Groupements caractéristiques de la TBZ et de l'α-CD dans les ODF.

Groupements caractéristiques de la TBZ				
	ν [C=O] (cm^{-1})	**ν [C=C] (cm^{-1})**	**ν [C-N] (cm^{-1})**	**ν [C-O-C] (cm^{-1})**
TBZ	1697; 1257	1605; 1514; 1462	1226	1107
HPMC-ODF sans CI	1726; 1261	1605; 1518; 1450	-	1105
HPMC-ODF + CI (1)	1724	1463	-	-
HPMC-ODF + CI (2)	1724	1457	-	-
PVP-ODF sans CI	1726; 1256	1514, 1462	-	1114
PVP-ODF + CI (1)	-	1461	1228	-
PVP-ODF + CI (2)	-	1461	-	-
Groupements caractéristiques de l'α-CD				
	ν [O-H] (cm^{-1})	**ν [CH2] (cm^{-1})**		**ν [C-O] (cm^{-1})**
α-CD	3258	2926	1640	1154; 1029
HPMC-ODF + CI (1)	3353	2927	-	-
HPMC-ODF + CI (2)	3340	2925	-	1150
PVP-ODF + CI (1)	3339	2924	-	1150; 1030
PVP-ODF + CI (2)	3331	2923	-	1150; 1030

4.3.3.5 *Etude de la libération du PA*

Dans le chapitre précédent, la libération de la TBZ contenue dans les ODF sous forme de SD (2ème génération) a été étudiée. La quantité de TBZ libérée était d'environ 85% dans le milieu salivaire pH 6,8. D'après la Figure 51, le profil de dissolution des CI montre une libération accrue de la TBZ (80%), maintenue durant 5 minutes. Cependant, la quantité de TBZ solubilisée tend à diminuer dans le milieu de dissolution après 5 minutes, pour atteindre ~63% au bout d'une heure. Lorsque la TBZ est incorporée dans les ODF sous forme de CI, une augmentation de la dissolution de la TBZ peut être observée dans le milieu salivaire.

Ainsi, le taux de libération de la TBZ lorsque celle-ci est incorporée en CI dans la matrice d'HPMC et de PVP est respectivement de 93 et 98,5%. Néanmoins, les différences ne sont pas significatives ($p>0.05$) entre les formulations. Le profil de libération ne change pas quelle que soit la façon d'incorporer les CI dans la matrice (à l'état sec ou en solution).

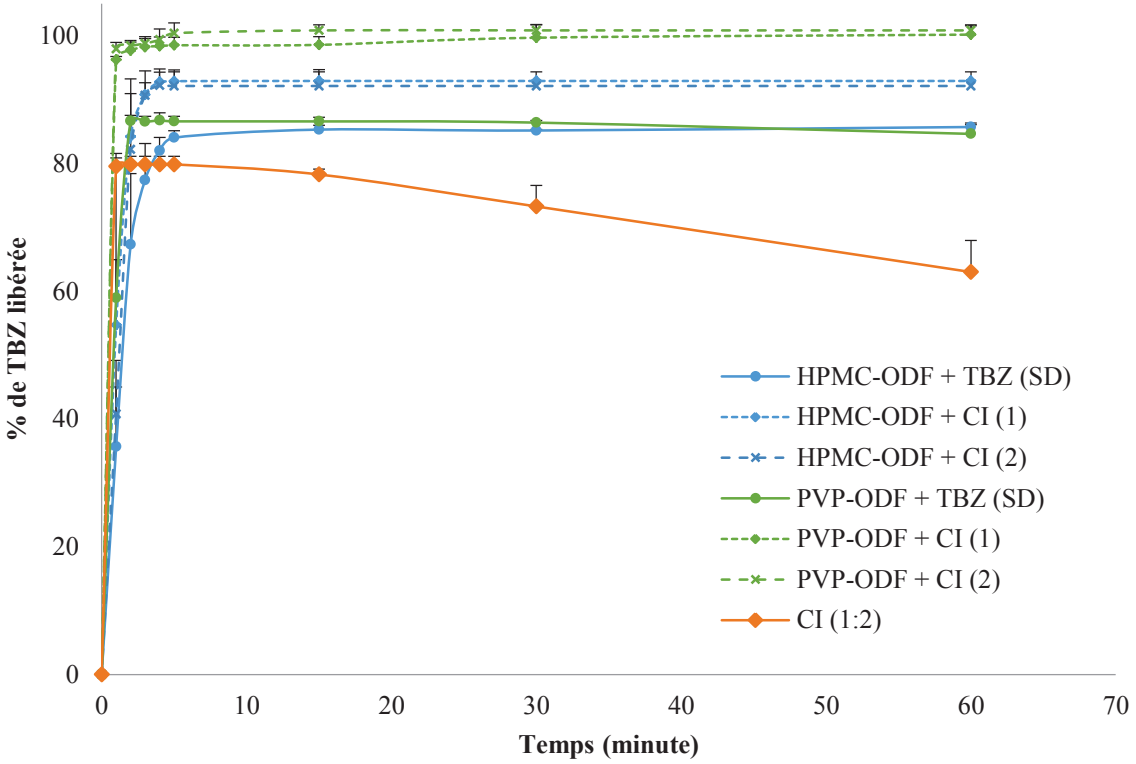


Figure 51 : Profil de libération de la TBZ incorporée dans les films sans CI et avec CI secs ou en solution.

4.3.3.6 *Conclusion sur l'inclusion des CI dans les ODF*

Dans cette partie, la caractérisation des films contenant des CI a montré que la TBZ se trouvait à l'état amorphe (DSC, DRX et microscopie polarisante). Concernant les films à base d'HPMC, les observations faites en DRX laissent penser que les CI sont présents dans un état mieux organisé que ceux obtenus initialement. A l'inverse, les CI contenus dans les films à base de PVP ne semblent pas s'être réorganisés dans cette matrice. Les analyses FT-IR montrent que les interactions entre le groupement carbonyle de la TBZ et la fonction alcool des CD ont été conservées, hormis dans le film constitué d'HPMC contenant les CI incorporés en solution (HPMC-ODF + CI (1)). Lors des essais de dissolution, l'amélioration de la dissolution de la TBZ est observée lorsque celle-ci est en présence de CD mais les différences ne sont pas significatives ($p>0.05$). Les profils obtenus en DRX, la présence d'interactions

entre la TBZ et les α-CD et l'amélioration de la dissolution de la TBZ montrent que les CD ont changé les caractéristiques du système ternaire précédemment étudié.

4.3.4 **Etude physicochimique et organoleptique**

4.3.4.1 *Contrôle de la stabilité du PA*

4.3.4.1.1 Analyse DSC des ODF après 1 mois de conservation

Les thermogrammes obtenus en DSC pour les films contenant les complexes d'inclusion, après 1 mois de stockage (Figure 52), ne présentent pas de pics endothermiques caractéristiques de la fusion de la TBZ et des α-CD. Les profils DSC obtenus sont les mêmes que ceux observés à T=0 témoignant de la stabilité des formulations.

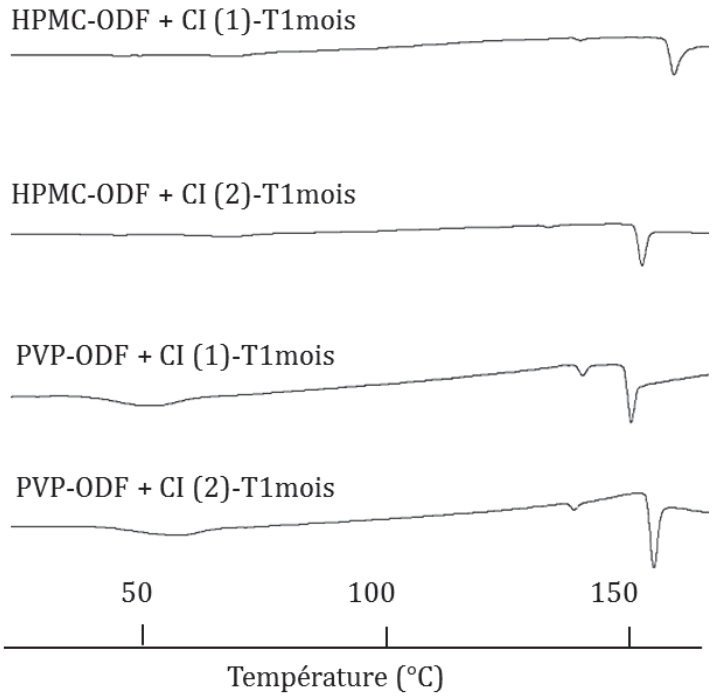


Figure 52 : Thermogrammes après 1 mois de stockage des ODF constitués d'HPMC et PVP contenant les CI incorporés sous forme de solution (1) ou à l'état solide après séchage par atomisation (2).

4.3.4.1.2 Analyse DRX après 1 mois de conservation

La structure cristalline des films orodispersibles après 1 mois de stabilité est observée Figures 53 et 54. Alors que le film d'HPMC contenant la TBZ sous forme de SD reste amorphe, les films contenant des CI présentent des pics de diffraction caractéristiques d'une structure cristalline (Figure 53). En particulier le film dans lequel les CI ont été incorporés à l'état

solide. Afin de savoir si ces pics correspondent à la TBZ et/ou l'α-CD pures, des DIF (Distance and Intensity File) ont été créés servant de référence pour ces deux composés. La comparaison entre le diffractogramme du film contenant les CI incorporés à l'état solide dans la matrice de polymère et les matières premières (Annexe 6), montre qu'il ne s'agit pas de la recristallisation de la TBZ. En effet, le pic de diffraction intense à 6.4° n'est pas observé. Le pic le plus intense observé dans ce film se trouve à 19.9°, il pourrait correspondre au pic de diffraction intense de l'α-CD se trouvant à 21.6° avec un décalage vers de plus petits angles. Si les pics observés dans le film sont légèrement décalés vers de plus petits angles, les pics à 11 et 13° pourraient être corrélés aux pics de diffraction de l'α-CD se trouvant à 12.1° et 14.2°. Ainsi, les CD auraient tendance à se réorganiser dans la matrice d'HPMC.

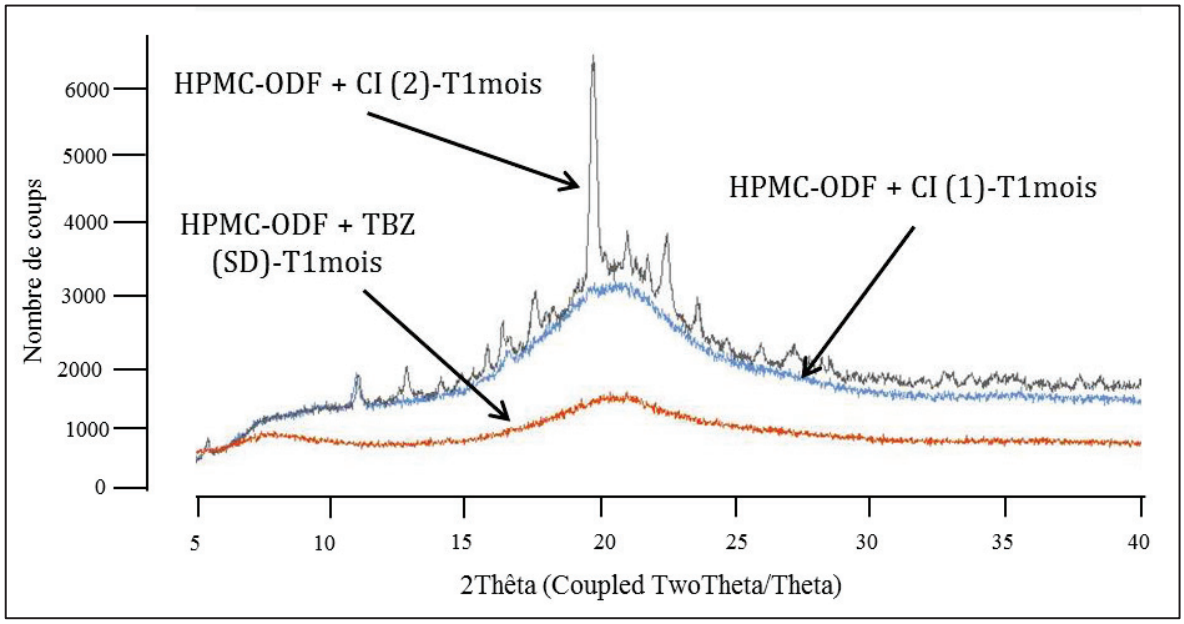


Figure 53 : Observation DRX de la structure cristalline des films orodispersibles à base d'HPMC après 1 mois de stabilité.

A l'inverse, dans les thermogrammes correspondant aux films de PVP contenant les complexes d'inclusion, aucun pic de diffraction n'est observé, ce qui témoigne de la présence d'un système totalement amorphe (Figure 54). Or, la recristallisation de la TBZ sous forme de SD de 2ème génération avait été observée très tôt dans les films de PVP. Dans ce cas, la fabrication de CI a permis d'augmenter la stabilité de la TBZ sous forme amorphe. De plus, les CD semblent devenir totalement amorphes au cours du temps.

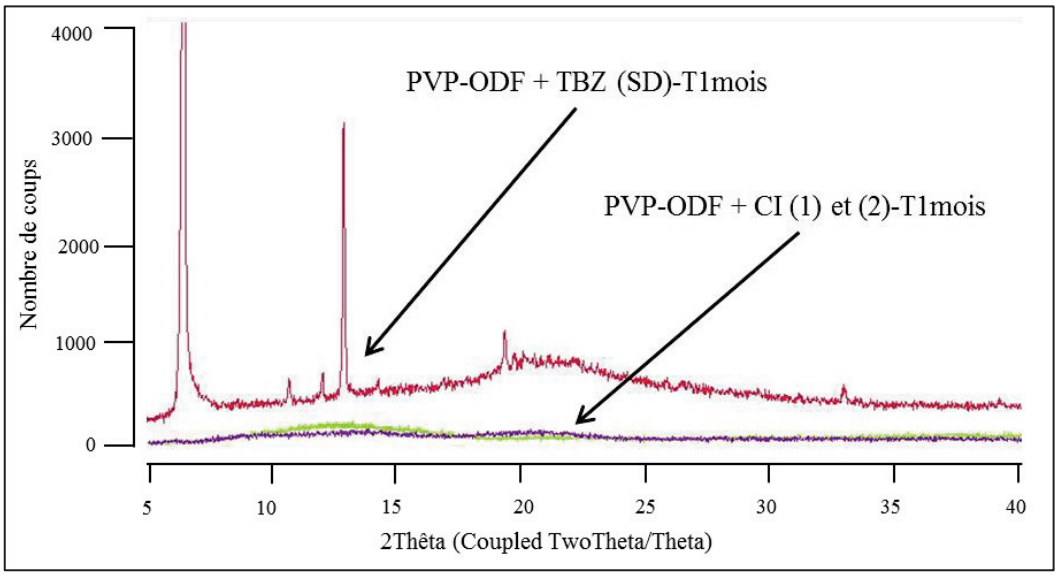


Figure 54 : Observation DRX de la structure cristalline des films orodispersibles à base de PVP après 1 mois de stabilité.

4.3.4.1.3 Microscopie polarisante

La microscopie polarisante a mis en évidence l'émergence de cristaux dans les films constitués d'HPMC (Figure 55). Selon les résultats obtenus précédemment en DRX, ces cristaux doivent correspondre à l'α-CD cristallisée ou à la précipitation des CI. A contrario, dans les ODF composés de PVP, la présence de cristaux n'a pas été observée dans les deux formules.

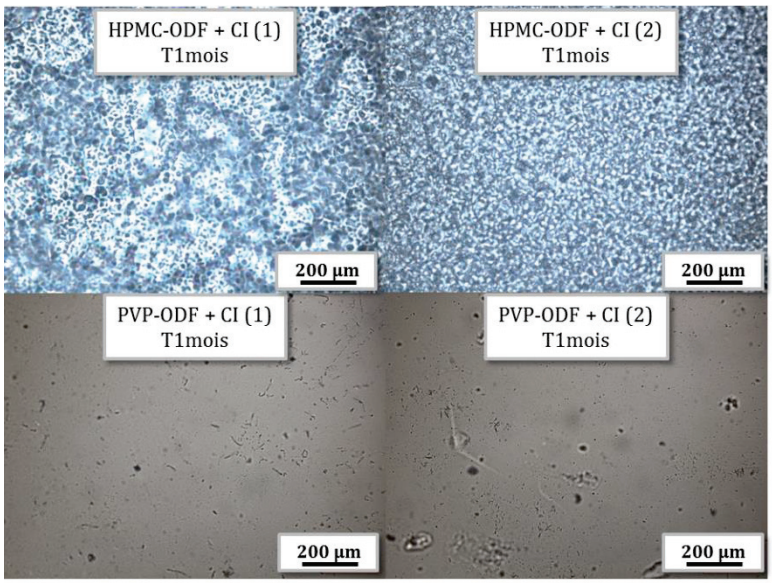


Figure 55 : Images MEB des ODF + CI après 1 mois de stabilité.

4.3.4.1.4 FT-IR

Le Tableau 28 recense les pics caractéristiques de la TBZ et l'α-CD présents dans les ODF après 1 mois de stockage issus des spectres donnés en Annexe 7. Par rapport aux résultats obtenus à T=0, des différences sont observées dans les films constitués d'HPMC. En effet, dans le film d'HPMC dans lequel les CI ont été incorporés en solution (procédé 1), l'apparition du pic caractéristique de l'α-CD poudre à 1640 cm^{-1} est observée témoignant de sa recristallisation et confirmant le résultat obtenu en DRX. Pour le film d'HPMC contenant les CI incorporés à l'état solide (procédé 2), le pic caractéristique des alcools est moins décalé qu'à l'origine indiquant la perte des interactions TBZ-αCD. Cette observation peut être corrélée aux résultats obtenus en DRX et en microscopie polarisante qui montrent la présence de cristaux dans cette formulation. Dans les films à base de PVP, aucun changement n'est observé par rapport à T=0, indiquant le maintien des interactions et de la structure initiale du système.

Tableau 28 : Groupements caractéristiques de la TBZ et de l'αCD dans les ODF + CI après 1 mois de stockage.

Groupements caractéristiques de la TBZ				
	ν [C=O] (cm^{-1})	**ν [C=C] (cm^{-1})**	**ν [C-N] (cm^{-1})**	**ν [C-O-C] (cm^{-1})**
TBZ	1697; 1257	1605; 1514; 1462	1226	1107
HPMC-ODF + TBZ (DS) - T1mois	1726; 1261	1514	-	1107
HPMC-ODF + CI (1) - T1mois	1724	-	-	-
HPMC-ODF + CI (2) - T1mois	1725	-	-	-
PVP-ODF +TBZ (DS) - T1mois	1697; 1261	1512; 1436	1224	1107
PVP-ODF + CI (1) - T1mois	-	1461	1228	-
PVP-ODF + CI (2) - T1mois	-	1462	-	-
Groupements caractéristiques de l'α-CD				
	ν [O-H] (cm^{-1})	**ν [CH2] (cm^{-1})**		**ν [C-O] (cm^{-1})**
A-CD	3258	2926	1640	1154; 1029
HPMC-ODF + CI (1) - T1mois	**3351**	2926	**1647**	-
HPMC-ODF + CI (2) - T1mois	**3348**	2926	-	-
PVP-ODF + CI (1) - T1mois	3338	2924	-	1150; 1030
PVP-ODF + CI (2) - T1mois	3331	2925	-	1150; 1030

4.3.4.1.5 Etude de la libération du PA

Les profils de libération de la TBZ complexée ou non et incorporée dans les films après 1 mois de conservation, sont présentés en Figure 56. Comme décrit dans le chapitre précédent, la TBZ contenue dans le film d'HPMC sous forme de SD de 2ème génération présente un profil de dissolution similaire au T=0 ; tandis que dans le film constitué de PVP, une diminution de la quantité de PA libéré est observée (perte de 25%) due à sa recristallisation dans les films de PVP. A T=0, le pourcentage de libération total de TBZ complexée contenue dans les films d'HPMC et PVP, est respectivement de 93 et 98,5%. Après 1 mois de conservation l'augmentation du pourcentage de PA libéré est observée, quel que soit la méthode d'incorporation des CI. En effet, la quantité totale de TBZ libérée au bout de 30 minutes est d'environ 100% avec le film d'HPMC et 106% avec le film de PVP. Cependant, cette augmentation observée après 1 mois de conservation n'est pas significative ($p>0,05$). Néanmoins, le taux de libération de la TBZ n'a pas chuté dans le temps montrant ainsi que la TBZ complexée ne s'est pas réorganisée en cristaux. En d'autre terme, l'utilisation de la CD a permis d'améliorer la stabilité de la TBZ sous forme amorphe notamment pour les ODF à base de PVP en diminuant la mobilité moléculaire du PA.

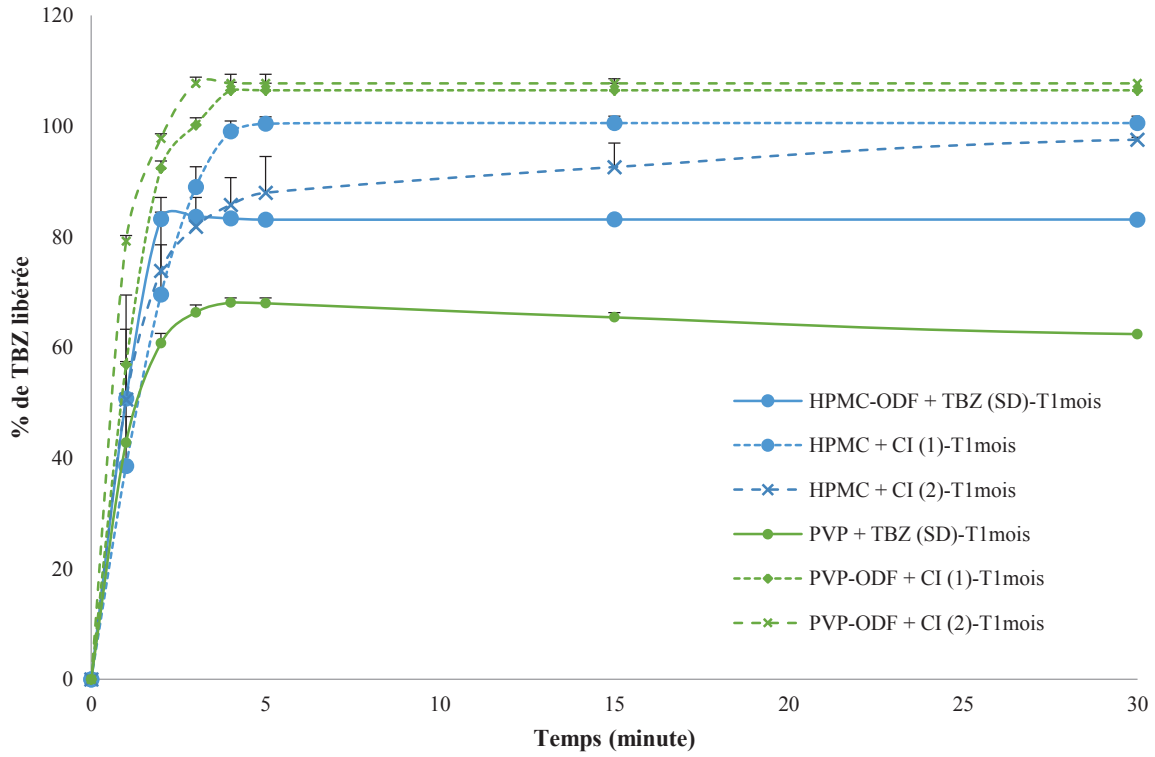


Figure 56 : Profil de libération de la TBZ incorporée dans les films sans CI et avec CI secs ou en solution après 1 mois de stockage.

4.3.4.2 *Masquage du goût*

Les notes attribuées par le panel sont disponibles dans l'Annexe 8. La moyenne des notes a été calculée pour chaque temps de mesure (Figure 57) afin d'observer une tendance quant au goût ressenti. Les notes obtenues montrent une variabilité interindividuelle importante, c'est pourquoi les écarts types n'ont pas été intégrés à la Figure, mais ils pourront être consultés dans l'annexe 8.

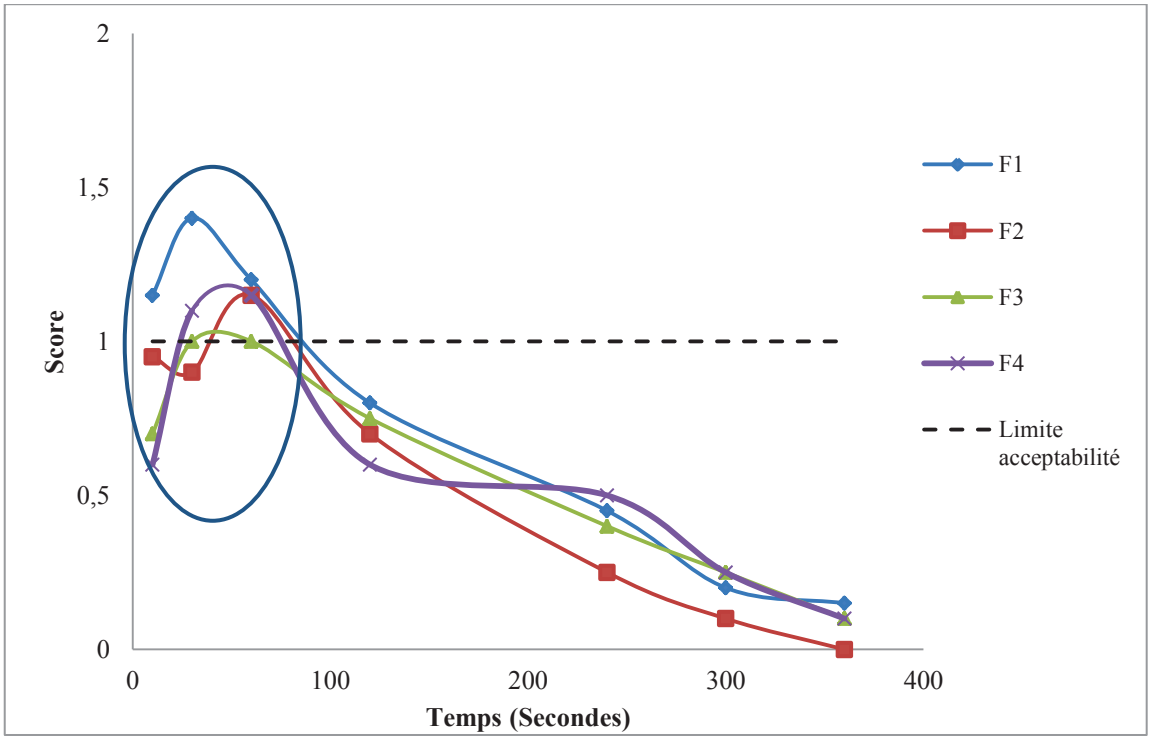


Figure 57 : Moyenne des notes attribuées (n=20) par le panel pour chaque formulation en fonction du temps.

D'une façon générale, la sensation d'amertume apparaît dès les premières secondes témoignant de la libération rapide de la TBZ dans la cavité buccale. Une amertume légère à prononcée est alors ressentie durant la première minute et l'atténuation du goût est ressentie à partir de 2 minutes. Cela peut être lié au temps de désintégration de l'ODF. En effet celui-ci est totalement désintégré lors de la 1ère minute. Le test montre que dans ce laps de temps, la sensation d'amertume est à son maximum, que la TBZ soit ou non en présence de CD. Ensuite, de 2 à 5 minutes, l'intensité diminue progressivement pour atteindre un ressenti de l'amertume très faible à nul. L'amertume générée par la TBZ ne persiste pas dans le temps et d'une façon générale, le panel s'attendait à une sensation amère beaucoup plus prononcée.

Le Tableau 29 indique les scores attribués par les volontaires pour chaque formulation. La formule F1, dans laquelle aucun agent de masquage n'a été ajouté, se trouve majoritairement en dernière position (9 personnes sur 20). La formule F3, dans laquelle un arôme fruit des bois a été ajouté, peut être placée en 3ème position. La formule F2 (avec CD) peut être placée en 2ème position et la F4 (avec CD et arôme) en 1ère position avec 9 personnes sur 20 ayant préférées cette formule. Malgré la variabilité des notes obtenues, le classement des formulations peut être le suivant : F4>F2>F3>F1. Les CD permettent donc de masquer le goût de la TBZ. L'ajout d'arôme à la formule contenant des CD (F4), n'apporte qu'une légère amélioration pour le score 0 et pas du tout pour le score 1 par rapport à F2.

Tableau 29 : Scores attribués pour chaque formulation.

	F1	F2	F3	F4
Score 0	2	7	2	9
Score 1	4	6	8	2
Score 2	5	4	7	4
Score 3	9	3	3	5

Cette haute variabilité dans les notes attribuées reflète l'importance d'avoir un panel formé. En effet, les personnes ayant participé au panel étaient novices dans ce domaine. Le protocole du test aurait aussi pu être amélioré en effectuant, par exemple, un test blanc (TBZ en solution) afin que les participants aient une première idée et sache à quoi s'attendre en terme de ressenti de l'amertume. De plus, ces résultats hétérogènes peuvent aussi être expliqués par les différences interindividuelles. Ainsi, pour pouvoir étudier des résultats portant sur une appréciation hautement subjective, un très grand nombre de personne est nécessaire pour que cela soit significatif.

4.3.4.3 *Conclusion étude physicochimique et organoleptique*

L'incorporation de complexes d'inclusion TBZ-CD a été effectuée dans le but d'améliorer la stabilité et les propriétés organoleptiques des ODF. Les résultats ont montré que la TBZ n'avait pas recristallisé après 1 mois de conservation dans le film de PVP et que le profil de dissolution de la TBZ avait été maintenu. Ainsi, l'ajout de CD a permis dans ce cas d'augmenter la stabilité de la TBZ dans cette matrice. Cependant, dans les films composés d'HPMC, une cristallisation des CD a été observée montrant que ces dernières ne sont pas stables dans cette matrice. Néanmoins, la TBZ ne semble pas avoir recristallisée et le profil de dissolution initiale a bien été retrouvé après 1 mois de conservation. La TBZ dans les films à

base d'HPMC reste donc stable. Cela était déjà le cas pour les systèmes ternaires TBZ-Acide citrique-HPMC donc cette stabilité n'est pas liée à la présence des CD. Enfin, l'incorporation des CD dans le système a montré des résultats encourageants pour masquer le goût amer de la TBZ.

4.4 Conclusion

Dans cette partie, les CD ont été incorporées dans les ODF sous forme de complexes d'inclusion avec la TBZ dans l'optique d'améliorer la stabilité des SD, décrites dans le chapitre précédent, et de limiter les problèmes de recristallisation éventuels de la TBZ dans les films. De plus, les CD présentent aussi des propriétés de masquage de goût largement employé en aromatisation des formes pharmaceutiques. Pour mener à bien ce projet, une étude de solubilité de la TBZ en présence de CD à différentes concentrations a été conduite montrant des profils de solubilité de type AL en présence de l'α et de la β-CD et de type Bs en présence de la γ-CD. La préparation de CI secs par atomisation, à différents ratios, a été effectuée afin de déterminer la quantité optimale d'α-CD à utiliser pour inclure la TBZ. Cette étude a montré que le ratio (1 :2) permettait d'obtenir un nouveau composé témoignant de la formation de complexes TBZ-αCD. Les CI ont ensuite été incorporés en solution ou à l'état solide dans les gels de polymères (HPMC et PVP) afin d'obtenir des ODF. La caractérisation des ODF chargés en CI a mis en évidence d'une part, la réorganisation et/ou précipitation des CI dans les ODF composés d'HPMC et d'autre part, leur bonne stabilité dans les films de PVP. Après 1 mois de conservation, la TBZ complexée est restée stable dans les films de PVP. Les CD permettent donc de maintenir l'état amorphe de la TBZ au sein des PVP-ODF. Ainsi, dans le cas où le PA tend à recristalliser dans la matrice, l'utilisation des CD peut être une stratégie pour améliorer sa stabilité. Enfin, l'incorporation de l'αCD pour améliorer les propriétés organoleptiques de la TBZ a été encourageante.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le principal objectif de ce projet a été de mettre au point un film orodispersible (ODF) de tétrabénazine (TBZ) afin d'améliorer l'acceptabilité, la sécurité et l'efficacité d'un traitement pour la population pédiatrique. En effet, ce PA n'existe que sous la forme comprimé et fait partie des principes actifs prioritaires pour lesquels le développement d'une forme galénique adaptée à la population pédiatrique est nécessaire.

La première étape de ce travail a consisté à formuler la TBZ sous forme d'un ODF à partir de 4 polymères hydrophiles : hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), polyvinylpyrrolidone (PVP), Pullulan (PUL) et hydroxyethylcellulose (HEC). Les caractérisations physico-chimiques, mécaniques et biopharmaceutiques ont montré que les ODF formulés remplissaient les conditions fixées dans le cahier des charges, à savoir :

- ✓ Utiliser un minimum d'excipients à risque pour les enfants ;
- ✓ Incorporer 12,5 mg de TBZ/film ($4cm^2$) ;
- ✓ Obtenir un temps de désintégration totale de l'ODF < 1 minute ;
- ✓ Obtenir une teneur en eau < 10% ;
- ✓ Obtenir une forme facile à manipuler : souple et résistante.

Au cours de cette première étude, une augmentation importante du taux de libération de la TBZ dans le milieu salivaire, a été observée. Cette amélioration importante de la dissolution a été attribuée à l'état amorphe de la TBZ dans les ODF. Cependant, une recristallisation de la TBZ a été constatée au cours de l'étude de stabilité dans les ODF à base de PVP et d'HEC. A la suite de cette étude, l'ODF à base d'HPMC a été sélectionné comme la formule de choix pour l'administration de la TBZ. En effet, en plus de remplir les conditions fixées dans le cahier des charges, c'est celle qui offre les meilleures propriétés mécaniques, en termes de flexibilité et de robustesse et la meilleure stabilité (toutes les propriétés initiales conservées pendant au moins 6 mois).

Néanmoins les résultats obtenus au cours de cette première étude ont soulevé quelques questions. Quel est le rôle des polymères dans l'amélioration de la dissolution du PA ? Quelle est la contribution de l'acide citrique ? Pourquoi la TBZ reste-t-elle à l'état amorphe dans les films à base d'HPMC et de PUL et recristallise dans les ODF à base de PVP et d'HEC ? Ces questions ont fait écho à des problématiques rencontrées dans la formulation de systèmes appelés dispersions solides (SD). Ainsi, les ODF constitués d'un support et d'un PA amorphes sont considérés comme des SD de type amorphe. Ces systèmes sont connus pour

leur capacité à augmenter la dissolution des PA peu hydrosolubles (BCS classe II et IV) mais aussi pour leur instabilité (recristallisation du PA lors du stockage et précipitation lors de la dissolution).

La seconde étude a donc consisté à caractériser les ODF comme des SD amorphes afin de répondre aux questions précédentes. Elle a montré que la solubilisation de la TBZ dans l'eau acidifiée (acide citrique) permettait d'obtenir un PA sous forme amorphe améliorant ainsi sa dissolution *in vitro*. Toutefois, cet état n'est maintenu qu'en présence du support polymère qui permet de prévenir la vitrification du PA et donc sa re-précipitation dans le milieu de dissolution. De plus, cette étude a permis d'expliquer les phénomènes de recristallisation de la TBZ au cours du temps en fonction des différents polymères utilisés. Elle montre alors que la présence d'interactions hydrogène est indispensable dans le maintien de la forme amorphe de la TBZ. Le 2ème facteur influant dans la stabilité de notre système est l'effet vitrifiant du polymère sur la TBZ. Dans notre cas, la miscibilité polymère/TBZ semble avoir une importance dans le maintien de la sursaturation en PA dans le milieu de dissolution mais pas sur la stabilité de l'état amorphe lors de la conservation. Enfin, cette étude a montré que lorsque tous les paramètres (bonne miscibilité, effet vitrifiant et liaisons hydrogène) étaient réunis, la SD restait stable au cours du temps et offrait une libération accrue du PA dans le milieu de dissolution, maintenue durant au moins 2 heures (cas de l'HPMC).

Une des stratégies permettant de promouvoir la stabilité des SD amorphes et de maintenir leur capacité à améliorer la dissolution des PA peu solubles, est l'incorporation d'un additif supplémentaire (SD de 3ème génération) comme par exemple les cyclodextrines (CD). Les CD ont été choisies pour former des complexes d'inclusion (CI) avec la TBZ afin d'améliorer les propriétés biopharmaceutiques des SD ; En outre, elles peuvent aussi contribuer au masquage de l'amertume prononcée de la TBZ.

L'αCD a été sélectionnée pour fabriquer des CI, car elle augmentait davantage la solubilité de la TBZ que les CD β et γ. La formation d'un CI s'est avérée plus concluante avec le ratio TBZ: CD de (1:2), il a donc été choisi pour la suite de l'étude. Les CI ont été incorporés dans les gels d'HPMC et PVP pour former les ODF soit en solution (procédé 1), soit à sec après séchage par atomisation (procédé 2). Au cours de cette étude nous avons constaté que les CI seuls amélioraient la dissolution de la TBZ dans le milieu salivaire mais la quantité de PA en solution tendait à diminuer au cours du temps montrant, encore une fois, l'importance du polymère dans la stabilisation du système. L'incorporation des CI dans les ODF a montré une augmentation significative du pourcentage de TBZ dissous en milieu salivaire par effet

synergique. Le procédé de fabrication n'a pas eu d'influence sur le système. Après 1 mois de stabilité, l'émergence de cristaux dans l'ODF à base d'HPMC est constatée tandis que dans l'ODF à base de PVP, le système reste totalement amorphe. Les cristaux obtenus correspondent à la précipitation des CD et non de la TBZ expliquant un profil de dissolution du PA similaire au temps initial. La précipitation des CD dans l'ODF n'est donc pas problématique car l'état amorphe du PA est conservé. Ainsi, dans le cas de l'ODF à base d'HPMC, le maintien de la TBZ à l'état amorphe est permis par le polymère ; alors que pour l'ODF à base de PVP, la stabilité de la TBZ est permise par l'ajout des CD. Les CD peuvent donc améliorer la stabilité des SD amorphes lorsque les interactions hydrogène PA-CD sont maintenues.

Enfin, les résultats du test sensoriel effectué sur un panel de volontaires ont montré une amélioration des propriétés organoleptiques des ODF (amélioration du goût) avec l'incorporation de CD dans le système.

En conclusion, une formule innovante sous forme d'ODF a été réalisée pour l'administration orale de TBZ à la population pédiatrique. Ce système compte 4 constituants majeurs :

- ✓ La TBZ comme principe actif d'intérêt ;
- ✓ L'acide citrique comme agent solubilisant ;
- ✓ L'HPMC comme polymère matriciel garantissant le maintien de l'état amorphe du PA ;
- ✓ Les CD comme agent complexant et masquant.

Cette formule offre :

- ✓ de bonnes propriétés mécaniques permettant la manipulation des ODF et leur transport ;
- ✓ une bonne désintégration du film et une dissolution de la TBZ dans la cavité buccale assurant une administration simple aux enfants ;
- ✓ un maintien de l'état amorphe du PA au cours du temps assurant sa stabilité.

Ces constituants sont la base d'une formule pertinente pour des ODF de TBZ. Cependant, la formulation doit encore être optimisée. En effet, l'incorporation de la TBZ dans des CD a considérablement diminué sa quantité dans la formule. Le chargement des films ayant ses limites, il faudrait trouver le ratio TBZ/CD optimal pour incorporer davantage de PA tout en en préservant les propriétés mécaniques et biopharmaceutiques des films. Des CD modifiées

pourraient être testées pour la formation de CI avec la TBZ (HPβCD par exemple), ou encore l'utilisation de polymères de CD (poly-α-CD) pourrait être une alternative permettant d'allier l'effet stabilisant des polymères et l'effet complexant des CD (Skiba *et al.*, 2014).

Il serait de plus intéressant d'approfondir les études de palatabilité menées notamment en optimisant le masquage de l'amertume de la TBZ. En effet, bien que les CD contribuent significativement au masquage de cette amertume, celle-ci, d'après le panel, demeure relativement présente dès les 1ères secondes après administration du film. Ce résultat ne semble pas surprenant compte-tenu du fait que nous avons cherché à améliorer la dissolution de la TBZ dans la cavité buccale par la formation de dispersions solides ou de complexes d'inclusion dans les CD, et que c'est ce PA à l'état dissous qui se fixe sur les récepteurs gustatifs. Il serait donc opportun d'apporter au sein de la formulation des aromatisants adaptés ou d'autres agents masquant entrant en compétition avec les récepteurs gustatifs. Cette bonne palatabilité est un point clef du cahier des charges lors du développement d'une forme galénique administrée dans la cavité buccale notamment en pédiatrie. Une autre alternative pourrait être d'envisager l'encapsulation de la TBZ au sein de nanoparticules polymères incorporées dans les ODF. Toutefois, cette alternative nécessite de lever certains verrous comme : i) l'inclusion d'une quantité suffisante de nanoparticules de TBZ dans les films pour obtenir le dosage adéquate ou encore ii) le maintien d'une cinétique de dissolution rapide du PA.

De plus, une étude *in vitro* de pénétration du PA à travers la muqueuse buccale pourrait être intéressante dans le but de déterminer quelle quantité de TBZ est susceptible de passer directement dans la circulation systémique. Ce type d'étude pourrait être conduit sur des modèles de muqueuses buccales reconstituées comme les HOE® (Human Oral Epithelium) développées par Episkin par exemple.

Enfin, des études *in vivo* pourraient être conduites dans le but de comparer le profil pharmacocinétique de la TBZ administrée sous forme de comprimé et sous forme d'ODF. Cette étape nécessite d'une part, le choix d'un modèle animal adapté à l'administration orale d'ODF, et d'autre part la mise au point d'un protocole expérimental complet avec le développement de méthodes analytiques de dosage de la TBZ et de ses métabolites dans le sang.

ANNEXES

Annexe 1 : PIP TBZ

EMA/138220/2015

European Medicines Agency decision

P/0074/2015

of 1 April 2015

on the agreement of a paediatric investigation plan and on the granting of a waiver for tetrabenazine (ADV6979) (EMEA-001404-PIP01-12) in accordance with Regulation (EC) No 1901/2006 of the European Parliament and of the Council

Disclaimer

This Decision does not constitute entitlement to the rewards and incentives referred to in Title V of Regulation (EC) No 1901/2006.

Only the English text is authentic.

30 Churchill Place ● Canary Wharf ● London E14 5EU ● United Kingdom
Telephone +44 (0)20 3660 6000 **Facsimile** +44 (0)20 3660 5555
Contact EMA www.ema.europa.eu/contact

An agency of the European Union

European Medicines Agency decision
P/0074/2015

of 1 April 2015

on the agreement of a paediatric investigation plan and on the granting of a waiver for tetrabenazine (ADV6979) (EMEA-001404-PIP01-12) in accordance with Regulation (EC) No 1901/2006 of the European Parliament and of the Council

The European Medicines Agency,

Having regard to the Treaty on the Functioning of the European Union,

Having regard to Regulation (EC) No 1901/2006 of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on medicinal products for paediatric use and amending Regulation (EEC) No. 1768/92, Directive 2001/20/EC, Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004[1],

Having regard to Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency[2],

Having regard to the application submitted by Advicenne Pharma on 11 January 2013 under Article 16(1) of Regulation (EC) No 1901/2006 and a waiver under Article 13 of said Regulation,

Having regard to the opinion of the Paediatric Committee of the European Medicines Agency, issued on 13 February 2015, in accordance with Article 18 of Regulation (EC) No 1901/2006, and Article 13 of said Regulation,

Having regard to Article 25 of Regulation (EC) No 1901/2006,

Whereas:

(1) The Paediatric Committee of the European Medicines Agency has given an opinion on the agreement of a paediatric investigation plan and on the granting of a waiver.

(2) It is therefore appropriate to adopt a decision agreeing a paediatric investigation plan.

(3) It is therefore appropriate to adopt a decision granting a waiver.

[1] OJ L 378, 27.12.2006, p.1.
[2] OJ L 136, 30.4.2004, p. 1.

Has adopted this decision:

Article 1

A paediatric investigation plan for tetrabenazine (ADV6979), oral suspension, oral use, gastric use, the details of which are set out in the opinion of the Paediatric Committee of the European Medicines Agency annexed hereto, together with its appendices, is hereby agreed.

Article 2

A waiver for tetrabenazine (ADV6979), oral suspension, oral use, gastric use, the details of which are set out in the opinion of the Paediatric Committee of the European Medicines Agency annexed hereto, together with its appendices, is hereby granted.

Article 3

This decision is addressed to Advicenne Pharma, 2 rue Briçonnet, 30000 – Nîmes, France.

Done at London, 1 April 2015

For the European Medicines Agency
Jordi Llinares Garcia
Head of Division (ad interim)
Human Medicines Research and Development Support
(Signature on file)

EMA/PDCO/749435/2014 Corr

Opinion of the Paediatric Committee on the agreement of a Paediatric Investigation Plan and a waiver

EMEA-001404-PIP01-12

Scope of the application

Active substance(s):

Tetrabenazine (ADV6979)

Condition(s):

Treatment of dystonia

Pharmaceutical form(s):

Oral suspension

Route(s) of administration:

Oral use

Gastric use

Name/corporate name of the PIP applicant:

Advicenne Pharma

Basis for opinion

Pursuant to Article 16(1) of Regulation (EC) No 1901/2006 as amended, Advicenne Pharma submitted for agreement to the European Medicines Agency on 11 January 2013 an application for a paediatric investigation plan for the above mentioned medicinal product and a waiver under Article 13 of said Regulation.

The procedure started on 13 February 2013.

Supplementary information was provided by the applicant on 24 November 2014. The applicant proposed modifications to the paediatric investigation plan

30 Churchill Place ● Canary Wharf ● London E14 5EU ● United Kingdom
Telephone +44 (0)20 3660 6000 **Facsimile** +44 (0)20 3660 5510
Send a question via our website www.ema.europa.eu/contact

An agency of the European Union

Opinion

1. The Paediatric Committee, having assessed the proposed paediatric investigation plan in accordance with Article 17 of Regulation (EC) No 1901/2006 as amended, recommends as set out in the appended summary report:

   - to agree the paediatric investigation plan in accordance with Article 18 of said Regulation;
   - to grant a waiver for one or more subsets of the paediatric population in accordance with Article 13 of said Regulation and concluded in accordance with Article 11(1)(c) of said Regulation, on the grounds that the specific medicinal product does not represent a significant therapeutic benefit over existing treatments for paediatric patients.

   The Norwegian Paediatric Committee member agrees with the above-mentioned recommendation of the Paediatric Committee.

2. The measures and timelines of the agreed paediatric investigation plan and the subset(s) of the paediatric population and condition(s) covered by the waiver are set out in the Annex I.

This opinion is forwarded to the applicant and the Executive Director of the European Medicines Agency, together with its annex and appendix.

London, 13 February 2015

On behalf of the Paediatric Committee
Dr Dirk Mentzer, Chairman
(Signature on file)

1. Waiver

1.1. Condition:

Treatment of dystonia

The waiver applies to:

- the paediatric population from birth to less than 1 year of age;
- oral suspension, oral use, gastric use;
- on the grounds that the specific medicinal product does not represent a significant therapeutic benefit over existing treatments.

2. Paediatric investigation plan

2.1. Condition:

Treatment of dystonia

2.1.1. Indication(s) targeted by the PIP

Treatment of hyperkinetic dystonia

2.1.2. Subset(s) of the paediatric population concerned by the paediatric development

From 1 year to less than 18 years of age.

2.1.3. Pharmaceutical form(s)

Oral suspension

2.1.4. Measures

Area	Number of measures	Description
Quality-related studies	1	**Study 1** Development of an age-appropriate oral suspension.
Non-clinical studies	0	Not applicable.
Clinical studies	3	**Study 2** Open-label, randomised, controlled, 2-way cross-over, monocentre study, to evaluate and compare pharmacokinetics of tetrabenazine and its main active metabolites in two different formulations, tetrabenazine (ADV6979) and an authorised valid EU reference medicinal product containing tetrabenazine, in healthy adult subjects. (E01CS)

		Study 3 Double-blind, placebo controlled, multicentre, randomised study to evaluate safety, efficacy, pharmacokinetics of tetrabenazine (ADV6979) in patients aged from 4 to less than 18 years and exploratory in patients aged from 1 year to less than 4 years with hyperkinetic dystonia. (E11CS) **Study 4** Open-label, uncontrolled, multicentre, long-term safety and tolerability study of tetrabenazine (ADV6979) in children with hyperkinetic dystonia aged from 1 year to less than 18 years. (E12CS)
Extrapolation, modelling and simulation studies	0	Not applicable.
Other studies	0	Not applicable.
Other measures	0	Not applicable.

3. Follow-up, completion and deferral of PIP

Concerns on potential long term safety/efficacy issues in relation to paediatric use:	Yes
Date of completion of the paediatric investigation plan:	By March 2020
Deferral for one or more measures contained in the paediatric investigation plan:	No

Annexe 2 : Article publié du chapitre 2 expérimental

JPP JOURNAL OF Pharmacy and Pharmacology
ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY
JPP Journal of Pharmacy And Pharmacology
Research Paper

Formulation of orodispersible films for paediatric therapy: investigation of feasibility and stability for tetrabenazine as drug model

Zoé Senta-Loys[a], Sandrine Bourgeois[a,b], Cyril Pailler-Mattei[b,c], Géraldine Agusti[a], Stéphanie Briançon[a,b] and Hatem Fessi[a,b]

[a]Université de Lyon, Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), UMR CNRS 5007, Villeurbanne, France, [b]Université de Lyon, Université Lyon 1, ISPB-Faculté de Pharmacie, Lyon, France and [c]Université de Lyon, Ecole Centrale de Lyon, Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes, UMR CNRS 5513, Ecully, France

Keywords
HPMC; orodispersible film; paediatric medicine; PVP; tetrabenazine

Correspondence
Sandrine Bourgeois, Université de Lyon, Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), UMR CNRS 5007, F-69622 Villeurbanne, France.
E-mail: sandrine.bourgeois@univ-lyon1.fr

Received April 15, 2016
Accepted July 26, 2016

doi: 10.1111/jphp.12627

Abstract

Objectives Orodispersible films (ODF) were formulated to facilitate tetrabenazine (TBZ) administration to paediatric population for the treatment of hyperkinetic movement disorders.

Methods ODF were obtained by solvent casting/evaporation method using four different polymers (HPMC, PVP, pullulan and HEC). Physicochemical, mechanical and biopharmaceutical characterizations as well as API state in ODF by thermal analysis were investigated to define and compare formulations. ODF stability was also monitored during 6 months to follow evolution of properties.

Key findings Analyses at T0 showed few differences between formulations: results of physicochemical and mechanical characterizations were almost similar for each formulation and TBZ appeared at the amorphous state in all cases. ODF delivery system allowed a major improvement of TBZ dissolution profile in buccal conditions compared with pure drug. However, after 3 and 6 months of stability, a TBZ recrystallization occurred for formulations based on PVP and HEC associated with a decrease of drug release in saliva conditions.

Conclusions HPMC-ODF (F1) appeared as the best formulation. Indeed, physicochemical, mechanical and biopharmaceutical characteristic remained intact. In addition, TBZ remained in amorphous state during stability study.

Introduction

Paediatric population is highly diverse as it ranges from newborn to adolescence. For years, problems due to drug administration for paediatric population were not considered.[1] However, nowadays development of pharmaceutical dosage forms for paediatric appears as a great challenge. Drug administration in paediatric population (<12 years) often requires to manipulate extemporaneously dosage forms for adult. Therefore, the Food and Drug Administration (FDA) undertook to establish the first guidelines, in December 1994, commonly referred as 'The Pediatric Rules'.[2] These rules described the way to adjust medication for children and therefore to encourage pharmaceutical industries to develop dosage forms specific to paediatric population. Due to this awareness, in 2007, EMA publishes a legislative framework to ensure the safety of the paediatric population and promote the development of appropriate drugs. This document mainly concerns paediatric oral formulations with 17 types of formulation.[1] The choice of the most suitable form is made according to the age of the child, the physicochemical properties of the drug, taste and the amount of drug to be administered. Oral medicines are administered in different forms, among them are suspension, syrup, chewable tablet, capsule and microcapsule, granule and orodispersible formulation. Ninety percentage of paediatric formulations are the liquid forms because they are easier to swallow for children and easy to divide for adjusting the dose to weight of the child.[3] However, liquid oral forms are unstable and subject to high risk of contamination, and they require specific devices for administration. Therefore, the development of solid forms called 'ready to

© 2016 Royal Pharmaceutical Society, Journal of Pharmacy and Pharmacology, ** (2016), pp. **–**

use' presents a main interest for paediatric population. In this study, we focused on the design of orodispersible films (ODF) as an innovative dosage form suitable for paediatric population. ODF is one of the newest dosage forms that appeared on the market. This new form of drug administration offers advantages such as no water needed for administration, enhanced paediatric population compliance (>6 years), possibility of local action, dose accuracy compared with syrup, control of manufacturing processes, easy to handle and easily portable.[4, 5]

For the ODF preparation, the film casting/evaporation method is the most commonly used because it is simple to implement and does not require any particular device at the laboratory scale.[6] Two solvents of the film-forming polymers are widely used: water and ethanol or a mixture of both. Ethanol presents interest for faster drying, but it has side effects on the paediatric population. Even more than adults, the use of non-toxic, non-irritating organic polymers formulations is essential for the paediatric population. Thus, biopolymers are widely preferred for the design of films such as polysaccharides or proteins. The polymers usually encountered are cellulose derivatives (hydroxypropylmethylcellulose (HPMC),[7, 8] hydroxypropylcellulose (HPC)[9]…), pullulan (PUL),[10] gelatine[11] and also synthetic polymers like polyvinylpyrrolidone (PVP).[12] The choice of polymer is essential for the design of fast dissolving films; they may be used alone or in combination[13,14] to achieve the desired properties.[15] The robustness of the films depends on the choice of the polymer and the formulation process. Choice of excipients requires particular attention in paediatric formulations because they may have a different effect on the child development.[16,17] Indeed, polyols can cause diarrhoea and malabsorption, propylene glycol induces cardiovascular risk and respiratory problems.[18]

The development of ODF for oral administration of tetrabenazine (TBZ) to children was investigated. TBZ is a monoamine-depleting agent discovered in the 1950s and was approved for the treatment of neuroses and psychoses/schizophrenia. TBZ was initially investigated as a potentially more efficacious, better tolerated treatment for schizophrenia than reserpine in lower than 20 open-label[19] and comparative trials. It was subsequently approved for this indication. Moreover, TBZ is currently approved for its use in the treatment of a wide range of hyperkinetic movement disorders in several countries.[20] TBZ is available in unscored 12.5 mg tablets and scored 25 mg tablets.[21] Nowadays, no form has been developed for the child and TBZ was administered by crushing adult tablets. Incorporation of TBZ into ODF formulation would simplify drug administration. However, the development of dosage form of TBZ presents many limitations due to its poor water solubility, poor wettability and its high sensitivity to light, heat and moisture.

The objective of this study was to develop and characterize an innovative drug delivery system for paediatric administration of TBZ based on TBZ-loaded in ODF formulation with minimal and well-tolerated excipients for paediatric application, especially without organic solvent to avoid undesired hazards of residual solvents. As described in several studies, organic solvents were generally used for the formulation of ODF. In our study, aqueous solvent was preferred to ensure the safety of the paediatric population. ODF were formulated with various hydrophilic polymer matrices in which the API was included (HPMC, hydroxyethylcellulose (HEC); pullulan, PVP). To select the optimal formulation, several film characteristics were considered and followed during 6 months such as their physicochemical and mechanical properties, disintegration time, residual moisture content, TBZ content, the in-vitro release of TBZ, TBZ state and the possible interactions between API and excipients.

Materials and Methods

Materials

Four types of hydrophilic polymer were studied for ODF formulation: hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) Vivapharm® E15 from JRS Pharma (Rosenberg, Germany), hydroxyethylcellulose (HEC) Natrosol® 250 l and Povidone K90 (PVP K90) from Ashland (Alizay, France) and pullulan (PUL) from Hayashibara Company (Dusseldorf, Germany).[15] Glycerol and Sorbitol, respectively, used as a plasticizer and disintegrant were purchased from Cooper (Melun, France).

Methods

ODF preparation

ODF were obtained by the casting/evaporation method. Firstly, the film-forming polymer and other excipients were dispersed under magnetic stirring to obtain a gel.[6] Then, TBZ was dissolved in deionized water with citric acid (1.5 mole equivalent) and was incorporated in gel. The second step consisted of gel casting on a smooth surface (Petri dishes). Finally, the gel was dried to form a film. After drying, the film was removed from the holder and cut to obtain a surface area of 4 cm^2. The composition of the films is given in Table 1. Sorbitol was added in some formulations (HPMC-ODF (F1) and HEC-ODF (F4)) to enhance disintegration of ODF.

Physicochemical and mechanical properties

Mechanical and morphological investigation. To determine morphological and mechanical characteristics, the

Table 1 Different formulations of ODF studied. Amount was expressed as a percentage of solid weight in films

Formulation	Polymer matrix (%)	TBZ (%)	Citric acid (%)	Glycerol (%)	Sorbitol (%)
HPMC-ODF (F1)	50	15	15	12	8
PVP-ODF (F2)	54.35	16.3	16.3	13.05	–
PUL-ODF (F3)	54.35	16.3	16.3	13.05	–
HEC-ODF (F4)	56.8	17.05	17.05	–	9.1

following properties of ODF were studied: homogeneity, colour, transparency, surface aspect, thickness, folding endurance and elongation modulus. Properties such as homogeneity, colour, transparency and surface of ODF were evaluated visually. The ODF surface was 2 × 2 cm^2. The thickness was measured with a Digimatic Micrometer IP65 (Mitutoyo). The average thickness was obtained by taking three measurements on each sample (each formulation was reproduced three times). The folding resistance was expressed as the number of steps during which the film was folded without breaking.[12] Dynamic Mechanical Analysis (DMA 50_{TM}, Metravib, Limonest, France) tests were performed on the four polymer film samples (HPMC-ODF (F1), PVP-ODF (F2), PUL-ODF (F3), HEC-ODF (F4)) to estimate their Young's modulus, E. The samples dimensions were 20 × 30 × e mm (e is the thickness of the sample). The thickness of each sample was measured before testing. The tests were carried out at constant temperature 25 °C for different frequencies (from 0.1 to 30 Hz).

ODF disintegration time. Orodispersible films were placed in a beaker containing 20 ml of salivary medium at 37 °C. Simulated saliva was prepared using KH2PO4 (12 mM), NaCl (40 mM), CaCl2 (1.5 mM), and pH was adjusted to 6.8 using NaOH.[22] A vortex was created by magnetic stirring every 10 s, and the state of the film was noted. The disintegration time was defined as the time for the complete disintegration of the film.[23]

ODF moisture content. Moisture content (MC) of ODF was measured by thermogravimetric analysis (TGA) (TG 209 F1 ASC; Netzsch, Dardilly, France). Around 10 mg of ODF (9–11 mg) was placed in pans and heated from 25 to 150 °C, with a rate of 10 °C/min. Results were expressed as the mean value of three measurements for each sample.

Drug content. ODF (4 cm^2) was introduced into 150 ml of aqueous solution adjusted to pH 1.3, under stirring. After 15 min (total film dissolution), sample was withdrawn, filtered through a 0.45-µm cellulose acetate membrane, and the absorbance was measured by UV spectroscopy (UV-1601, UV–visible spectrometer, SHIMADZU) at 282 nm. Drug content was estimated from three batches of each formulation and expressed as mg of TBZ/100 mg of ODF.

In-vitro drug release

Drug release studies were performed in simulated media at pH 6.8 and pH 1.3 to follow the TBZ dissolution in mouth and stomach conditions as a part of the ODF will be swallowed by the patient. Composition of simulated saliva was defined previously. Artificial gastric media was prepared according to the European Pharmacopeia using 2 g of NaCl, 80 ml of HCl (1M) and distilled water until 1000 ml (European Pharmacopoeia 8th edition).

In-vitro TBZ release studies were performed on 4 cm^2 of ODF introduced into either 150 ml of simulated salivary medium (pH 6.8) or 150 ml of simulated gastric medium (pH 1.3) at 37 °C under magnetic at 200 rpm. Samples of 1 ml were withdrawn every 30 s during 5 min and after 15, 30, 60 and 120 min and substituted by 1 ml of dissolution medium.[24] Samples were filtered through a 0.45-µm cellulose acetate membrane (Merck-Millipore®, Darmstadt, Germany), and the TBZ concentration was measured by UV spectroscopy (UV-1601, UV–visible spectrometer, Shimadzu, Noisiel, France) at 282 nm. Dissolution experiment was reproduced in triplicate for each formulation to determine release profile and cumulative percentage.[23]

API characterization in ODF

Fourier infrared transform spectroscopy. Attenuated total reflection (ATR)-FT-IR (IRPrestige-21, Shimadzu) was used to highlighting interactions between TBZ and excipients. Measurements were taken on each initial compound and on each formulation of ODF. Samples were place on a crystal and pressed and spectra were recorded. Background was obtained using a fleshly cleaned crystal. Analyses were conducted in frequency range between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1}. Each analysis was repeated three times.

Thermal analysis. To characterize TBZ physical state in ODF, modulated differential scanning calorimetry (MDSC) was used. It was performed by DSC Q200 (TA instruments) equipped with a refrigerated cooling accessory (RCS90) and a data analyser (Universal Analysis 2000, TA instruments, Guyancourt, France). The equipment was calibrated with indium. Inert atmosphere was maintained by nitrogen at a flow rate of 20 ml/min. An empty aluminium pan was used as reference. Samples (pure TBZ, physical mixture and TBZ-loaded in ODF) were modulated at 0.2 °C every 60 s with heating rate of 5 °C/min. TBZ and ODF (9–11 mg) were placed in hermetically sealed aluminium pans and

heated from 10 to 155 °C to characterize the physical state of API in ODF.

Polarizing microscopy. To highlight the presence of crystals in ODF, polarizing microscopy (Leica DMLM, Nanterre, France) was used.

Investigation of ODF stability

ODF were stored in sealed aluminium strip, and stability (ICH Q1-R2) was investigated at 40 °C, 75% HR (accelerated storage conditions) during 6 months. Film samples of each formulation were withdrawn at 1, 3 and 6 months. Physicochemical and mechanical characterization, dissolution behaviour, FT-IR spectra and thermal analyses were considered during this period to determine stability of ODF and TBZ.

Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using the R software (The R foundation, Vienna, Austria) with a threshold of 5% corresponding to the alpha risk. As all data could not be normalized, a nonparametric Kruskal–Wallis test was performed. To determine significant differences ($P < 0.05$) between two parameters, a multiple comparison *post hoc* test (kruskalmc) was conducted. Statistical analyses were investigated on dissolution results between pure drug and each type of ODF and between ODF at $T = 0$ in salivary and gastric media. In addition, tests were conducted on the drug release profile, in salivary and gastric media, for each ODF formulation during their storage (at 1, 3 and 6 months).

Statistical analyses were also performed on drug content variation in ODF during stability studies.

Results

Physicochemical and mechanical properties

ODF properties immediately after preparation, $T = 1$ month, $T = 3$ months and $T = 6$ months of storage are presented in Table 2. Analyses were conducted on ODF with a surface of 4 cm^2 and a mass range from 60 to 80 mg. Concerning morphological characterization, at T0 all ODF were homogenous and transparent, but an opacification can be observed after 1 month for PVP-ODF (F2) and 3 months for HEC-ODF (F4) (Table 2). For every formulation, a yellowing more or less important was noted after 1 month of storage. ODF flexibility was determined by folding endurance and rigidity was measured by DMA. After preparation, HPMC-ODF presented a higher flexibility than PVP-based formulations. The flexibility of ODF formulations can be classified as follows: HPMC-ODF(F1) > HEC-ODF (F4) > PUL-ODF(F3) > PVP-ODF(F2). Concerning the film rigidity, HPMC-based formulations presented the highest rigidity and a classification of film rigidity can be suggested as follows: HPMC-ODF(F1)≥PUL-ODF(F3) > PVP-ODF(F2) > HEC-ODF(F4). After 6 months of preservation, PUL-ODF (F3) became more brittle.

Even if no significant differences can be observed, the moisture content values of PVP-based appeared slightly higher than other formulations. However, these values never exceeded 7% (w/w) and no evolution during storage was noticed.

For each formulation, the disintegration time was lower or equal to 50 s at T0 and remained quite similar during the 6 months except for HEC-ODF. Indeed, for HEC-ODF, the disintegration time increased after 6 months of storage (60 s).

At T0, drug contents in ODF were quite similar, varying from 15.0 to 16.9 mg of TBZ for 100 mg of ODF. After 6 months, no drug loss was observed for HPMC-ODF (F1) and PUL-ODF (F3), but for PVP-ODF (F2) and HEC-ODF (F4), a 5% of drug content loss was estimated.

TBZ release profiles

As shown in Figure 1a, in the salivary medium, the pure TBZ had a slow dissolution profile with only 20% of the drug dissolved after 15 min. In the same conditions, the dissolution of TBZ-loaded in ODF was faster as approximately 85% of the total amount of TBZ was released during the first 5 min, regardless of formulations. Statistical study showed significant differences between pure drug and ODF drug release. In addition, significant differences were observed between PVP-ODF and PUL-ODF from 4 min of kinetic release. However, after 3 months of storage, the amount of TBZ released from PVP-ODF (F2) appears lower, with only 75% of TBZ dissolved at 5 min (Figure 1b). For the PVP-ODF, this same observation was made from 1 month (data not shown) to 6 months (Figure 1c). However, no significant differences were observed for PVP-ODF at $T = 1$, 3 and 6 months compared with $T = 0$. During 6 months, dissolution behaviour for HPMC and PUL-ODF remained similar, and no significant differences were observed. A slight decrease of drug released was induced for HEC-ODF(F4) after 3 months of storage (Figure 1b) without being significantly different compared with $T = 0$, but this trend increased after 6 months with only 70% of TBZ released after 15 min (Figure 1c). At this time, significant differences were observed compared with $T = 0$.

In the gastric medium (pH 1.3), the dissolution of TBZ was instantaneous in both cases, free or formulated drug (Figure 1d). No significant differences were observed between pure drug and ODF. However, during stability studies, final amount of drug released declined. After

Table 2 Physicochemical characterizations of formulations at T0 and after $T = 1$, 3 and 6 months of storage

	Morphological description	Thickness (μm) ($n = 9$)	Folding endurance ($n = 3$)	Young modulus (kPa)	Moisture content (% w/w) ($n = 3$)	Disintegration time (s)	Drug content $mg_{TBZ}/100\ mg_{film}$ ($n = 3$)
HPMC-ODF (F1)	Homogeneous, transparent, slightly yellow, both sides smooth	176 ± 7.5	>100	187.5 ± 19	3.1 ± 1.1	45	15.0 ± 0.15
F1 $T = 1$ month	Homogeneous, transparent, more yellow, both sides smooth	–	>100	–	4.1 ± 0.5	40	15.3 ± 0.2
F1 $T = 3$ months	Homogeneous, transparent, more yellow, both sides smooth	–	>100		3.6 ± 0.2	40	15.0 ± 0.2
F1 $T = 6$ months	–	–	>100	–	3.1 ± 0.8	40	15.1 ± 0.1
PVP-ODF (F2)	Homogeneous, transparent, colourless, both sides smooth	122 ± 4.3	25 ± 5	106 ± 19	5.6 ± 1.15	35	16.2 ± 0.1
F2 $T = 1$ month	Not homogeneous, opaque areas, colourless, both sides smooth, more flexible	–	47 ± 3	–	7.1 ± 0.2	35	16.0 ± 0.2
F2 $T = 3$ months	Homogeneous, opaque, slightly yellow, both sides smooth, more flexible	–	58 ± 5		6.0 ± 0.4	35	15.4 ± 0.3
F2 $T = 6$ months	–	–	59 ± 3	–	5.7 ± 0.7	35	15.5 ± 0.2
PUL-ODF (F3)	Homogeneous, transparent, colourless, both sides smooth	124 ± 11.3	46 ± 10	137 ± 21	4.5 ± 0.31	30	15.9 ± 0.2
F3 $T = 1$ month	Homogeneous, transparent, slightly yellow, both sides smooth	–	32 ± 5	–	2.7 ± 0.5	30	15.9 ± 0.2
F3 $T = 3$ months	Homogeneous, transparent, slightly yellow, both sides smooth	–	34 ± 6		4.7 ± 0.05	30	15.9 ± 0.2
F3 $T = 6$ months	–	–	31 ± 5	–	5.6 ± 0.9	30	16.0 ± 0.13
HEC-ODF (F4)	Homogeneous, transparent, colourless, both sides smooth	134 ± 7.2	88 ± 5	76 ± 16	4.1 ± 1.3	50	16.9 ± 0.1
F4 $T = 1$ month	Homogeneous, transparent, colourless, both sides smooth	–	82 ± 6	–	3.8 ± 0.3	45	16.9 ± 0.1
F4 $T = 3$ months	Not homogeneous, opaque areas, slightly yellow, both sides smooth	–	79 ± 5		4.4 ± 0.1	45	16.9 ± 0.05
F4 $T = 6$ months	–	–	79 ± 3	–	4.8 ± 0.2	60	16.1 ± 0.2

3 months, amount of drug released at 15 min decrease by 8 ± 3% for PVP-ODF and from 6 months 5 ± 1% for PVP-ODF and HEC-ODF (Figure 1c). These differences between $T = 0$ and $T = 6$ months for HEC-ODF were statistically significant.

API characterization in ODF

FT-IR spectroscopy

The characteristic peaks in FT-IR spectra of pure TBZ, TBZ-CA mixture, PVP blank films and TBZ-loaded in PVP-ODF at T0 and after 3 months are shown in Figure 2. Peak assignments of FT-IR of TBZ excipient physical mixtures and each ODF formulations are presented in Table 3.

As shown in Figure 2a, pure TBZ FT-IR spectrum presented several characteristic peaks: (1) at 1697 cm^{-1} and 1257 cm^{-1} corresponding to the stretching of carbonyl (C=O), (2) at 1604, 1514 and 1462 cm^{-1} corresponding to the stretching of aromatics (C=C), (3) at 1226 cm^{-1} corresponding to the stretching of amine (C-N) and (4) at 1107 cm^{-1} corresponding to the stretching of ether function (C-O-C). Figure 2b shows the spectrum of the mixture obtained after solubilization of the TBZ and citric acid in

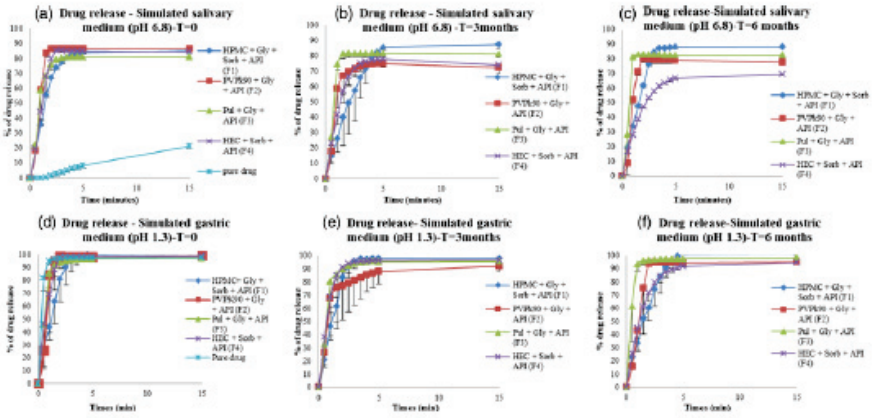


Figure 1 Drug release profiles of the TBZ alone (pure drug) and the TBZ in ODF in salivary conditions (pH 6.8): at T0 (a), after 3 months (b) and 6 months (c); in gastric media (pH 1.3): at T0 (d), after 3 months (e) and 6 months (f).

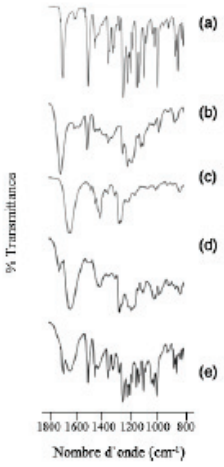


Figure 2 FT-IR spectra of pure TBZ (a), TBZ-CA mixture (b), PVP blank film (c), TBZ-loaded in ODF composed of PVP K90 at T0 (d) and $T = 3$ months (e).

water followed by drying. A merge of the carbonyl peaks present in the TBZ (1697 cm^{-1}) and citric acid (1691 cm^{-1}) in a more intense peak with a shift towards lower wavelengths (1714 cm^{-1}) was observed. The peaks corresponding to other characteristic functions were not modified. For each type of ODF formulation, the presence of peaks characteristic of aromatic, ether and amine functions was observed (Table 3). Peaks corresponding to carbonyl function observed in the various mixtures were retrieved in final formulations. After 1, 3 or 6 months of storage, no major changes were observed except for PVP-ODF (F2) and HEC-ODF (F4). At $T = 3$ months, carbonyl peaks of the PVP-ODF (F2) formulation were split (Figure 2e), and at $T = 6$ months, a shift of carbonyl peak was observed for HEC-ODF (F4).

Thermal analysis

The DSC thermograms of pure TBZ, physical mixtures and TBZ-loaded in ODF are shown in Figure 3. Sharp melting peak of API can be observed at about 129 °C (Figure 3a). No drug melting peak was observed in the thermograms of ODF formulations (Figure 3c,e,g,i), whereas thermograms of physical mixtures showed a distinct shift peak of TBZ (Figure 3b,d,f,h) towards lower temperatures, at about 123 °C. After 6 months of stability, no melting peak of TBZ was observed for HPMC-ODF (F1) and PUL-ODF (F3). However, endothermic peak was present for PVP-ODF (F2) (Figure 4b,c,d) at about 114 °C from 1 month and became more intense after 3 months. For HEC-ODF (F4), endothermic peak at 114 °C appeared after 6 months only (Figure 4e).

Polarizing microscopy

By polarizing microscopy (Figure 5a), no crystals were observed in ODF at T0 whatever the formulation. But after

Table 3 Peak positions of different function groups in the IR spectrum for TBZ, CA, mixture TBZ-CA, polymers used in the preparation of ODF and ODF at T0 and after $T = 1$ month and $T = 3$ months of storage

Compounds/ODF	C=O (cm^{-1})	C=C (cm^{-1})	C-N (cm^{-1})	C-O-C (cm^{-1})
TBZ	**1697; 1257**	1605; 1514; 1462	1226	1107
CA	1691	–	–	–
TBZ + CA	1714; 1261	1612; 1518; 1465	1224	1113
HPMC + Gly + Sorb + CA	1722	–	–	1036
PVP k90 + Gly + CA	1718.5; 1641; 1288	–	1207	–
Pullulan + Gly + CA	1717	–	–	1012
HEC + Sorb + CA	1722	–	–	1050; 1022
HPMC-ODF (F1)	1726; 1261	1605; 1518; 1450	–	1105; 1047
F1 (3 months)	1726; 1263	1612; 1517	1226	1109; 1037
F1 (6 months)	1723; 1262	1610; 1520; 1410	1225	1039
PVP-ODF (F2)	1726; 1647; 1288	1649; 1514	1200	1114
F2 (3 months)	**1693,5;** 1651; 1285; **1256**	1514; 1462	1226	1107
F2 (6 months)	**1694;** 1649; 1288; **1256**	1520; 1462	1206	1110; 1043
PUL -ODF (F3)	1718; 1261	1598; 1518	1224	1111; 1016
F3 (3 month)	1722; 1261	1602; 1519	1226	1112
F3 (6 months)	1720; 1225	1610; 1520	1225	1112; 1023
HEC-ODF (F4)	1722; 1261	1612; 1518; 1457	1224	1112; 1026
F4 (3 month)	1722; 1261	1612; 1519	1226	1112; 1024
F4 (6 months)	1721; **1700; 1257**	1610; 1514	1226	1107; 1010

bold values correspond to the characteristic carbonyl peaks of pure TBZ.

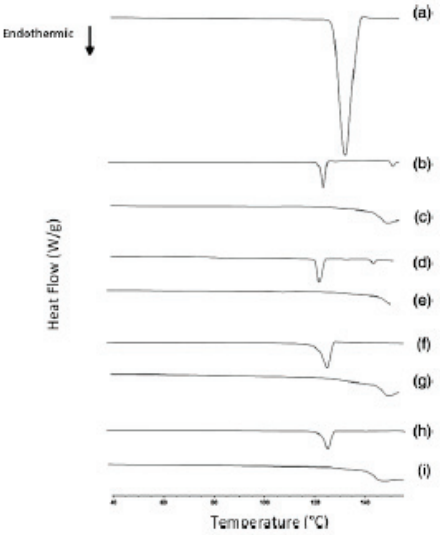


Figure 3 DSC thermograms of pure TBZ (a), physical mixtures TBZ/HPMC (b), TBZ/PVP (d), TBZ/PUL (f), TBZ/HEC (h) and TBZ-loaded in HMPC-ODF (c), PVP-ODF (e), PUL-ODF (g) and HEC-ODF (i) at T0.

1 month, crystals appeared in PVP-ODF (F2) and grow with time up to occupy the entire surface of the film. For HEC-ODF (F4) (Figure 5b), the drug started to

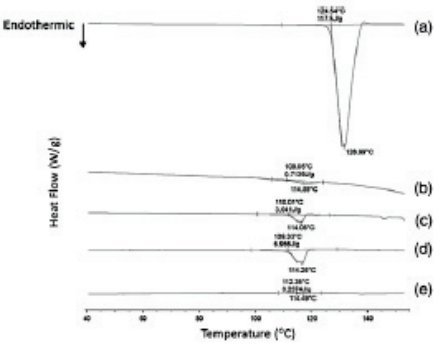


Figure 4 DSC thermograms of pure TBZ (a), TBZ-loaded in PVP-ODF (F2) at $T = 1$, 3, 6 months (b, c, d, respectively) and TBZ-loaded in HEC-ODF (F4) at $T = 6$ months (e).

recrystallize after 3 months while for HPMC-ODF (F1) and PUL-ODF (F3) no crystals were observed during all the stability study (Figure 5b,c).

Discussion

Four formulations of ODF for paediatric administration of tetrabenazine were developed using four different film-forming agents: HPMC, PVP K90, pullulan and HEC. These polymers were chosen for their well-described ability

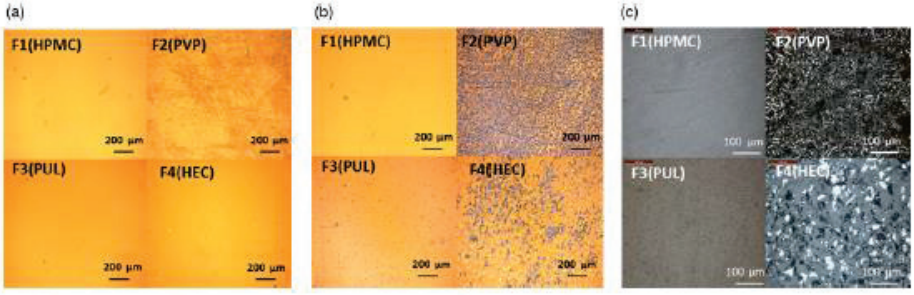


Figure 5 Polarized light microscopy images of TBZ-loaded in ODF: HMPC-ODF (F1), PVP-ODF (F2), PUL-ODF (F3) and HEC-ODF (F4) at T0 (a), after 3 months (b) and 6 months (c).

to form thin and resistant films, their high hydrosolubility and their safety.[4,5] After preparation, each film presented suitable morphological properties with a homogenous and transparent aspect. A slight yellowing was observed at T0 for HMPC formulation mainly due to the polymer coloration. During preformulation experiments, we observed that the addition of TBZ in the polymeric matrix increased the brittleness of HPMC, PVP and PUL-ODF (data not shown). However, the incorporation of a plasticizer like glycerol into these formulations has restored the mechanical properties allowing the manipulation of film without risk of breakage. These mechanical properties were characterized in this study by both the folding endurance evaluation and Young's modulus quantification (Table 2). The folding endurance gives an indication of the flexibility and so the brittleness of the film. HPMC-ODF appeared as the more flexible formulation as it was not broken after more than 100 foldings. PVP-ODF was the less flexible (around 46 foldings) despite the use of plasticizer. Rigidity and strength of each ODF formulation can be also compared by their Young's modulus. Young's modulus values obtained for ODF were closed to the values providing from the literature.[9] The four ODF formulations presented low values of Young's modulus (between 80 and 190 kPa) confirming their high flexibility. However, HPMC-ODF appeared as the strongest ODF. The same observations were described in the literature. Woertz *et al.* demonstrated that the maximum force and the tensile strength were higher for the HPMC films compared with HPC films (e.g.[25]). Moisture content and plasticizers could explain these Young's modulus values by improving the mobility of the polymer chains. Moreover, solid content in ODF could increase the Young's modulus values as described by Sievens-Figueroa *et al.*[8] In our case, the highest value of Young's modulus was obtained for the HPMC-ODF which had the highest solid content.

No loss of TBZ occurred during the fabrication process of ODF because as expected the average drug content in ODF was around 12.5 mg/film of 4 cm^2, corresponding to a load of TBZ between 15.0 and 16.9% (w/w) depending of ODF thickness. Biopharmaceutical trends of ODF were also considered in this study. Each ODF formulation was quickly disintegrated in saliva-simulated conditions at 37 °C, with mean disintegration times lower than 50 s. This rapid disintegration aimed to improve the release of the drug for both oromucosal absorption and further gastrointestinal absorption when ODF residues are swallowed. This rapid disintegration also ensures comfort and convenience of administration.[23,26]

In-vitro drug release studies in salivary conditions underlined the major effect of the ODF form on TBZ dissolution improvement. For the four formulations, around 85% of TBZ was released after 5 min whereas only 10% of pure TBZ was dissolved and 38.8 ± 1.2% after 1 h. This slow dissolution of pure TBZ is due to its poor solubility at pH 6.8. Statistical analyses showed significant differences between pure drug and ODF testifying enhancement of drug solubility in salivary medium. Moreover, significant differences between PVP-ODF and PUL-ODF indicated that drug release in PVP-ODF was significantly greater than PUL-ODF in terms of solubility enhancement. The incorporation of TBZ into polymeric matrix to form ODF led to a major improvement of drug dissolution properties and then to its better bioavailability in oromucosal environment. This improvement of dissolution properties of TBZ may be explained by the state of TBZ in ODF. Same observations were made by Cilurzo *et al.*[26] and Kianfar *et al.*,[27] who studied the dissolution profile of water-insoluble drug incorporated in maltodextrins, carrageenan and poloxamer ODF. They assumed that its improvement was mainly due to the hydrophilic nature of the polymeric matrix allowing an enhancement of the API wettability and

also to the state of the API in the ODF. Drugs in ODF were either dispersed in the matrix or solubilized.[25] In our case, TBZ was previously solubilized in water with citric acid and then introduced into the polymer matrix. After drying, TBZ remained dissolved in the polymer matrix. This hypothesis was confirmed by polarized microscopy analyses as no crystal was observed in the four film formulations. Same observations also derived from thermal analyses. Indeed, at T0, no melting peaks corresponding to API were observed on DSC thermograms for all ODF (Figure 3). TBZ in ODF was in amorphous state allowing the improvement of drug dissolution.[28] In addition, analysis of physical mixtures of the excipients with the API showed a distinct shift of the drug melting peak. This observation suggested interactions between TBZ and polymers.[29] Moreover, FT-IR results at T0 confirmed this intermolecular interaction in ODF between excipients and TBZ as a shift of the carbonyl peak was observed (Figure 2).

To summarize, at T0, only few differences were highlighted between properties of the various ODF. All the ODF were homogeneous, presented suitable mechanical properties for easily handling. Moreover, whatever the film-forming polymer used, TBZ was in amorphous state in the ODF allowing an accelerated release of the API in a mimicking buccal environment. However, the formulation of ODF implies some challenges in terms of polymeric films and API stability. Therefore, to provide elements for discriminating formulations, stability tests were carried out during 6 months in accelerated storage conditions (40 °C and 75% HR) according to the ICH guidelines. After 3 months of storage, the amount of TBZ-loaded in PVP-ODF decreased by 5% and the same trend was observed for HEC-ODF after 6 months. While these differences were not statistically significant, these slight decreases of the drug content were associated with an opacification of PVP-ODF and HEC-ODF. For HPMC-ODF and PUL-ODF, the TBZ content remained unchanged and no opacification was observed after 6 months. However, a slight yellowing of the films was observed for HMPC, PUL and HEC-ODF that could result from the occurrence of some impurities. However, this yellowing of TBZ was not necessarily associated with a loose of the drug amount as previously described by Bourezg *et al.*[30] Some modifications of the TBZ dissolution behaviours at pH 6.8 were also observed for PVP-ODF and HEC-ODF during stability studies. After 3 months, a decrease in the TBZ amount released occurred for ODF-PVP with a mean of 75% of TBZ dissolved after 5 min compared with 87% for the newly prepared film, but this difference was not statistically significant. The decrease is more important with HEC-ODF after 6 months of storage as only 69% of the TBZ content was dissolved in 5 min. Indeed, significant differences were observed for HEC-ODF between $T = 0$ and $T = 6$ months, in salivary and gastric media, showing a slower release profile of TBZ after storage for this formulation. However, no significant modifications of the TBZ release profile were observed for HMPC-ODF and PUL-ODF after 6 months of storage. These major changes on PVP-ODF or HEC-ODF properties could be explained by the evolution of API state in the film. Indeed, thermal and microscopy polarizing analyses (Figures 3 and 4) demonstrated the emergence of crystals in films. In addition, FT-IR showed, after 3 months for PVP-ODF and 6 months for HEC-ODF, duplication of the peak corresponding to carbonyl. These two peaks corresponded to the carbonyl wavelength of both pure TBZ and polymer blank film. The apparition of these peaks reflected the loss of molecular interactions between drug and polymer that would promote molecular mobility, increasing drug–drug interactions and TBZ recrystallization.

In the first place (at T0), TBZ was under an amorphous state in the four ODF formulations, probably subsequent to the formation of solid dispersions. This amorphous state led to the improvement of TBZ dissolution properties.[31] To maintain these biopharmaceutical properties, the challenge is to inhibit drug crystallization in films. In the case of solid dispersions, the inhibition of the API recrystallization is mainly due to the strength of drug–polymer interactions predominant under drug–drug interactions.[29] However, for several reasons such as high hygroscopy of the polymer and poor drug–polymer miscibility, API recrystallization often occurs. In our study, TBZ recrystallization surprisingly occurred in PVP-ODF, although many authors have suggested the use of PVP as a good polymer to inhibit drug crystallization.[32,33] On the opposite, no TBZ recrystallization was observed in our study for HMPC-ODF. Meng *et al.*[31] also observed a better stability of their model drug curcumin (CUR) in a HPMC-CUR system than in a PVP-CUR. They suggested that with HPMC, the polymer–drug interactions were strong enough to avoid drug–drug or polymer–polymer interactions and then subsequent recrystallization of the drug. Besides the strength of polymer–drug interactions, the type of interactions, such as ionic or H-bond interactions, also affects the drug stability. Some authors described that the ability of polymers to form H-bond with drug, avoiding drug–drug dimerization, played a major role in the crystallization inhibition of the drug.[34] Meng *et al.*[31] suggested that molecular interactions by H-bond, occurring between drug and polymer, can be correlated to the number of the potential hydrogen bond donors or receptors of the polymer and the drug. In our case, TBZ has four hydrogen bond receptors. According to Meng *et al.*, PVP monomer has one hydrogen bond receptor and HPMC monomer has five hydrogen bond receptors and one hydrogen bond donor. Therefore, for PVP the number of potential functional group which might interact with TBZ is minor compared with HPMC. This might

explain recrystallization of TBZ in PVP-ODF and its better stability in HMPC.[31] In addition, moisture increases the molecular mobility of the particles and promotes molecule rearrangement to form aggregates that will organize in crystals.[29] Moisture present during the manufacture and preservation induced phase separation in particular when the polymer is very hygroscopic and the API hydrophobic.[29] Rearrangement of API could be anticipated by study of miscibility and molecular interaction capacities.[31] Further investigations have to be performed in our case to investigate the formation of solid dispersions and their stability for each polymer formulations.

ODF properties during 6 months allowed identifying optimal formulations based on the HMPC and pullulan matrices (F1 and F3). Indeed, these ODF kept all characteristics obtained at T0: physicochemical and mechanical aspect, dissolution behaviours in salivary and gastric media and amorphous state of the drug in films even after 6 months of storage. For other formulations with PVP and HEC, a TBZ recrystallization was observed after 3 or 6 months leading to a loss of the dissolution improvement effect of ODF. Maintaining API in amorphous state in ODF represents a major challenge to ensure the stability of drug and ODF biopharmaceutical properties.

Conclusion

In this study, four formulations of ODF for children were developed with several polymer matrices. Evaluation of the

References

1. Strickley R *et al.* Pediatric drugs—a review of commercially available oral formulations. *J Pharm Sci* 2008; 97: 1731–1774. doi:10.1002/jps.21101.
2. Food and Drug Administration, Specific Requirements on Content and Format of Labeling for Human Prescription Drugs; Revision of "Pediatric Use" Subsection in the Labeling; Final Rule. Federal Register Volume 59, Number 238, December 1994.
3. Ali A *et al.* Pediatric drug development: formulation considerations. *Drug Dev Ind Pharm* 2014; 40: 1283–1299. doi:10.3109/03639045.2013.850713.
4. Bala R *et al.* Orally dissolving strips: a new approach to oral drug delivery system. *Int J Pharm Investig* 2013; 3: 67–76. doi:10.4103/2230-973X.114897.
5. Dixit RP, Puthli SP. Oral strip technology: overview and future potential. *J Control Release* 2009; 139: 94–107. doi:10.1016/j.jconrel.2009.06.014.
6. Morales JO, McConville JT. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 77: 187–199. doi:10.1016/j.ejpb.2010.11.023.
7. Shen B *et al.* Development and characterization of an orodispersible film containing drug nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 85: 1348–1356. doi:10.1016/j.ejpb.2013.09.019.
8. Sievens-Figueroa L *et al.* Preparation and characterization of hydroxypropyl methyl cellulose films containing stable BCS class II drug nanoparticles for pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 2012; 423: 496–508. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.001.
9. Qiao Jun Low A *et al.* Effect of type and ratio of solubilising polymer on characteristics of Hot-Melt Extruded Orodispersible Films. *Int J Pharm* 2013; 455: 138–147. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.046.
10. Sakata Y, Otsuka M. Evaluation of relationship between molecular behaviour and mechanical strength of pullulan films. *Int J Pharm* 2009; 374: 33–38. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.02.019.
11. Okabe H *et al.* Development of an easily swallowed film formulation. *Int J Pharm* 2008; 355: 62–66. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.11.038.
12. Raju DB, Prem Kumar G. Polyvinylpyrrolidone oral films of enrofloxacin: film characterization and drug release. *Int J Pharm* 2014; 471: 146–152. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.05.033.
13. Karavas E *et al.* Application of PVP/HPMC miscible blends with enhanced mucoadhesive properties for adjusting drug release in predictable pulsatile chronotherapeutics. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 64: 115–126. doi:10.1016/j.ejpb.2005.12.013.
14. Luo K *et al.* Mucoadhesive and elastic films based on blends of chitosan and hydroxyethylcellulose. *Macromol Biosci* 2008; 8: 184–192. doi:10.1002/mabi.200700185.
15. Pathare YS *et al.* Polymers used for fast disintegrating oral films : a review. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2013; 21: 169–178.
16. Fabiano V *et al.* Paediatric pharmacology: remember the excipients. *Pharm Res* 2011; 63: 362–365. doi:10.1016/j.phrs.2011.01.006.
17. Walsh J *et al.* Playing hide and seek with poorly tasting paediatric medicines: do not forget the excipients. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;. doi:10.1016/j.addr.2014.02.012.
18. European Medicines Agency. Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use, EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev. 2, adopted July 2013.
19. Guay D. Tetrabenazine, a monoamine-depleting drug used in the treatment of hyperkinetic movement disorders. *Am J Geriatr Pharmacother* 2010; 8: 331–373. doi:10.1016/j.amjopharm.2010.08.006.
20. Jain S *et al.* Tetrabenazine therapy of pediatric hyperkinetic movement disorders. *Mov Disord* 2006; 21: 1966–1972. doi:10.1002/mds.21063.

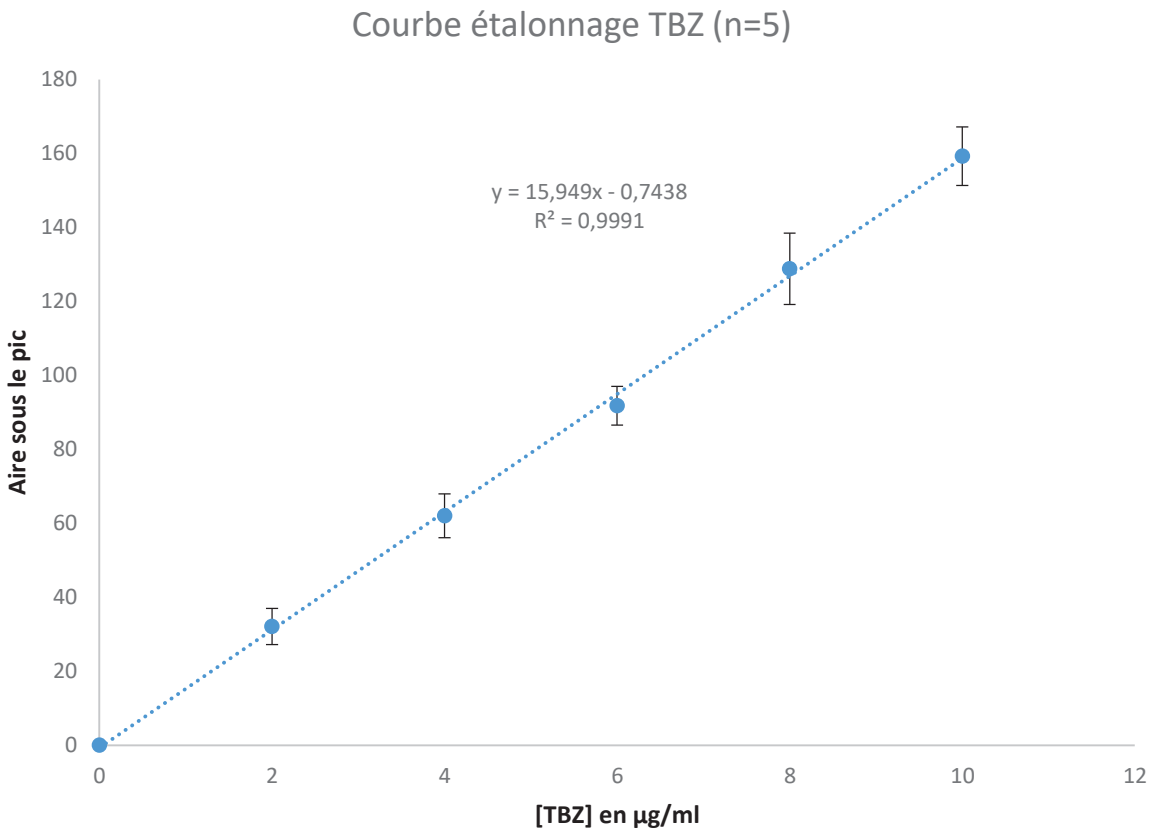
© 2016 Royal Pharmaceutical Society,

21. Chen J *et al.* Tetrabenazine for the treatment of hyperkinetic movement disorders: a review of the literature. *Clin Thera* 2012; 34: 1487–1504. doi:10.1016/j.clinthera.2012.06.010.
22. Gittings S *et al.* Dissolution methodology for taste masked oral dosage forms. *J Control Release* 2014; 173: 32–42. doi:10.1016/j.jconrel.2013.10.030.
23. Sayed S *et al.* Fast-dissolving sublingual films of terbutaline sulfate: formulation and in vitro/in vivo evaluation. *Mol Pharm* 2013; 10: 2942–2947. doi:10.1021/mp4000713.
24. Nalluri BN *et al.* Development and evaluation of mouth dissolving films of sumatriptan succinate for better therapeutic efficacy. *J Appl Pharm Sci* 2013; 3: 161–166. doi:10.7324/JAPS.2013.3828.
25. Woertz C *et al.* Development of orodispersible polymer films with focus on the solid state characterization of crystalline loperamide. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 94: 52–63. doi:10.1016/j.ejpb.2015.04.036.
26. Cilurzo F *et al.* Fast dissolving films made of maltodextrins. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 70: 895–900. doi:10.1016/j.ejpb.2008.06.032.
27. Kianfar F *et al.* Novel films for drug delivery via the buccal mucosa using model soluble and insoluble drugs. *Drug Dev Ind Pharm* 2012; 38: 1207–1220. doi:10.3109/03639045.2011.644294.
28. Xu L *et al.* Formulation and in vitro characterization of novel sildenafil citrate-loaded polyvinyl alcohol-polyethylene glycol graft copolymer-based orally dissolving films. *Int J Pharm* 2014; 473: 398–406. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.07.037.
29. Baird J, Taylor L. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64: 396–421. doi:10.1016/j.addr.2011.07.009.
30. Bourezg Z *et al.* Structural elucidation of two photolytic degradation products oftetrabenazine. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 91: 138–143. doi:10.1016/j.jpba.2013.12.032.
31. Meng F *et al.* Investigation and correlation of drug polymer miscibility and molecular interactions by various approaches for the preparation of amorphous solid dispersions. *Eur J Pharm Sci* 2015; 71: 12–24. doi:10.1016/j.ejps.2015.02.003.
32. Yoshioka M *et al.* Inhibition of indomethacin crystallization in poly (vinylpyrrolidone) coprecipitates. *J Pharm Sci* 1995; 84: 983–986. doi:10.1002/jps.2600840814.
33. Khougaz K, Clas SD. Crystallization inhibition in solid dispersions of MK-0591 and poly(vinylpyrrolidone) polymers. *J Pharm Sci* 2000; 89: 1325–1334. doi:10.1002/1520-6017(200010)89:10<1325:AID-JPS10>3.3.CO;2-X.
34. Matsumoto T, Zografi G. Physical properties of solid molecular dispersions of indomethacin with poly(vinylpyrrolidone) and poly (vinylpyrrolidone-co-vinylacetate) in relation to indomethacin crystallization. *Pharm Res* 1999; 16: 1722–1728. doi:10.1023/A:1018906132279.

Annexe 3 : Matériel et méthodes de l'analyse par LC-MS

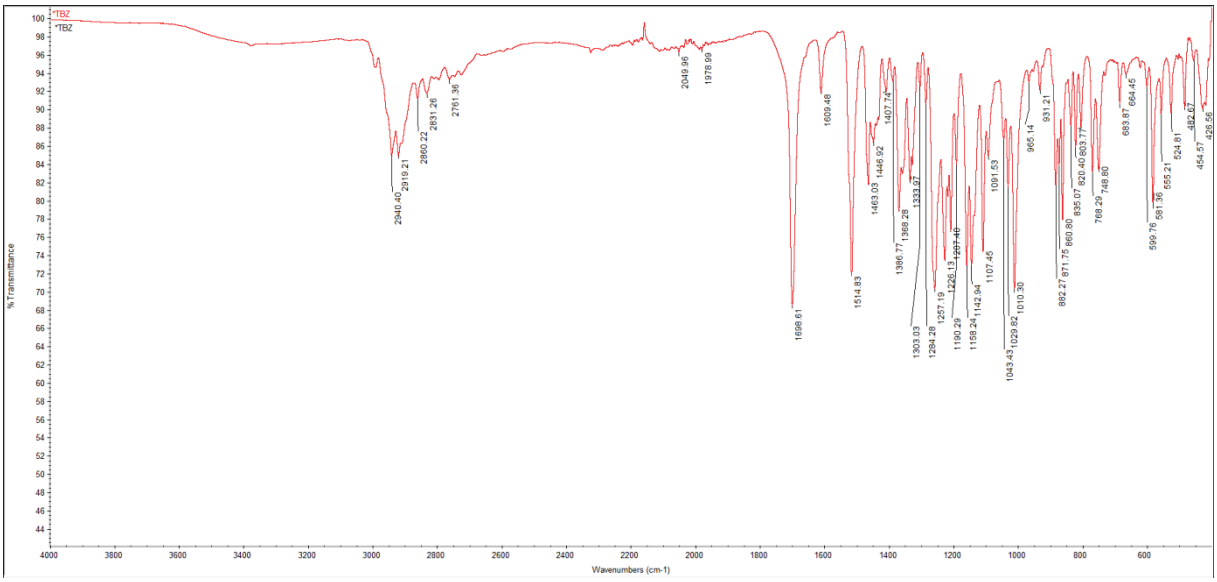
uHPLC	Agilent 1290 Infinity
DAD (diode array detector)	Agilent 1260 Infinit
MS	Agilent 6120 Quadrupole
Colonne	Zorbax Eclipse + C18 2.1mm*50mm*1.8µm
Température de la colonne	40°C
Volume d'injection	0.1 µL
Débit	0.5 mL/min
Phase mobile Mode d'élution isocratique	55% tampon acétate d'ammonium 10 mM pH 4.5 45% ACétoNitrile (ACN) optima
DAD pour l'HPLC détecteurs à barrettes de diodes	254 (universel) 575 (jaune) 350 (impureté m/z 316) 282 (maximum d'absorption de la TBZ)
MSD1	Total Ion Current TIC Full scan 100-1000 fragmentor 130
MSD2	Selected Ion Monitoring SIM [314.2] $(TTBZ-H)^+$ [316.2] $(DTBZ-H)^+$ [318.2] $(TBZ-H)^+$ [336.2] $(TBZ-H_2O)^+$
Température du gaz	350°C
Débit du gaz (drying gas)	12L/min
Pression du nébuliseur	35 psig
Voltage du capillaire	3000V

Annexe 4 : Courbe d'étalonnage de la TBZ

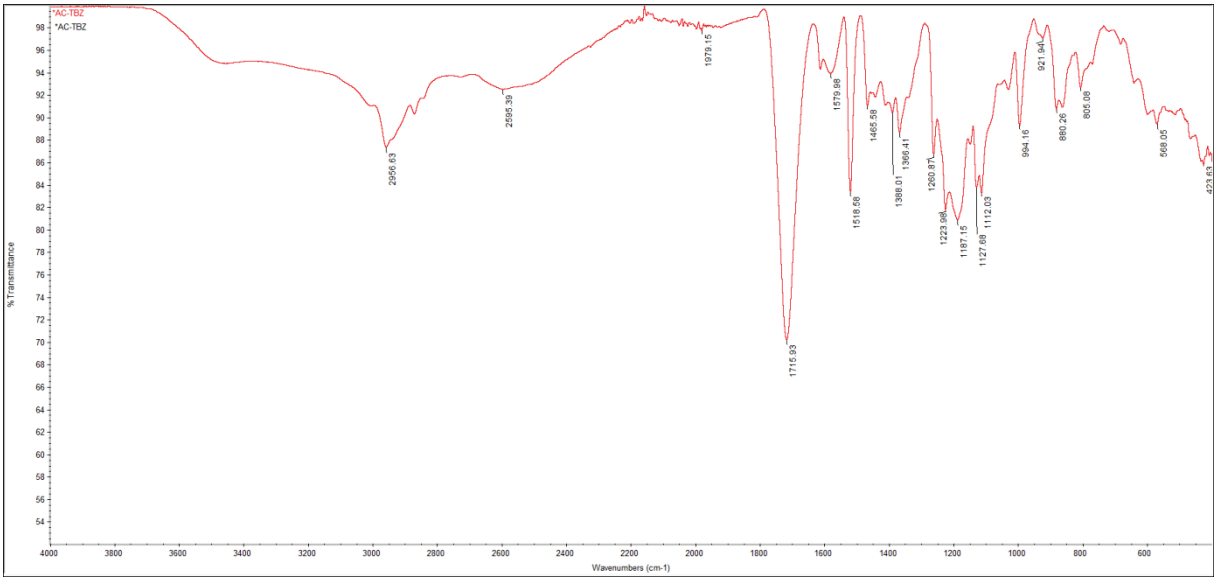


Annexe 5 : Spectres FT-IR des composés purs

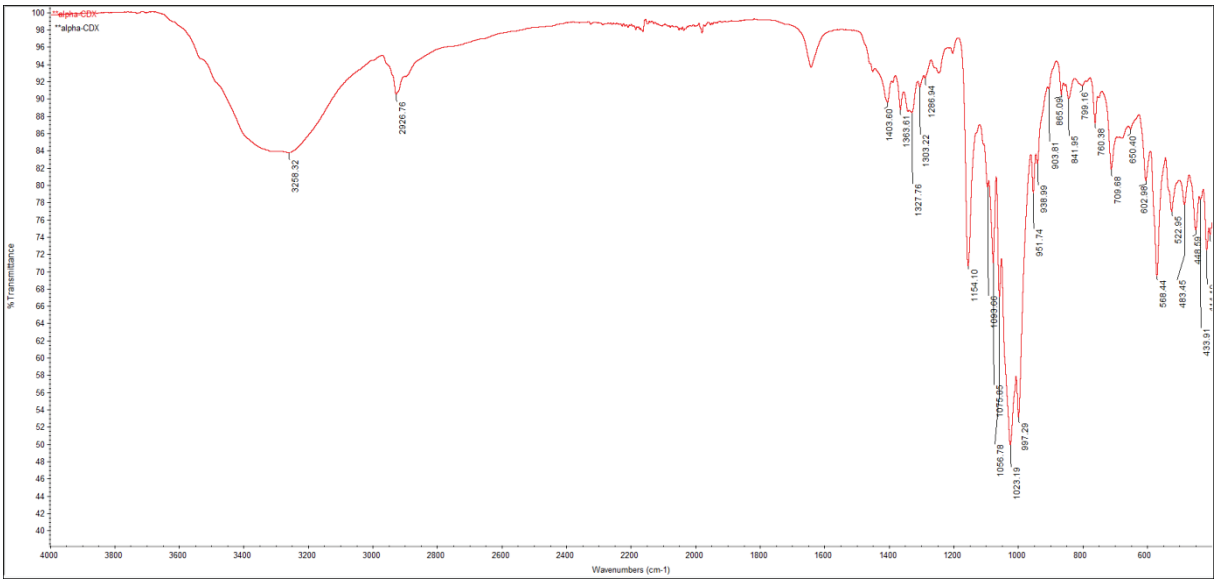
Spectre de la TBZ :



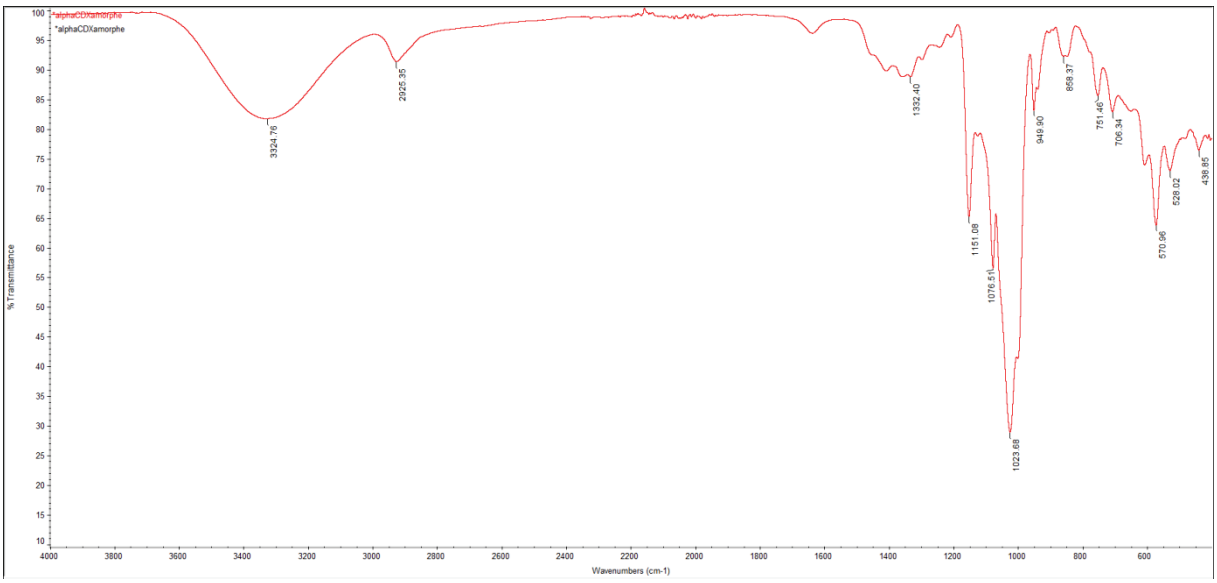
Spectre du mélange TBZ-Acide citrique :



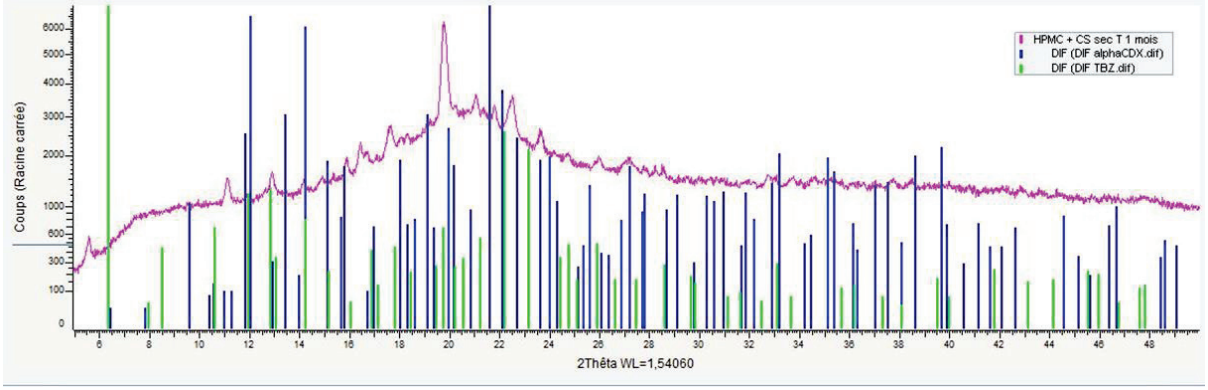
Spectre l'α-Cyclodextrine :



Spectre de l'α-Cyclodextrine après séchage par atomisation :



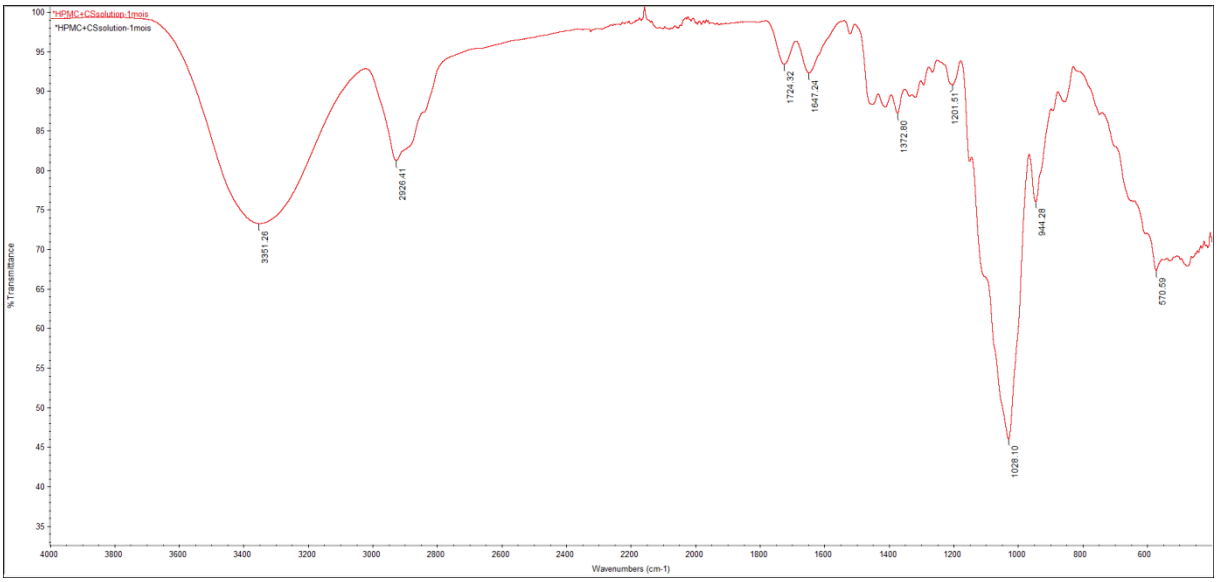
Annexe 6 : Comparaison des pics de diffraction apparus après 1 mois de stockage avec les pics caractéristiques de la TBZ et l'α-CD.



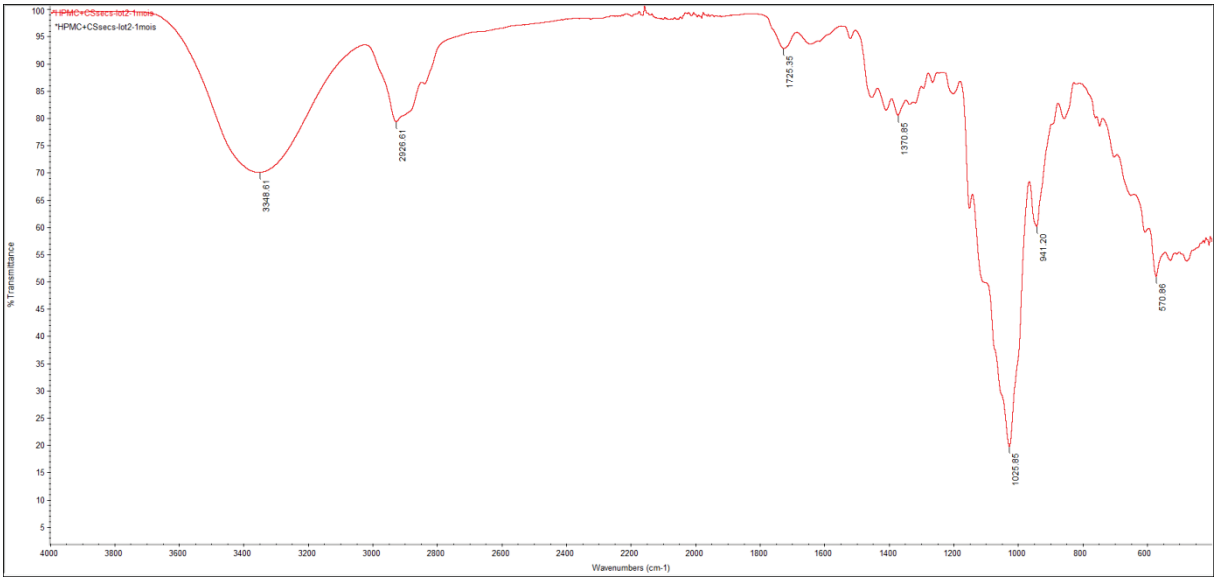
DIF= Distance and Intensity File. Un DIF contient la liste des pics détectés par calcul dans un diagramme DRX et placés délibérément dans ce type de fichier. Il s'agit d'une liste de paires (d,i) pour chaque pic du diffractogramme.

Annexe 7 : Spectres FT-IR des ODF contenant les CI- T=1mois.

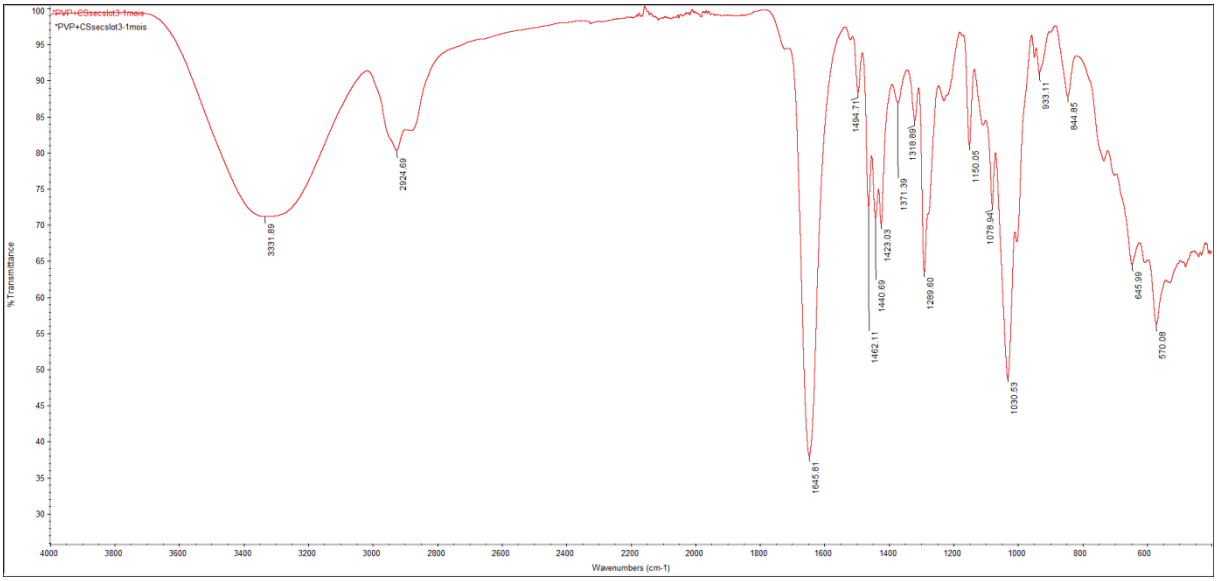
Spectre HPMC-ODF+CI(1) :



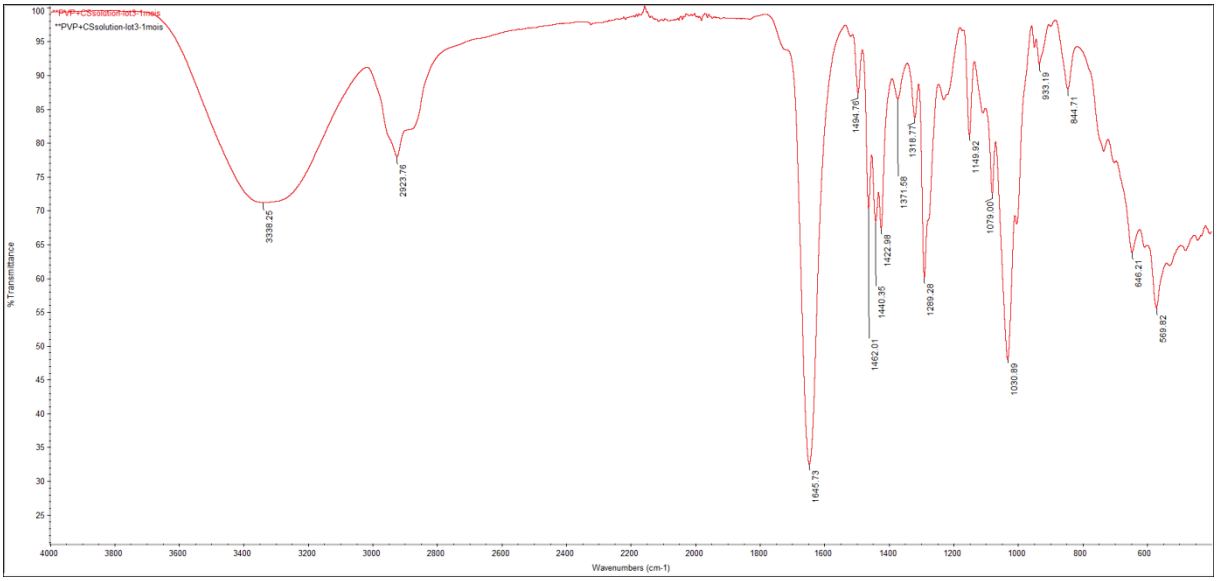
Spectre HPMC-ODF+CI (2) :



Spectre PVP-ODF+CI (1):



Spectre PVP-ODF+CI(2):



Annexe 8 : Scores attribués par le panel de volontaires.

	TESTEUR																					
FORMULE	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**moyenne**	**Ecart type**
T=10 secondes																						
F1	3	0	1	1	2	1	2	0	1	1	1	2	0	0	1	1	3	0	1	2	1,15	0,9
F2	2	0	1	2	1	1	2	2	1	2	0	2	0	0	1	0	0	0	1	1	0,95	0,8
F3	0	0	1	1	1	0	1	0	1	2	1	2	0	1	1	0	0	0	1	1	0,7	0,7
F4	0	0	2	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2	0	0	1	0,6	0,8
T=30 secondes																						
F1	3	1	1	1	0	1	2	0	2	3	2	2	1	0	2	1	2	1	1	2	1,4	0,9
F2	2	0	0	1	0	1	2	2	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	1	2	0,9	0,9
F3	0	0	1	1	0	1	2	0	2	3	2	2	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0,9
F4	0	1	2	1	0	2	1	3	1	0	1	2	0	1	0	3	2	0	0	2	1,1	1,0
T=1 minute																						
F1	3	0	0	0	0	0	2	1	2	3	2	1	1	0	1	2	2	1	1	2	1,2	1,0
F2	3	0	0	1	0	1	2	3	2	2	2	2	1	0	1	1	0	0	0	2	1,15	1,0
F3	3	0	0	0	0	1	1	0	2	2	2	1	1	0	1	1	1	2	0	2	1	0,9
F4	0	2	0	1	0	2	2	3	2	1	1	2	0	0	0	3	2	0	0	2	1,15	1,1
T=2 minutes																						
F1	3	0	0	0	0	1	1	0	0	2	2	1	0	0	1	1	2	0	0	2	0,8	1,0
F2	2	0	0	1	0	1	2	2	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0,7	0,7
F3	2	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1	2	0	0	0	1	1	2	0	2	0,75	0,9
F4	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	3	1	1	0	1	0,6	0,8
T=3 minutes																						
F1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0,45	0,5
F2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,25	0,4
F3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0,4	0,5
F4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	3	1	0	0	1	0,5	0,8
T=4 minutes																						
F1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,2	0,4
F2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,1	0,3
F3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0,25	0,4
F4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0,25	0,6
T=5 minutes																						
F1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,15	0,4
F2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
F3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,3
F4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,1	0,3

REFERENCES

- Abruzzo A., Bigucci F., Cerchiara T., Vitali B., Luppi B., 2012. Mucoadhesive Chitosan/gelatin Films for Buccal Delivery of Propranolol Hydrochloride," Carbohydrate Polymers 87, no. 1: 581–88.
- Académie nationale de pharmacie, Promouvoir les médicaments pédiatriques- Recommandations de l'Académie nationale de pharmacie. 2012. http://www.acadpharm.org/dos_public/Recommandations_mEdicaments_pEdiatriques_VF_2012.06.14.pdf. Consulté le 27.05.2016.
- Adrover A., Pedacchia A., Petralito S., Spera R., 2015. In Vitro Dissolution Testing of Oral Thin Films: A Comparison between USP 1, USP 2 Apparatuses and a New Millifluidic Flow-through Device. Chemical Engineering Research and Design 95: 173–78.
- Amidon G., Iennernas H., Shah V., Crison J., 1994. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification : The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavaibility. Pharmaceutical Research 12, no. 3.
- Anand V., Kararia M., Kukkar V., Saharan V., Choudhury PK., 2007. The Latest Trends in the Taste Assessment of Pharmaceuticals. Drug Discovery Today 12, no. 5–6: 257–65.
- Arya A., Chandra A., Sharma V., Kamla P., 2010. Fast Dissolving Oral Films: An Innovative Drug Delivery System and Dosage Form. International Journal of ChemTech Research, 2010.
- Avachat A.M., Gujar K.N., Wagh K.V., 2013. Development and Evaluation of Tamarind Seed Xyloglucan-Based Mucoadhesive Buccal Films of Rizatriptan Benzoate," Carbohydrate Polymers 91, no. 2: 537–42.
- Ayenew Z., Puri V., Kumar L., 2009. Trends in Pharmaceutical Taste Masking Technologies: A Patent Review. Recent Patents on Drug Delivery and Formulation. Vol. 3(1), p. 26‑39
- Baghel S., Cathcart H., and O'Reilly N.J., 2016. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. Journal of Pharmaceutical Sciences 105: 2527-44.
- Baird J. and Taylor L.S., 2012. Evaluation of Amorphous Solid Dispersion Properties Using Thermal Analysis Techniques," Advanced Drug Delivery Reviews 64, no. 5: 396–421.
- Bajdik J., Regdon G., Marek T., Eros I., Suvegh K., Pintye H., 2005. The Effect of the Solvent on the Film-Forming Parameters of Hydroxypropyl-Cellulose. International Journal of Pharmaceutics 301, no. 1–2: 192–98.
- Bala R., Khanna S., Pawar P., Arora S., 2013. Orally Dissolving Strips: A New Approach to Oral Drug Delivery System. Int J Pharm Investigation 3: 67-76.
- Batchelor H.K. and Mariott J.F., 2013. Application of in Vitro Biopharmaceutical Methods in Development of Immediate Release Oral Dosage Forms Intended for Paediatric Patients, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 85, no. 3: 833–42.
- Bellis J.R., Kirkham J.J., Nunn A.J., Pirmohamed M., 2014. Adverse Drug Reactions and off-Label and Unlicensed Medicines in Children: A Prospective Cohort Study of Unplanned Admissions to a Paediatric Hospital: Adverse Drug Reactions and off-Label and Unlicensed Medicines in Children. British Journal of Clinical Pharmacology 77, no. 3: 545–53.
- Bergo P., Moraes I.C.F, Sobral P.J.A.,2013. Effects of Plasticizer Concentration and Type on Moisture Content in Gelatin Films," Food Hydrocolloids 32, no. 2: 412–15.
- Bhise K., Shaikh S., and Bora D., 2008. Taste Mask, Design and Evaluation of an Oral Formulation Using Ion Exchange Resin as Drug Carrier. AAPS Pharm Sci Tech 9, no. 2: 557–62.
- Borges A., Silva C., Coelho J., Simoes S., 2015. Oral Films: Current Status and Future Perspectives. Journal of Controlled Release 206: 1–19.

- Borges A. Silva C., Coelho J., Simoes S., 2015. Oral Films: Current Status and Future Perspectives II — Intellectual Property, Technologies and Market Needs. Journal of Controlled Release 206: 108–21.
- Bouchal F., Skiba M., Chaffai N., Hallouard F., Fatmi S., Lahiani-Skiba M., 2015. Fast Dissolving Cyclodextrin Complex of Piroxicam in Solid Dispersion Part I: Influence of β-CD and HPβ-CD on the Dissolution Rate of Piroxicam," International Journal of Pharmaceutics 478, no. 2: 625–32.
- Bourezg Z., Ettouati L., Le Borgne M., Fessi H., 2014. Structural Elucidation of Two Photolytic Degradation Products Oftetrabenazine. J Pharm Biomed Anal 91: 138–43.
- Bowles A., Keaneb J., Ernestc T., Claphamd D., Tuleu C., 2010. Specific Aspects of Gastro-Intestinal Transit in Children for Drug Delivery Design. International Journal of Pharmaceutics 395, no. 1–2: 37–43.
- Broman E., Khoo C., Taylor L.S., 2001. A Comparison of Alternative Polymer Excipients and Processing Methods for Making Solid Dispersions of a Poorly Water Soluble Drug. International Journal of Pharmaceutics 222: 139-51.
- Brewster M.E., Loftsson T., 2007. Cyclodextrins as Pharmaceutical Solubilizers. Advanced Drug Delivery Reviews 59, no. 7: 645–66.
- Brewster M.E., Vandecruys R., Peeters J., Neeskens P., Verreck G., Loftsson T., 2008. Comparative Interaction of 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin and Sulfobutylether-β-Cyclodextrin with Itraconazole: Phase-Solubility Behavior and Stabilization of Supersaturated Drug Solutions. European Journal of Pharmaceutical Sciences 34, no. 2–3: 94–103.
- Brouwers J., Brewster M.E., Augustijns P, 2009. Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability?. Journal of Pharmaceutical Sciences 98, no. 8: 2549–72.
- Bugay D., 2000. Characterization of the Solid-State : Spectroscopic Techniques," Advanced Drug Delivery Reviews 48: 43-65.
- Carrier R.L., Miller L.A., Imran A., 2007. The Utility of Cyclodextrins for Enhancing Oral Bioavailability, Journal of Controlled Release 123, no. 2: 78–99.
- Castro P., Fonte P., Sousa F., Madureira AR., Sarmento B., Pintado ME., 2015. Oral Films as Breakthrough Tools for Oral Delivery of Proteins/peptides. Journal of Controlled Release 211: 63–7.
- Clarisse M., Di Vetta V., Giusti V., 2009. Edulcorants: entre mythe et réalité. Revue Medicale Suisse., vol. 5, pp. 682–686.
- Chan S., Qi S., Craig D., 2015. An Investigation into the Influence of Drug–polymer Interactions on the Miscibility, Processability and Structure of Polyvinylpyrrolidone-Based Hot Melt Extrusion Formulations. International Journal of Pharmaceutics 496, no. 1: 95–106.
- Chiou W.L and Riegelman S., 1971. Pharmaceutical Applications of Solid Dispersion Systems. Journal of Pharmaceutical Sciences 60, no. 9: 1281-1302.
- Cilurzo F. Cupone IE., Minghetii P., Selmin F., Montanari L., 2008. Fast Dissolving Films Made of Maltodextrins. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 70, no. 3: 895–900.
- Craig D., 2001. The Mechanisms of Drug Release from Solid Dispersions in Wter-Soluble Polymers. International Journal of Pharmaceutics 231: 131–44.
- David M. Swope, Jack J. Chen, 2012. Tetrabenazine for the Treatment of Hyperkinetic Movement Disorders: A Review of the Literature. Clinical Therapeutics 34, no. 7: 1487-504.
- Davis M.E. and Brewster M.E., 2004. Cyclodextrin-Based Pharmaceutics: Past, Present and Future. Nature Reviews Drug Discovery 3, no. 12: 1023–35.
- Démuth B., Nagy Z.K., Balogh A., Vigh T., Marosi G., Verreck G., Van Assche I., Brewster M.E., 2015. Downstream Processing of Polymer-Based Amorphous Solid Dispersions to Generate Tablet Formulations. International Journal of Pharmaceutics 486, no. 1–2: 268–86.

- Dias M., Raghavan S.L., Pellett M.A., Hadgraft J., 2003. The Effect of β-Cyclodextrins on the Permeation of Diclofenac from Supersaturated Solutions," International Journal of Pharmaceutics 263, no. 1–2: 173–81.
- Di Cagno M., Nielsen T., Lambertsen K., Kuntshe J., Bauer A., 2014. β-Cyclodextrin-Dextran Polymers for the Solubilization of Poorly Soluble Drugs. International Journal of Pharmaceutics 468, no. 1–2: 258–63.
- Dixit R.P, Puthli S.P., 2009. Oral Strip Technology: Overview and Future Potential. J Control Release 139(2): 94–107.
- Dufour G., Bigazzi W., Wong N., Boschini F., de Tullio P., Piel G., Cataldo D., Evrard B., 2015. Interest of Cyclodextrins in Spray-Dried Microparticles Formulation for Sustained Pulmonary Delivery of Budesonide. International Journal of Pharmaceutics 495, no. 2: 869–78.
- Ernest T.B., Elder D.P., Martini L.G., Roberts M., Ford J.L., 2007. Developing Paediatric Medicines: Identifying the Needs and Recognizing the Challenges. Journal of Pharmacy and Pharmacology 59, no. 8: 1043–55.
- European Commission. Better Medicines for Children Proposed regulatory actions on Paediatric medicinal products. 2002. http://ec.europa.eu/health/files/pharmacos/docs/doc2002/feb/cd_pediatrics_en.pdf. Consulté le 9.08.2016.
- European Commission. Regulation EU/872/2012 et EU/873/2012. 2012. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:267:0001:016). Consulté le 12.08.2016.
- European Commission. Better Medicines for Children From Concept to Reality.2013. http://ec.europa.eu/health/files/paediatrics/2013_com443/paediatric_report-com (2013)443_en.pdf. Consulté le 9.08.2016.
- European Commission, 2014/C338/01. Guideline on the format and content of applications for agreement or modification of a paediatric investigation plan and requests for waivers or deferrals and concerning the operation of the compliance check and on criteria for assessing significant studies. 2014. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/2014_c338_01/2014_c338_01_en.pdf. Consulté le 9.08.2016.
- EMA, multidisciplinary scientific guideline: paediatrics, http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000404.jsp&mid=WC0b01ac0580029572. Consulté le 12.08.2016.
- European Medicines Agency. Report on the experts round table on the difficulties related to the use of new medicinal products in children held on 18 december 1997. EMEA/27164/98 Rev.1. Consulté le 9.08.2016.
- European Medicines Agency. ICH Topic E 11 Clinical Investigation of Medicinal Products in the Paediatric Population. CPMP/ICH/2711/99. Consulté le 11.08.2016.
- EMEA/CHMP/EWP/147013/2004. Committee for Medicinal Products for Human use. Guideline on the role of pharmacokinetics in the development of medicinal products in the paediatric population. 2004. Consulté le 6.08.2016.
- EMEA/CHMP/PEG/194810/2005. Reflection paper: formulations of choice for the paediatric population. 2005. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003782.pdf. Consulté le 7.08.2016.
- EMA/428172/2012. 5-year Report to the European Commission - General report on the experience acquired as a result of the application of the Paediatric Regulation. 2012. http://ec.europa.eu/health/files/paediatrics/2012-09_pediatric_report-annex1-2_en.pdf. Consulté le 10.08.2016.

- EMA/98717/2012. Revised provisional priority list for studies into off-patent paediatric medicinal products. 2013. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2013/06/WC500143970.pdf. Consulté le 13.08.2016.
- EMA/876333/2011 Rev 3*. Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP). 2014. Consulté le 11.08.2016.
- EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev. 2. Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use. 2013. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/07/WC500147002.pdf. Consulté le 7.08.2016.
- EMA/795830/2015. Report to the European Commission on companies and products that have benefited from any of the rewards and incentives in the Paediatric Regulation1 and on the companies that have failed to comply with any of the obligations in this regulation. 2016. Consulté le 13.08.2016.
- Fabiano V., Mameli C., and Zuccotti G.V., 2011. Paediatric Pharmacology: Remember the Excipients. Pharmacological Research. 63, no. 5: 362–65.
- Fatmi S., Bournine L., Iguer-Ouada M., Lahiani-Skiba M., Bouchal F., Skiba M., 2015. Amorphous solid dispersion studies of camptothecin-cyclodextrin inclusion complexes in PEG 6000. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research 72, no. 1, 179-192.
- FDA, Specific Requirements on Content and Format of Labeling for Human Prescription Drugs; Revision of ``Pediatric Use'' Subsection in the Labeling; Final Rule. Federal Register Volume 59, Number 238, December 1994
- FDA, Revision CDER; http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/FormsSubmissionRequirements/ElectronicSubmissions/DataStandardsManualmonographs/ucm071666.htm. Consulté le 7.07.2016.
- FDA, Congress of the United States of America. Pediatric Research Equity Act of 2003. 2003.http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/UCM077853.pdf. Consulté le 12.08.2016.
- Garsuch V., Breitkreutz J., 2009. Novel Analytical Methods for the Characterization of Oral Wafers. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 73, no. 1: 195–201.
- Garsuch V., Breitkreutz J., 2010. Comparative Investigations on Different Polymers for the Preparation of Fast-Dissolving Oral Films. Journal of Pharmacy and Pharmacology 62(4): 539-45.
- Genina N., Janben EM., Breitenbach A., Breitkreutz J., Sandler N., 2013. Evaluation of Different Substrates for Inkjet Printing of Rasagiline Mesylate," European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 85: 1075-83.
- Ghebremeskel A.L., Vemavarapu C., and Lodaya M., 2007. Use of Surfactants as Plasticizers in Preparing Solid Dispersions of Poorly Soluble API: Selection of Polymer–surfactant Combinations Using Solubility Parameters and Testing the Processability," International Journal of Pharmaceutics 328, no. 2: 119–29.
- Guay D.R.P., 2010 "Tetrabenazine, a Monoamine-Depleting Drug Used in the Treatment of Hyperkinetic Movement Disorders," The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy 8, no. 4: 331–73.
- Guhmann M., Preis M., Gerber F., Pöllinger N., Breitkreutz J., and Werner W., Development of Oral Taste Masked Diclofenac Formulations Using a Taste Sensing System. International Journal of Pharmaceutics. 2012, 438, no. 1–2: 81–90.
- Guidance for Industry: Orally Disintegrating Tablets, Center for Drug Evaluation and Research (Centre for Drug Evaluation and Research, CDER) US FDA, Dec. 2008. http://www.fda.gov/cder/Guidance/8528fnl.pdf. Consulté le 10.07.2016.

- Guinard J., 2000. Sensory and Consumer Testing with Children," Trends in Food Science & Technology 11, no. 8: 273–83.
- Guo Y., Shalaev E, Scott Smith, 2013. Physical Stability of Pharmaceutical Formulations: Solid-State Characterization of Amorphous Dispersions," TrAC Trends in Analytical Chemistry 49: 137–44.
- Hallouard F., Mehenni L., Lahiani-Skiba M., Skiba M., 2016. Solid Dispersions for Oral Administration: An Overview of the Methods for their Preparation", Current Pharmaceutical Design 22: 1-17.
- He Y., Ho C., 2015. Amorphous Solid Dispersions: Utilization and Challenges in Drug Discovery and Development," Journal of Pharmaceutical Sciences 104, no. 10: 3237–58.
- Heinemann R, Carvalho R., and Favaro-Trindade C., 2013. Orally Disintegrating Film (ODF) for Delivery of Probiotics in the Oral Cavity — Development of a Novel Product for Oral Health," Innovative Food Science & Emerging Technologies 19: 227–32.
- Hermans K., Van den Plas D., Kerimova S., Carleer R., Adriaensens P., Weyenlber W., Ludwig A., 2014. Development and Characterization of Mucoadhesive Chitosan Films for Ophthalmic Delivery of Cyclosporine A. International Journal of Pharmaceutics 472, no. 1–2: 10–19.
- Hoang Thi T.H., Morel S., Ayouni F., Flament M., 2012. Development and Evaluation of Taste-Masked Drug for Paediatric Medicines – Application to Acetaminophen. International Journal of Pharmaceutics. 434, no. 1–2: 235–42.
- Hoang Thi T.H., Lhafifi S., Carneiro S.P., 2015. Flament M., Feasability of a New Process to Produce Fast Disintegrating Pellets as Novel Multiparticulate Dosage Form for Pediatric Use. International Journal of Pharmaceutics 496, no. 2: 842–49.
- Hoffmann E., Breitenbach A., Breitkreutz J., 2011. Advances in Orodispersible Films for Drug Delivery. Expert Opinion on Drug Delivery 8, no. 3: 299–316.
- Iervolino M., Raghavan S.L., Hadgraft J., 2000. Membrane Penetration Enhancement of Ibuprofen Using Supersaturation," International Journal of Pharmaceutics 198: 229–38.
- Ivanovska V., Rademaker C.M.A., Van Dijk L., Manel-Teeuwisse A.K., 2014. Pediatric Drug Formulations: A Review of Challenges and Progress. PEDIATRICS 134, no. 2: 361–72.
- Jain S., Paul E. Greene, Steven J., 2006. Tetrabenazine Therapy of Pediatric Hyperkinetic Movement Disorders. Movement Disorders 21, no. 11: 1966–72.
- Jambhekar S, R. Casella, T. Maher, 2004. The Physicochemical Characteristics and Bioavailability of Indomethacin from β-Cyclodextrin, Hydroxyethyl-β-Cyclodextrin, and Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin Complexes. International Journal of Pharmaceutics 270, no. 1–2: 149–66.
- Jambhekar S.S., Breen P., 2016. Cyclodextrins in Pharmaceutical Formulations I: Structure and Physicochemical Properties, Formation of Complexes, and Types of Complex. Drug Discovery Today 21, no. 2: 356–62.
- Jambhekar S.S., Breen P., 2016. Cyclodextrins in Pharmaceutical Formulations II: Solubilization, Binding Constant, and Complexation Efficiency," Drug Discovery Today 21, no. 2: 363–68.
- Jang S.W., Kang M.J., 2014. Improved Oral Absorption and Chemical Stability of Everolimus via Preparation of Solid Dispersion Using Solvent Wetting Technique. International Journal of Pharmaceutics 473, no. 1–2: 187–93.
- Janßen E., Schliephacke R., Breitenbach A., Breitkreutz J., 2013. Drug-Printing by Flexographic Printing technology—A New Manufacturing Process for Orodispersible Films. International Journal of Pharmaceutics 441, no. 1–2: 818–25.
- Jansook P., Loftsson T., 2009. CDs as Solubilizers: Effects of Excipients and Competing Drugs. International Journal of Pharmaceutics 379, no. 1: 32–40.

- Janssens S., Van den Mooter G., 2009. Review: Physical Chemistry of Solid Dispersions. Journal of Pharmacy and Pharmacology 61, no. 12: 1571–86.
- Joshi S., Petereit H.U., 2013. Film Coatings for Taste Masking and Moisture Protection. International Journal of Pharmaceutics. 457, no. 2: 395–406.
- Jug M., Mennini N., Köver KE., Mura P., 2014. Comparative Analysis of Binary and Ternary Cyclodextrin Complexes with Econazole Nitrate in Solution and in Solid State. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 91: 81–91.
- Kalyan S., Bansal M., 2012. Recent Trends in the Development of Oral Dissolving Film. International Journal of PharmTech Research 4, no. 2: 725–33.
- Kanmani P., Lim S.T., 2013. Development and Characterization of Novel Probiotic-Residing Pullulan/starch Edible Films. Food Chemistry 141, no. 2: 1041–49.
- Karavas E., Georgarakis E., Sigalas M., Avgoustakis K., Bikiaris D., 2007. Investigation of the Release Mechanism of a Sparingly Water-Soluble Drug from Solid Dispersions in Hydrophilic Carriers Based on Physical State of Drug, Particle Size Distribution and Drug–polymer Interactions. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 66, no. 3: 334–47.
- Kaye J.L., 2011. Review of Paediatric Gastrointestinal Physiology Data Relevant to Oral Drug Delivery. International Journal of Clinical Pharmacy. 33, no. 1: 20–24.
- Kearns G.L., Abdel-Rahman S.M., Alander S.W., Douglas L. B., Leeder J.S., Kauffman R.E., 2003. Developmental Pharmacology — Drug Disposition, Action, and Therapy in Infants and Children. The New England Journal of Medicine 349, no. 12 : 1157–67
- Keen J.M., McGinity J.W., Williams R.O. III, 2013. Enhancing Bioavailability through Thermal Processing. International Journal of Pharmaceutics 450, no. 1–2: 185–96.
- Kianfar F., Chowdhry BZ., Antonijevic MD., Boateng JS., 2012. Novel Films for Drug Delivery via the Buccal Mucosa Using Model Soluble and Insoluble Drugs. Drug Development and Industrial Pharmacy 38, no. 10: 1207–20.
- Kim K.T., Lee J.Y., Lee M.Y., Song C.K., Choi J., Kim D., 2011. Solid dispersions as drug delivery system. Journal of Pharmaceutical Inverstigation 41, no. 3: 125-142.
- Kimland E., Odlind V., 2012. Off-Label Drug Use in Pediatric Patients. Clinical Pharmacology & Therapeutics 91, no. 5: 796–801.
- Konno H., Handa T., Alonzo DE., Taylor LS., 2008. Effect of Polymer Type on the Dissolution Profile of Amorphous Solid Dispersions Containing Felodipine. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 70, no. 2: 493–99.
- Kostewicz E., Abrahamsson B., Brewster M., Brouwers J., Butler J., Holm R., Klein S., Vertzoni M., Augustijns P., 2014. In Vitro Models for the Prediction of in Vivo Performance of Oral Dosage Forms. European Journal of Pharmaceutical Sciences 57: 342–66.
- Kou, K., Zhou, L., 2014. Stability of Amorphous Solid Dispersion, in: Shah et al. (eds.), Amorphous Solid Dispersions. Springer, New York, pp. 515-523.
- Krampe R., Sieber D., Pein-Hackelbush M., Breitreutz J., 2016. A New Biorelevant Dissolution Method for Orodispersible Films," European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 98: 20–25.
- Krogars K., Heinämäki J. , Karjalainen M. , Rantanen J. , Luukkonen P. , Yliruusi J., 2003. "Development and Characterization of Aqueous Amylose-Rich Maize Starch Dispersion for Film Formation. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 56, no. 2: 215–21.
- Kumar G.P., Raju D.B., 2014. Polyvinylpyrrolidone Oral Films of Enrofloxacin: Film Characterization and Drug Release. International Journal of Pharmaceutics, no. 471: 146–52.
- Kurkov S.V., Loftsson T., 2013. Cyclodextrins," International Journal of Pharmaceutics 453, no. 1: 167–80.

- Laboulfie F., Hermati M., Lamure A., Diguet S., 2013. Effect of the Plasticizer on Permeability, Mechanical Resistance and Thermal Behaviour of Composite Coating Films. Powder Technology 238: 14–19.
- Lafargue D., Denis Lourdin, Jean-Louis Doublier, 2007. Film-Forming Properties of a Modified Starch/κ-Carrageenan Mixture in Relation to Its Rheological Behaviour. Carbohydrate Polymers 70, no. 1: 101–11.
- Laitinen R., Priemel P., Rades T., 2014. Theorical Consideration in Developing Amorphous Solid Dispersion," in Amorphous Solid Dispersions, Advances in Delivery Science and Technology (Springer New York, 2014).
- Lenk C. and Duttge G., 2014. Ethical and Legal Framework and Regulation for off-Label Use: European Perspective. Therapeutics and Clinical Risk Management. 537: 537-546.
- Leuner C., Dressman J., 2000. Improving Dug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersions. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50: 47–60.
- Lewis D., Udupa N., Atin K., 2009. Solid Dispersions : A Review. Pakistan Journal of Pharmaceutical Science 22, no. 2: 234–46.
- Li J., Chiappetta D, 2008. An Investigation of the Thermodynamic Miscibility between VeTPGS and Polymers. International Journal of Pharmaceutics 350, no. 1–2: 212–19.
- Luo K., Yin J., Khutoryanskaya O., Khutoryanskiy V., 2008. Mucoadhesive and Elastic Films Based on Blends of Chitosan and Hydroxyethylcellulose. Macromolecular Bioscience 8, no. 2: 184–92.
- Liu C., Shu L., Fishman ML., Hicks KB., 2007. Composite Films from Pectin and Fish Skin Gelatin or Soybean Flour Protein. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, no. 6: 2349–55.
- Liu L., Guo Q., 2001. The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, no. 42: 1–14.
- Loftsson T., Brewster M.E., 1996. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. Journal of Pharmaceutical Sciences 85, no. 10.
- Loftsson T., Järvinen T., 1999. Cyclodextrins in Ophthalmic Drug Delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 36: 59–79.
- Loftsson T., 2002. Cyclodextrins and the Biopharmaceutics Classification System of Drugs, Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 44: 63–67.
- Loftsson T., Duchene D., 2007. Cyclodextrins and Their Pharmaceutical Applications," International Journal of Pharmaceutics 329, no. 1–2: 1–11.
- Loftsson T., Vogensen ST., Brewster M., 2007. Effects of Cyclodextrins on Drug Delivery through Biological Membranes. Journal of Pharmaceutical Sciences 96, no. 10: 2532–46.
- Loftsson T., Brewster M.E., 2009. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Basic Science and Product Development. Journal of Pharmacy and Pharmacology, no. 62: 1607–21.
- Loftsson T., Brewster M.E., 2011. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Effects on Drug Permeation through Biological Membranes. Journal of Pharmacy and Pharmacology, no. 63: 1119–35.
- Loftsson T., Brewster M.E., 2012. Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. Journal of Pharmaceutical Sciences 101, no. 9: 3019–32.
- Loftsson T., 2015. Excipient Pharmacokinetics and Profiling. International Journal of Pharmaceutics., 480, no. 1–: 48–54.
- Lopez F.L., Ernest T.B., Tuleu C., Gul M., 2015. Formulation Approaches to Pediatric Oral Drug Delivery: Benefits and Limitations of Current Platforms. Expert Opinion on Drug Delivery. 12, no. 11: 1727–40.

- López-Jaimez G., Cuello-García C.A., 2016. Use of Chewing Gum in Children Undergoing an Appendectomy: A Randomized Clinical Controlled Trial. International Journal of Surgery.32: 38–42.
- Low A., Parmentier J., Khong YM., Chai CC., Tun TY., Berania JE., Liu X., Gokhale R., Chan SY., 2013. Effect of Type and Ratio of Solubilising Polymer on Characteristics of Hot-Melt Extruded Orodispersible Films. International Journal of Pharmaceutics 455, no. 1–2: 138–47.
- Luo K., Yin J., Khutoryanskaya OV., Khutoryanskiy V., 2008. Mucoadhesive and Elastic Films Based on Blends of Chitosan and Hydroxyethylcellulose. Macromolecular Bioscience 8, no. 2: 184–92.
- Mady F.M., , Abou-Taleb AE., Khaled KA., Yamasaki K., Iohara D., Taguchi K., Anraku M., Hirayama F., Uekama K., Otagiri M., 2010. Evaluation of Carboxymethyl-β-Cyclodextrin with Acid Function: Improvement of Chemical Stability, Oral Bioavailability and Bitter Taste of Famotidine. International Journal of Pharmaceutics 397, no. 1–2: 1–8.
- Malladi M., Jukanti R., Nair R., Wagh S., Padakanti HS., Mateti A., 2010. Design and Evaluation of Taste Masked Dextromethorphan Hydrobromide Oral Disintegrating Tablets. Acta Pharm. 60: 267–80.
- Marsac P.J., Konno H., Taylor L.S., 2006. A Comparison of the Physical Stability of Amorphous Felodipine and Nifedipine Systems. Pharmaceutical Research 23, no. 10: 2306–16.
- Mehanna R., Hunter C., Davidson A., Jimenez-Shaled J., Jankovix J., 2013. Analysis of CYP2D6 Genotype and Response to Tetrabenazine: ANALYSIS OF CYP2D6 GENOTYPE AND RESPONSE TO TETRABENAZINE. Movement Disorders 28, no. 2: 210–15.
- Meng F., Trivino A., Prasad D., Chauhan H., 2015. Investigation and Correlation of Drug Polymer Miscibility and Molecular Interactions by Various Approaches for the Preparation of Amorphous Solid Dispersions. European Journal of Pharmaceutical Sciences 71: 12–24.
- Mura P., 2014. Analytical Techniques for Characterization of Cyclodextrin Complexes in Aqueous Solution: A Review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 101: 238–50.
- Mura P., 2015. Analytical Techniques for Characterization of Cyclodextrin Complexes in the Solid State: A Review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 113: 226–38.
- Nagaraju T., Gowthami R., Rajashekar M., Sandeep S., Mallesham M., Sathish D., Kumar YS., 2013. Comprehensive Review On Oral Disintegrating Films. Current Drug Delivery 10: 96–108.
- Nair A., Kumria R., Harsha S., Attimarad M., Al-Dhubiab BE., Alhaider IA., 2013. In Vitro Techniques to Evaluate Buccal Films. Journal of Controlled Release 166, no. 1: 10–21.
- Nalluri B., Saisri Anusha V., Maheswari K.M., 2013. Development and Evaluation of Mouth Dissolving Films of Sumatriptan Succinate for Better Therapeutic Efficacy. Journal of Applied Pharmaceutical Science. Journal of Applied Pharmaceutical Science edition.
- Nishigaki M., Kawahara K., Nawa M., Futamura M., Nishimura M., Matsuura K., Kitaichi K., Kawaguchi Y., Tsukioka T., Yoshida K., Itoh Y., 2012. Development of Fast Dissolving Oral Film Containing Dexamethasone as an Antiemetic Medication: Clinical Usefulness. International Journal of Pharmaceutics 424, no. 1–2: 12–17.
- Ostero-Espinar F.J., Torres-Labandeira J.J., Alvarez-Lorenzo C., Blanco-Mendez J., 2010. Cyclodextrins in Drug Delivery Systems. Journal Drug Delivery Science Technology 20, no. 4: 280–301.
- Openshaw H.T., Whittaker N., 1963. 277. The Synthesis of Emetine and Related Compounds. Part V. A Stereochemically Favourable Synthesis of Emetine," Journal of the Chemical Society (Resumed), 1461-1471.
- Parissaux X., Joshi A.A, François A., Lefevre P., 2007. Evaluation of a Novel Modified Starch Polymer in an Easy to Formulate Thin-film Drug Delivery System and Comparison with Some Marketed Formulations.

- Parikh T., Gupta SS., Meena AK., Vitez I., Mahajan N., Serajuddin AT. 2015. Application of Film-Casting Technique to Investigate Drug–Polymer Miscibility in Solid Dispersion and Hot-Melt Extrudate. Journal of Pharmaceutical Sciences 104, no. 7: 2142–52.
- Park D., Song YK., Jee JP., Kim HT., Kim CK., 2012. Development of Chitosan-Based Ondansetron Buccal Delivery System for the Treatment of Emesis. Drug Development and Industrial Pharmacy 38, no. 9: 1077–83.
- Pathare Y., Bajaj A., Hastak V., 2013. Polymers Used for Fast Disintegrating Oral Films : A Review. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 21, no. 29: 169–78.
- Paudel A., Meeus J., Van den Mooter G., 2014 "Structural Characterization of Amorphous Solid Dispersion," in Amorphous Solid Dispersions (Springer New York, 2014), pp.2635–2662.
- Pein M., Preis M., Eckert C., Kiene F., 2014. Taste-Masking Assessment of Solid Oral Dosage forms–A Critical Review. International Journal of Pharmaceutics 465, no. 1–2: 239–54.
- Planchette C., Pichler H., Wimmer-Teubenbacher M., Gruber M., Gruber-Woelfler H., Mohr S., Tetyczka C., Hsiao WK., Paudel A., Roblegg E., Khinast J, 2016. Printing Medicines as Orodispersible Dosage Forms: Effect of Substrate on the Printed Micro-Structure. International Journal of Pharmaceutics 509, no. 1–2: 518–27.
- Pons G., Modification du devenir des médicaments dans l'organisme au cours de la maturation chez l'enfant. Pharmacologie et thérapeutique pédiatriques, Paris, France: Flammarion médicine-sciences. 1993, pp. 18–22
- Prasad D., Chauhan H., Atef E., 2014. Amorphous Stabilization and Dissolution Enhancement of Amorphous Ternary Solid Dispersions: Combination of Polymers Showing Drug–Polymer Interaction for Synergistic Effects. Journal of Pharmaceutical Sciences 103, no. 11: 3511–23.
- Preis M., Pein M., Breitkreutz J., 2012. Development of a Taste-Masked Orodispersible Film Containing Dimenhydrinate. Pharmaceutics., 4, no. 4: 551–62.
- Preis M., Knop K., Breitkreutz J., 2014. Mechanical Strength Test for Orodispersible and Buccal Films. International Journal of Pharmaceutics 461, no. 1–2: 22–29.
- Preis M., Gronkowsku D., Grytzan D., Breitkreutz J., 2014. Comparative Study on Novel Test Systems to Determine Disintegration Time of Orodispersible Films: Disintegration Time of Orodispersible Films. Journal of Pharmacy and Pharmacology 66: 1102-1111.
- Raghavan S.L., Schuesse K., Davis A., Hadgraft J., 2003. Formation and Stabilisation of Triclosan Colloidal Suspensions Using Supersaturated Systems. International Journal of Pharmaceutics 261, no. 1–2: 153–58.
- Reboul Salze F., La recherche en pédiatrie. Dossier documentaire INSERM. 2010
- Règlement (CE) N° 1901/2006 du parlement et du conseil du 12 décembre 2006 relatif aux médicaments pédiatriques, modifiant le règlement (CEE) n°1768/92, les directives 2001/20/CE ainsi que le règlement CE n°726/2004. Journal officiel de l'Union Européenne. 2006. Consulté le 11.08.2016.
- Roberts M.S., McLean S., Millingen KS., Galloway HM., 1986. The Pharmacokinetics of Tetrabenazine and Its Hydroxy Metabolite in Patients Treated for Involuntary Movement Disorders. European Journal of Clinical Pharmacology 29: 703–8.
- Sakellariou P., Rowe R.C., 1995. Interactions in Cellulose Derivative Films for Oral Drug Delivery. Prog. Polym. Sci. 20: 889–942.
- Salunke S., Brandys B., Ciacoia G., Tuleu C., 2013. The STEP (Safety and Toxicity of Excipients for Paediatrics) Database: Part 2 – The Pilot Version. International Journal of Pharmaceutics 457, no. 1: 310–22.

- Sam T., Ernest T.B., Walsh J., Williams J.L., 2012. A Benefit/risk Approach towards Selecting Appropriate Pharmaceutical Dosage Forms – An Application for Paediatric Dosage Form Selection. International Journal of Pharmaceutics 435, no. 2: 115–23.
- Sandhu H., Shah N., Hitesh H., Malick A., 2014. Overview of Amorphous Solid Dispersion Technologies, in Amorphous Solid Dispersions (Springer New York, 2014), pp. 91-122.
- Sayed S., Ibrahim H., Mohamed M., El Milligit M., 2013. Fast-Dissolving Sublingual Films of Terbutaline Sulfate: Formulation and In Vitro / In Vivo Evaluation. Molecular Pharmaceutics 10, no. 8: 2942–47.
- Serajuddin A.T.M, 1999. Solid Dispersion of Poorly Water-soluble Drugs: Early Promises, Subsequent Problems, and Recent Breakthroughs. Journal of Pharmaceutical Sciences 88, no. 10: 1058–66.
- Shah P.P., Mashru R.C., 2008. Formulation and Evaluation of Taste Masked Oral Reconstitutable Suspension of Primaquine Phosphate. AAPS PharmSciTech. 9, no. 3: 1025–30.
- Shen B., Shen CY., Yuan XD., Bai JX., Lv QY., Xu H., Dai L., Yu C., Han J., Yuan HL., 2013. Development and Characterization of an Orodispersible Film Containing Drug Nanoparticles. Eur J Pharm Biopharm 85(3): 1348–56.
- Shimoda H., Taniguchi K., Nishimura M., Matsuura K., Tsukioka T., Yamashita H., Inagaki N., Hirano K., Yamamoto M., Kinosada Y., Itoh Y., 2009. Preparation of a Fast Dissolving Oral Thin Film Containing Dexamethasone: A Possible Application to Antiemesis during Cancer Chemotherapy. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 73, no. 3: 361–65.
- Sievens-Figueroa L., Bhakay A., Jerez-Rozo JI., Pandya N., Romañach RJ., Michniak-Kohn B., Iqbal Z., Bilgili E., Davé RN., 2012. Preparation and Characterization of Hydroxypropyl Methyl Cellulose Films Containing Stable BCS Class II Drug Nanoparticles for Pharmaceutical Applications. International Journal of Pharmaceutics 423, no. 2: 496–508, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.001.
- Singh H., Kaur M., Verma H., 2013. Optimization and Evaluation of Desloratadine Oral Strip: An Innovation in Paediatric Medication. The Scientific World Journal 2013: 1–9.
- Sivaneswari S., Karthikeyan E., Veena D., Chandana P.Ja, Sai Sumana P., Subhashree P., Ramya L., Rajalakshmi R., Ashok Kumar C.K., 2016. Physiochemical Characterization of Taste Masking Levetiracetam Ion Exchange Resinates in the Solid State and Formulation of Stable Liquid Suspension for Pediatric Use. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 5, no. 2: 126–33.
- Skiba M., Skiba M., Milon N., Bounoure F., Fessi H., 2014.Preparation and characterization of amorphous solid dispersions of nimesulide in cyclodextrin copolymers. J. Nanosci. Nanotechnol 14:2772-9.
- Slavkova M., Breitkreutz J., 2015. Orodispersible Drug Formulations for Children and Elderly. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 75: 2–9.
- Sohi H., Sultana Y., Khar R.K., 2004. Taste Masking Technologies in Oral Pharmaceuticals: Recent Developments and Approaches. Drug Development and Industrial Pharmacy 30, no. 5: 429–48.
- Solanki H., Patil K.B., Gohel S.N., Prajapati V.D., Jani G.K., 2015. Hot melt extrusion: an emerging technology in pharmaceuticals. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science 4: 404-23.
- Stoltenberg I., Breitkreutz J., 2011. Orally Disintegrating Mini-Tablets (ODMTs) – A Novel Solid Oral Dosage Form for Paediatric Use. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 78, no. 3: 462–69.
- Strickley R.G., Iwata Q., Wu S., 2008. Pediatric Drugs—a Review of Commercially Available Oral Formulations, Journal of Pharmaceutical Sciences. 97, no. 5: 1731–74.

- Stroppolo F., Ciccarello F., Milani R., Bellorini L., 2001. Oral pharmaceutical compositions containing cyclodextrins as taste masking agent. US 20040115258 A1.
- Swope D. M., Chen J.J., 2012. Tetrabenazine for the Treatment of Hyperkinetic Movement Disorders: A Review of the Literature. Clinical Therapeutics 34: 1487-504.
- Szejtli J., Szente L., 2005. Elimination of Bitter, Disgusting Tastes of Drugs and Foods by Cyclodextrins. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 61, no. 3: 115–25.
- Szente L., Szemán J., Sohajda T., 2016. Analytical Characterization of Cyclodextrins: History, Official Methods and Recommended New Techniques. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 130: 347-365.
- Taupitz T., Dressman JB., Buchanan CM., Klein S., 2013. Cyclodextrin-Water Soluble Polymer Ternary Complexes Enhance the Solubility and Dissolution Behaviour of Poorly Soluble Drugs. Case Example: Itraconazole. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 83, no. 3: 378–87.
- Tongdeesoontorn W., Mauer L.J., Wongruong S., Sriburi P., Rachtanapun P., 2011. Effect of Carboxymethyl Cellulose Concentration on Physical Properties of Biodegradable Cassava Starch-Based Films. Chemistry Central Journal 5, no. 1: 6.
- Tran T.T. et al., "The Roles of Acidifiers in Solid Dispersions and Physical Mixtures," International Journal of Pharmaceutics 384, no. 1–2 (January 2010): 60–66, doi:10.1016/j.ijpharm.2009.09.039.
- Vakili H., Nyman JO., Genina N., Preis M., Sandler N., 2016. Application of a Colorimetric Technique in Quality Control for Printed Pediatric Orodispersible Drug Delivery Systems Containing Propranolol Hydrochloride. International Journal of Pharmaceutics, 511 (1):606-18.
- Van den Mooter G., 2012. The Use of Amorphous Solid Dispersions: A Formulation Strategy to Overcome Poor Solubility and Dissolution Rate. Drug Discovery Today: Technologies 9, no. 2: 79–85.
- Van Riet-Nales D.A., Ferreira J.A., Schobben A., De Neef B.J., Egberts T., Rademaker C.,2015. Methods of Administering Oral Formulations and Child Acceptability. International Journal of Pharmaceutics 491, no. 1–2: 261–67.
- Vasconcelos T., Sarmento B., Costa P., 2007. Solid Dispersions as Strategy to Improve Oral Bioavailability of Poor Water Soluble Drugs. Drug Discovery Today 12, no. 23–24: 1068–75.
- Vega E., Egea MA., Garduño-Ramírez ML., García ML., Sánchez E., Espina M., Calpena AC., 2013. Flurbiprofen PLGA-PEG Nanospheres: Role of Hydroxy-β-Cyclodextrin on Ex Vivo Human Skin Permeation and in Vivo Topical Anti-Inflammatory Efficacy. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 110: 339–46.
- Visser J., Dohmen WM., Hinrichs WL., Breitkreutz J., Frijlink HW., Woerdenbag HJ., 2015. Quality by Design Approach for Optimizing the Formulation and Physical Properties of Extemporaneously Prepared Orodispersible Films. International Journal of Pharmaceutics 485, no. 1–2: 70–76.
- Vyas A., Saraf S., Saraf S., 2008. Cyclodextrin Based Novel Drug Delivery Systems. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 62, no. 1–2: 23–42.
- Walsh J., Bickmann D., Breitkreutz J., Chariot-Goulet M., 2011. Delivery Devices for the Administration of Paediatric Formulations: Overview of Current Practice, Challenges and Recent Developments, International Journal of Pharmaceutics. 415, no. 1–2: 221–31.
- Walsh J., Cram A., Woertz K., Breikreutz J., Winzenburg G., Turner R., Tuleu C., 2014. Playing Hide and Seek with Poorly Tasting Paediatric Medicines: Do Not Forget the Excipients. Advanced Drug Delivery Reviews 73: 14-33.

- WHO Model List of Essential Medicines for Children. 2013. http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html. Consulté le 10.08.2016.
- WHO 17th Meeting, Expert Committee on Selection and Use of Essential Medicines. Report of the Informal Expert Meeting on Dosage Forms of Medicines for Children. 2008. http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/17/application/paediatric/Dosage_form_reportDEC2008.pdf. Consulté le 9.08.2016.
- Woertz C., Kleinebudde P., 2015. Development of Orodispersible Polymer Films with Focus on the Solid State Characterization of Crystalline Loperamide. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 94: 52–63.
- Woertz C., Kleinebudde P., 2015. Development of Orodispersible Polymer Films Containing Poorly Water Soluble Active Pharmaceutical Ingredients with Focus on Different Drug Loadings and Storage Stability. International Journal of Pharmaceutics 493, no. 1–2: 134–45.
- Wu C., Benet L.Z., 2005. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. Pharmaceutical Research 22, no. 1: 11–23.
- Xu L., Shi LL., Cao QR., Xu WJ., Cao Y., Zhu XY., Cui J., 2014. Formulation and in Vitro Characterization of Novel Sildenafil Citrate-Loaded Polyvinyl Alcohol-Polyethylene Glycol Graft Copolymer-Based Orally Dissolving Films. International Journal of Pharmaceutics 473: 398–406.
- Yu Q., Luo W., Deschamps J., Holloway H., Kopajtic T., Katz J.L., Brossi A., Creig N.H., 2010. Preparation and Characterization of Tetrabenazine Enantiomers against Vesicular Monoamine Transporter 2. ACS Medicinal Chemistry Letters 1: 105–9.
- Zhang J., Ying Y., Pielecha-Safira B., Bilgili E., Ramachandran R., Romañach R., Davé RN., Iqbal Z., 2014. Raman Spectroscopy for in-Line and off-Line Quantification of Poorly Soluble Drugs in Strip Films. International Journal of Pharmaceutics 475: 428–37.
- Zhang P., Liu X., Hu W., Zhang L., 2016. Preparation and Evaluation of Naringenin-Loaded Sulfobutylether-β-Cyclodextrin/chitosan Nanoparticles for Ocular Drug Delivery. Carbohydrate Polymers 149: 224–30.
- Zhao Y., Quan, P. Fang L., 2015. Preparation of an Oral Thin Film Containing Meclizine Hydrochloride: In Vitro and in Vivo Evaluation," International Journal of Pharmaceutics 496: 314–22.