

Guide de développement de méthodes pour le système NanoDis d'Agilent

Auteurs

Dr Emre Türeli
MyBiotech

Dr Karen Krauel-Göllner
Agilent Technologies, Inc.

Introduction

L'un des plus grands défis du développement de médicaments est la faible solubilité de nombreux composés synthétiques potentiellement actifs en milieu aqueux. Les formulations de nanoparticules offrent une solution d'intérêt pour augmenter la biodisponibilité des médicaments à faible solubilité dans l'eau. Les études de dissolution représentent l'une des plus importantes méthodes utilisées pour caractériser *in vitro* la biodisponibilité attendue *in vivo*. Ainsi, une méthode de dissolution efficace est nécessaire durant le processus de développement des nanoparticules afin de faciliter la sélection des formulations à privilégier pour avoir une meilleure biodisponibilité. Elle est tout aussi importante à des fins de contrôle-qualité au cours des stades ultérieurs du cycle de vie du produit. Par conséquent, la séparation de la partie dissoute de la partie non-dissoute du médicament est l'un des facteurs les plus déterminants dans toutes les études de dissolution.

Une nanoparticule est considérée comme une substance non dissoute qui doit être séparée du milieu de dissolution. Les méthodes actuelles de dissolution témoignent de l'inefficacité à séparer les nanoparticules du milieu de dissolution, indépendamment de l'équipement utilisé pour les études de dissolution. De plus, les méthodes standard de filtration utilisées avec les formulations conventionnelles sont tout aussi insuffisantes pour la séparation des nanoparticules du milieu de dissolution durant le processus d'échantillonnage. La filtration au travers de filtres membranaires est une méthode très couramment utilisée pour la séparation des API non dissous. L'utilisation de filtres seringues d'une porosité de 0,22 ou 0,45 μm présente aussi ses difficultés. L'inconvénient ici est que toute particule dont la taille moyenne est inférieure à 500 nm va colmater ou rompre le filtre, ou encore passer directement au travers, donnant ainsi des valeurs de dissolution trop élevées. Il existe des filtres avec de plus petites porosités, par exemple de 0,02 μm . Cependant, ils ont tendance à se colmater rapidement pendant le processus d'échantillonnage, particulièrement si la concentration de nanoparticules dans le milieu est élevée. Si la séparation des nanoparticules est inefficace, il restera des nanoparticules dans le milieu de dissolution à la fin du processus de séparation, ce qui entraînera des lectures élevées erronées pour l'analyse du profil de dissolution. En résumé, les procédés de dissolution actuellement utilisés dans les laboratoires de développement ne suffisent pas à prédire la performance *in vivo* des nanoformulations en raison de l'inadéquation des dispositifs de filtration.

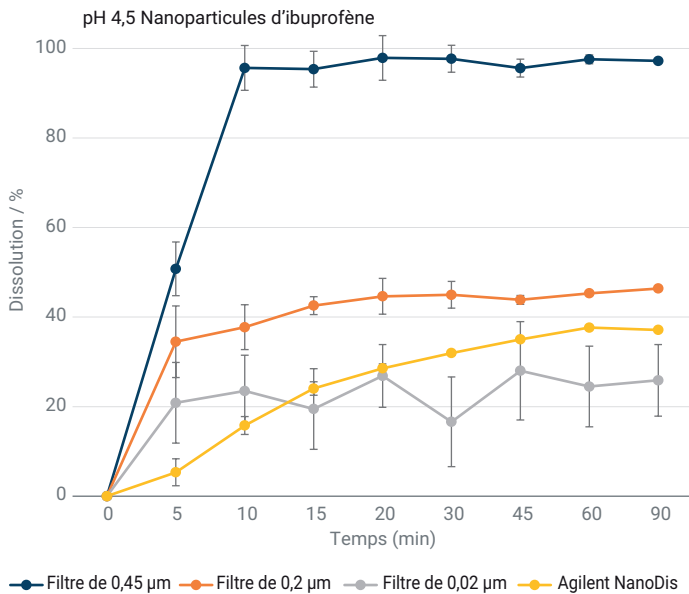


Figure 1. Profils de dissolution des nanoparticules d'ibuprofène 200 mg/900 mL dans un tampon d'acétate pH 4,5 avec différents filtres seringues (0,45 µm, 0,2 µm et 0,02 µm) et le système NanoDis d'Agilent.

Le système de dissolution NanoDis d'Agilent

Le principe de filtration du système NanoDis d'Agilent est basé sur une filtration à flux croisés (CFF) combinée à un appareil de dissolution conventionnel dans le but d'automatiser le processus de filtration. Le système NanoDis exploite les avantages de la CFF pour séparer les nanoparticules du milieu de dissolution. Étant donné que la CFF est un système de filtration ouvert, la formation d'un gâteau de filtration est évitée et les nanoparticules ne sont pas forcées à travers le filtre, phénomène fréquemment responsable du colmatage du filtre dans une filtration frontale. En outre, il est possible de choisir la

taille de la membrane des filtres CFF en fonction de celle des nanoparticules de la formulation. Dans le système NanoDis, le milieu de dissolution contenant les nanoparticules est pompé à travers des filtres CFF et le filtrat, dénué de particules, est recueilli par le collecteur d'échantillons de dissolution Agilent 850-DS. L'efficacité de filtration et le temps correspondant nécessaire à la collecte du filtrat dépendent de la formulation et de la concentration de nanoparticules dans le milieu. Quoi qu'il en soit, avec le système NanoDis, même le plus faible taux de filtration des formulations complexes est supérieur à 10 mL/min, ce qui génère un volume d'échantillon suffisant pour l'analyse quantitative des échantillons de dissolution et permet d'avoir des intervalles de points dans le temps très rapprochés.

Choix de la taille et du type de membrane de filtration

Les types de filtres et la porosité des filtres à flux croisés utilisés dans les études de dissolution sont choisis en fonction de la taille et du type de nanoparticule, et de manière à assurer une séparation complète. Ces spécifications permettent la détermination du médicament dissous sans l'interférence de nanoparticules non dissoutes.

De nombreuses membranes CFF à greffages différents sont disponibles. Un test de validation du filtre est nécessaire pour sélectionner le bon greffage sur membrane et prévenir ainsi l'adsorption des nanoparticules et de l'API sur le filtre. La validation du filtre peut se faire avec des filtres seringues standard, ceux-ci ayant le même greffage que les membranes CFF. En revanche, lors de la validation d'un filtre pour API, l'API, dont la concentration est connue, est dissous dans le milieu de dissolution puis analysé après filtration à travers un filtre seringue avec des pores de 0,45 µm par exemple. Il est à noter qu'une porosité plus importante du filtre seringue peut s'avérer nécessaire pour la validation de la filtration de formulations de nanoparticules.

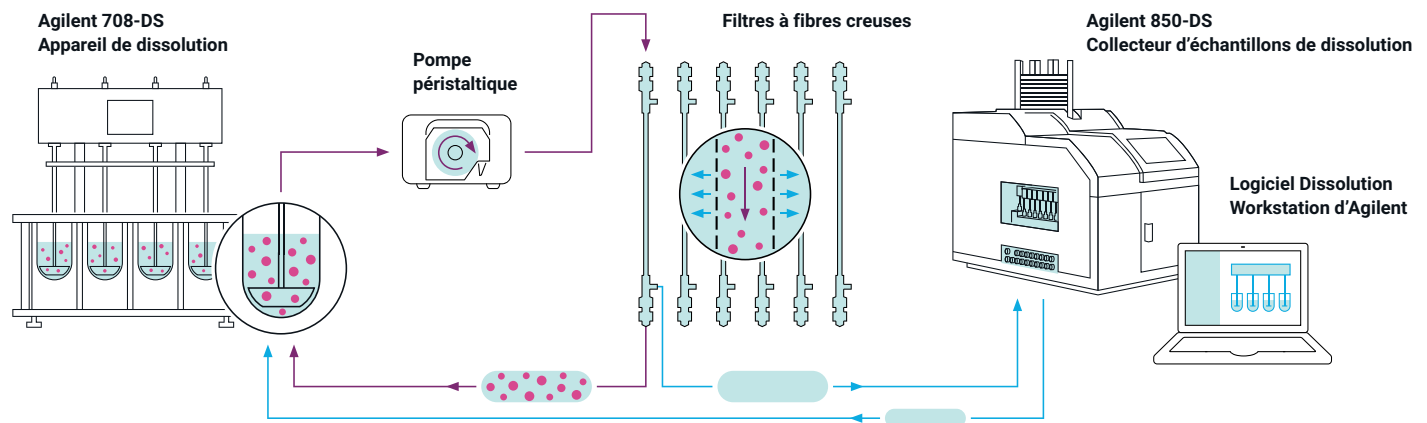


Figure 2. Représentation schématique du système NanoDis montrant le flux directionnel et la séparation de l'API dissous et des nanoparticules dispersées avec l'équipement de dissolution Agilent 708-DS conforme à l'USP et l'appareil de dissolution Agilent 850-DS, contrôlé et électroniquement documenté à l'aide du logiciel Dissolution Workstation (DWS) d'Agilent.

Les formulations de nanoparticules sont dispersées dans un milieu de dissolution à une concentration connue, puis passées à travers un filtre seringue de porosité appropriée afin d'assurer le passage des nanoparticules à travers le filtre. L'API avant et après filtration est qualifié pour calculer l'adsorption éventuelle des nanoparticules sur le filtre.

Bien que la taille moyenne des particules de la formulation du médicament soit la considération première, la distribution de la taille des particules ainsi que la distribution de la taille des particules dans le milieu de dissolution sont également des paramètres importants à prendre en compte. Dans les formulations de particules non homogènes, la taille des particules les plus petites présentes dans l'échantillon peut être très inférieure à la taille moyenne des particules ou vice versa (c.-à-d. la taille des plus grandes particules présentes dans l'échantillon peut être significativement plus élevée que la taille moyenne des particules). En outre, notamment lorsque les particules sont dispersées dans un milieu pertinent *in vivo* tel que les sels biliaires FeSSIF et FaSSIF, une couronne peut se former autour de la surface des particules et augmenter ainsi leur taille.

En général, il est possible de se référer au tableau 1 pour sélectionner la porosité adéquate de la membrane :

Tableau 1. Choix de la porosité de la membrane.

Granulométrie moyenne (nm)	Porosité de la membrane (kDa)
< 10	10
10 à 25	50
25 à 50	100
50 à 150	300
> 150	500

Si la distribution de la taille des particules est assez étalée ou si la distribution est bimodale en raison de la présence de plus petites particules dans l'échantillon, la taille de la membrane du filtre CFF doit être ajustée en conséquence, en tenant compte aussi de la fraction de particules les plus petites. Un autre paramètre important est la taille des micelles qui se forment lorsque des surfactants sont ajoutés au milieu de dissolution. Les micelles d'API dissous peuvent aussi être retenues par les membranes CFF. La taille de la membrane doit donc être choisie en fonction de la taille des micelles. Vous trouverez de plus amples informations sur la validation des filtres dans la section Références¹ et sur le site Internet de Repligen.²



Figure 3. Système NanoDis d'Agilent avec filtres à flux croisés.

Paramètres de l'instrument et du logiciel

L'optimisation des paramètres de l'instrument et du logiciel fait partie du processus du développement de méthodes de dissolution afin d'assurer une séparation efficace des nanoparticules du milieu de dissolution.

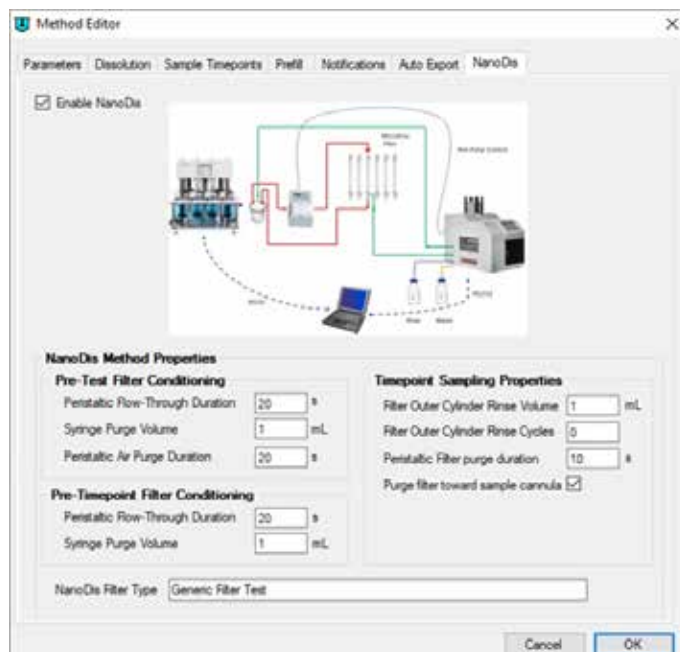


Figure 4. Capture d'écran du logiciel Dissolution Workstation d'Agilent, onglet NanoDis.

Le système NanoDis est piloté par le logiciel Dissolution Workstation (DWS) d'Agilent. La configuration des paramètres importants est brièvement décrite ci-dessous pour vous guider dans le processus de développement de méthodes.

La méthode du système NanoDis comporte deux phases : la phase de préconditionnement du filtre avant de démarrer la dissolution, puis la dissolution en tant que telle. Chaque point dans le temps de la dissolution est précédé d'une étape supplémentaire de préconditionnement du filtre. Une séquence type ressemble donc à :

Phase 1 : Préconditionnement du filtre

Taux de pompage : Le taux de pompage est ajusté manuellement sur la pompe péristaltique. La pression transmembranaire des membranes CFF augmente avec le débit, entraînant une plus grande perméation du filtrat. En résumé, la quantité d'échantillon de filtrat récoltée peut être plus importante en augmentant le débit.

Conditionnement du filtre avant le test : Le conditionnement du filtre avant le test vise à mouiller les filtres avec le milieu de dissolution en cours. Il est lancé avant d'initier la dissolution et avant l'introduction du produit dans le bol de dissolution. Le milieu de dissolution filtré à travers la membrane CFF est renvoyé dans le bol de dissolution afin qu'il n'y ait pas de perte de milieu de dissolution durant le conditionnement du filtre avant le test. À la fin de l'étape de conditionnement du filtre préalable au test, l'air est purgé à travers les membranes CFF pour que tout le milieu de dissolution soit renvoyé dans le bol.

Le conditionnement du filtre avant le test est important si l'on veut préparer les membranes CFF au premier point dans le temps. Si le conditionnement du filtre avant le test n'est pas suffisamment bien réalisé, la quantité d'échantillon des premiers points dans le temps est réduite. Il est important de disposer d'un volume adéquat d'échantillon pour que le calcul du % dissous soit exact.

Les paramètres initiaux suivants peuvent être utilisés pour le conditionnement du filtre avant le test :

Utilisation	Configuration recommandée
Durée de circulation péristaltique Temps en secondes pour pomper le milieu à travers le filtre	240 s
Volume de purge de la seringue Volume en mL pompé hors du cylindre externe du filtre à flux tangentiel et renvoyé dans le bol	4 mL
Durée de purge de l'air péristaltique La pompe péristaltique est inversée pour vider le volume du noyau central du filtre et le renvoyer dans le bol.	50 s

Phase 2 : Dissolution

L'étape de dissolution commence en introduisant la formulation dans les bols. Avec le système NanoDis, la séquence de test de dissolution est légèrement modifiée. Avant chaque point dans le temps, il est nécessaire de reconditionner le filtre, étape qui s'achève juste avant la survenue du point dans le temps.

Variables de conditionnement du filtre avant un point dans le temps

Utilisation	Configuration recommandée
Durée de circulation péristaltique Temps en secondes pour pomper le milieu à travers le filtre	100 s
Volume de purge de la seringue Volume en mL pompé hors du cylindre externe du filtre à flux tangentiel et renvoyé dans le bol	2 mL

Propriétés de l'échantillonnage aux différents points dans le temps

Utilisation	Configuration recommandée
Volume de perte d'amorçage Volume du tuyau de l'extrémité de la sonde de prélèvement jusqu'à l'aiguille (850-DS) pour permettre un échantillonnage au point dans le temps voulu	3,5 mL
Volume d'échantillon Volume dispensé dans le plateau d'échantillons	1,0 à 5 mL (en fonction de votre analyse)
Volume de rinçage du cylindre extérieur du filtre Volume du milieu de rinçage qui sera pompé dans le cylindre extérieur du filtre ; Volume de purge total = volume de purge + volume de rinçage du cylindre extérieur du filtre	4 mL
Durée de purge du filtre péristaltique Après l'échantillonnage, le milieu d'échantillonnage dans le noyau central du filtre est purgé pour être renvoyé dans le bol. Le paramètre détermine combien de temps la pompe péristaltique devra fonctionner pour purger le noyau du filtre. Le sens est contrôlé par la case à cocher du filtre de purge vers la canule à échantillon.	30 s
Purge de la seringue Le cycle de purge de la seringue vide le cylindre extérieur du filtre et tous les tuyaux du circuit de la seringue entre le filtre et le bol. Volume de purge de la seringue = volume de rinçage du cylindre extérieur du filtre + volume de purge.	4 mL
Cycles de rinçage du cylindre extérieur du filtre À la fin d'un point dans le temps, le noyau externe du filtre peut être rincé avec du milieu de rinçage. La valeur peut être fixée à zéro pour éviter le cycle de rinçage.	1 à 3 fois avec 4 mL

Conseils et astuces

Première utilisation, nettoyage et conservation de la membrane

Les membranes CFF sont expédiées dans du glycérol pour préserver la structure des pores. Il est recommandé de laver les membranes avec au moins 500 mL d'eau purifiée avant la première utilisation ; l'autre option consiste à les laver avec du milieu de dissolution. Il est possible d'utiliser de l'eau purifiée, une solution alcoolique (éthanol 20 % ou isopropanol 20 %), ou une solution de NaOH 0,1 N pour nettoyer les membranes entre deux dissolutions en fonction de la formulation des nanoparticules. Il vaut mieux conserver les membranes à température ambiante dans un milieu de conservation approprié tel qu'une solution de NaOH 0,1 N. On prévient ainsi le développement d'algues et le dessèchement des fibres.

Test d'intégrité des membranes

Le test d'intégrité des membranes CFF est contrôlé avec des nanoparticules standard de la taille moyenne souhaitée, ajustée à la porosité de la membrane CFF désirée. Les nanoparticules PLGA-Lumogen permettent la visualisation de l'intégrité de la membrane par l'absence ou la présence de couleur dans les échantillons.

Test de colmatage des membranes

Le colmatage de membrane CFF se vérifie en menant une expérience de dissolution avec de l'eau et en mesurant la quantité d'échantillon filtré.

Références

1. Protocole de validation des filtres : Collecteur d'échantillons de dissolution Agilent 850-DS. *Présentation technique d'Agilent Technologies*, numéro de publication 5991-3341FR, **2013**.
2. Outil de sélection Repligen « Find a Spectrum Hollow Fiber Filter' selection tool » (<https://www.repligen.com/resources/configurators/selection-tools/find-hollow-fiber-filter>).

www.agilent.com/chem

DE.1479976852

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Imprimé aux États-Unis, le 26 octobre 2020
5994-2347FR

