

Université de Lille

Année Universitaire 2021/2022

Faculté de Pharmacie de Lille

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 14/03/2022

Par M. Romain BOUST

**LE FLACON EN VERRE A USAGE PHARMACEUTIQUE : PRODUCTION, PROPRIETES ET IMPACT
DE CE CONDITIONNEMENT SUR LA FORMULATION D'UN MEDICAMENT BIOLOGIQUE**

Membres du jury :

Présidente et Directrice, conseillère de thèse : MUSCHERT Susanne, Maître de conférences (HDR),
Laboratoire de pharmacotechnie industrielle / UFR3S-Pharmacie.

Assesseur : HAMOUDI Mounira, Maître de conférences, Laboratoire de pharmacotechnie industrielle,
Faculté de pharmacie à Lille / UFR3S-Pharmacie.

Membres extérieurs : BICHET Jean-Paul, Pharmacien, Expert scientifique validation & JENNEVE
Marion, Pharmacienne, LFB à Lille.

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.



Faculté de Pharmacie
de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-président formation tout au long de la vie :	Christophe MONDOU
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-présidente ressources :	Georgette DAL
Directrice Générale des Services :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la faculté :	Claire PINÇON
Assesseur aux études :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Augustin CLERGIER

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86

M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et économie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87

Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et économie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86

Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86

M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et économie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et économie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86

Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et économie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et économie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et économie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80

Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	VAISSIÉ	Alix	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Remerciements

A Mme Muschert,

Malgré des conditions difficiles dû à la situation sanitaire et la distance, je vous remercie pour tous ces précieux conseils, votre disponibilité et gentillesse durant ce travail de recherche et de rédaction. Je tiens à vous remercier aussi pour l'enseignement que j'ai reçu de votre part durant mon cursus universitaire à la Faculté de Lille.

A Mme Hamoudi,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être présente dans mon jury de thèse. Je vous remercie pour toutes ces années d'enseignement et ces TP de galénique.

A Mr Bichet,

Je tiens particulièrement à vous remercier pour votre riche enseignement lors du Master 2 RMQIS ainsi que pour votre disponibilité et votre aide dans la rédaction de cette thèse.

A Mme Jennevé,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être dans mon Jury de thèse, j'espère que vous trouverez intérêt à lire ces lignes.

A mes parents,

Je vous remercie de m'avoir accompagné depuis ma plus tendre enfance et de m'avoir permis d'étudier cette belle discipline qu'est la Pharmacie, je ne serais pas là sans votre soutien et votre présence. Papa, Maman, je vous aime très fort.

A mon frère et ma sœur,

Je vous remercie de m'avoir accompagné durant toutes ces années d'enfances, tant de chamaillerie qui sont de bons souvenirs, et ceux à venir.

A toi Valentine,

Ma loulou, ma femme, ma confidente, la future mère de notre Rosalie. Merci d'être là à mes côtés depuis si longtemps, merci d'être aussi gentille et attentionnée avec moi, merci pour ce bonheur que tu m'apportes au quotidien. Je t'aime très fort.

A mes amis,

Je tiens à remercier particulièrement Thomas avec qui j'ai grandi, merci d'être et d'avoir été là dans beaucoup de moments de ma vie. Merci à Margaux pour sa présence au quotidien, sa bonne humeur, et bonne chance dans son futur rôle de marraine de notre enfant. Merci à tous ceux qui ont partagé pas mal de bières lors de ces années de Faculté, et avec qui nous en partagerons encore.

A mes collègues chez SGD,

Merci à Jingwei et Pierre-Luc pour leurs soutien, leurs gentillesse et l'enseignement qu'ils m'ont apportés sur le conditionnement en verre. Merci à Salomé, Christophe, Yvan pour toutes ces discussions dans le bureau.

Introduction	5
Partie I : Le verre à usage pharmaceutique	7
A. Généralités	8
1. Histoire et définition	8
1.1. L'histoire du verre	8
1.2. Définition du verre	9
2. Composition et mode de production	11
2.1. Composition d'un verre à usage pharmaceutique	11
2.2. Production de verre moulé à usage pharmaceutique	15
2.3. Production de verre étiré à usage pharmaceutique	17
2.4. Avantages et inconvénients des différents modes de production – Cas des flacons	18
2.4.1 Propriétés chimiques	18
2.4.2 Propriétés physiques	20
B. Les différents types de verre en industrie de santé, leurs utilisations et interactions.	20
1. Les types de verre utilisés en industrie pharmaceutique	20
1.1. Verre type III	20
1.2. Verre type I ^{[11] [17] [18]}	21
1.3. Verre type II ^[11]	21
2. Les interactions de produits pharmaceutiques avec un contenant en verre	23
2.1. Hydratation du verre	24
2.2. L'hydrolyse / condensation	25
2.3. Les échanges d'ions	26
2.4. Relargage des éléments du verre	26
3. Synthèse du contexte réglementaire de la production d'articles de conditionnement primaire.	27
C. Conclusion partie I	30
Partie 2 : Interaction verre – Biomolécules	31
A. Les protéines - définitions	32
1. Les acides aminés	32
2. Constitution d'une protéine	34
3. Structure tridimensionnelle des protéines : structure secondaire et tertiaire	37
4. Définitions des immunoglobulines (= Ig) ^{[38] [39]}	41
5. Conclusion	43
B. Interactions entre le conditionnement primaire en verre et les protéines	44
1. Dénaturation des protéines	44
1.1 Dénaturation chimique	44
1.1.1 Impact du pH sur la dénaturation des protéines et leur solubilité	44
1.1.2 Impact de la force ionique sur la solubilité des protéines	46
1.1.3 Agrégation des protéines par des oxydes métalliques	48
1.2 Dénaturation par action mécanique	48
1.2.1 Augmentation particulière par le phénomène de cavitation	48
1.2.2 Augmentation particulière par agitation	53
1.2.3 Comment mitiger ce phénomène	55
2. Adsorption des protéines	57
2.1 Mécanismes d'interactions	60
2.2 Enjeu et Problématique de l'adsorption des protéines	61

2.3	Comment mitiger ce phénomène d'adsorption ?	63
2.3.1	Modification de la surface interne des flacons : couches barrières et modifications de la surface du verre	63
Conclusion		67
Bibliographie		68

Introduction

Lors du développement d'un médicament, les premières étapes de la recherche se concentrent sur la découverte du principe actif, nous sommes en phase I ; c'est la recherche fondamentale. Une fois le candidat médicament trouvé, il sera nécessaire de réaliser des études *in vivo* et *in vitro*, nous sommes à présent en phase II : l'évaluation pré-clinique. Ces études doivent permettre d'apprendre sur la pharmacocinétique du candidat médicament (effet du corps sur le médicament) en termes de :

- A : Absorption, notamment la quantité absorbée par la future voie d'administration prévue.
- D : Distribution, il s'agit de prévoir la fraction de quantité de produit entre le compartiment sanguin et le compartiment tissulaire.
- M : Métabolisme, il est important de l'étudier, et ainsi savoir si des métabolites toxiques peuvent être synthétisés.
- E : Elimination, détermination des voies d'élimination des métabolites et/ou du principe actif.

Ces études doivent aussi mettre en évidence la pharmacodynamie du candidat médicament, c'est-à-dire l'effet du produit sur l'organisme qui peut être de différentes sortes comme la fixation à un récepteur, la reconnaissance d'antigène, la destruction de cellule d'intérêt.

Mais aussi des études toxicologiques avec l'évaluation de différents paramètres qui vont aider à choisir la première dose à administrer chez l'homme.

En fonction des informations que ces études permettent d'obtenir, il est nécessaire de sélectionner la voie d'administration de notre candidat médicament, afin de pouvoir passer en phase III, les premiers essais chez l'homme.

Lors de la transition Phase II – Phase III, intervient le développement galénique, c'est-à-dire la mise en forme du médicament grâce à des excipients pour permettre l'action du principe actif au site d'intérêt. Dans l'exemple d'un principe actif administré par voie orale, absorbé dans l'intestin et sensible à un pH acide, : la mise en forme galénique

va permettre de le protéger de l'acidité de l'estomac en créant un comprimé gastro-résistant.

C'est aussi lors de cette transition que va se poser la question du choix de conditionnement. Principalement dans le cadre de médicaments injectables, la formulation va permettre de lui donner des propriétés de neutralité, d'isotonie au sang et le plus indolore possible. Le conditionnement quant à lui doit permettre de conserver certains paramètres indispensables aux médicaments injectables acquis par le processus de fabrication comme : l'absence de particule, la limpidité, la stérilité, le caractère apyrogène et tout paramètre intrinsèque au médicament (pH, impureté, concentration) [1]. Pour ce faire, le conditionnement primaire doit être le plus inerte possible vis-à-vis du produit, ainsi le choix du verre est une possibilité.

Mais que ce soit en phase de recherche ou lors du conditionnement final pour une mise à disposition aux patients, le conditionnement primaire en verre peut avoir un impact non négligeable sur les propriétés d'une formulation médicamenteuse.

Cette thèse se concentrera sur les différents types de verre à disposition des industriels pour conditionner leurs médicaments, puis sur un mécanisme d'interaction spécifique : les médicaments biologiques et le verre. Nous aborderons dans une première partie des généralités sur le verre, les différents types de verre ainsi que les méthodes de production et les propriétés qui en découlent. Puis dans une deuxième partie nous étudierons les mécanismes d'interactions entre le verre et les produits biologiques.

Partie I : Le verre à usage pharmaceutique

A. Généralités

1. Histoire et définition

1.1. L'histoire du verre

Tout au long de l'histoire de l'humanité, le verre utilisé est à base de silice [2]. Le verre est présent depuis le Néolithique où les hommes utilisaient des pointes de flèches et de petits outils en obsidienne, qui est une roche volcanique vitreuse riche en silice [3] : du verre volcanique. Les premiers objets en verre trouvés datent de 2500 ans avant notre ère et sont des perles de verre égyptiennes [4]. L'utilisation du verre s'est ensuite développée jusqu'à l'invention du soufflage par les Babyloniens vers 250 ans avant J-C qui a permis au verre d'être sous la forme de récipient. Cette pratique a été par la suite démocratisée par les Romains [5].

Le verre a aussi servi de conditionnement pour des fluides précieux au travers de l'histoire. Par exemple, au XIIe siècle, des ampoules en verre étaient utilisées pour le transport d'huile d'onction et pour le sang des martyrs de l'église Catholique. Le verre est utilisé depuis les années 1700 pour le conditionnement de produits pharmaceutiques jusqu'à nos jours, où, le verre est encore un matériau privilégié pour les produits précieux, des exemples sont montrés dans le tableau 1. En effet, le verre procure une barrière à l'environnement (lumière, humidité ...) [6].

Liquide	Prix / Gallon (\$)
Soliris (Anticorps monoclonal – inhibiteur du complément)	46251271
Venin de scorpion	38858507
Copaxone (Immunomodulateur)	27476736
Venin du Cobra de Thaïlande	152835
Parfum Chanel N°5	25600
Insuline	9411

Tableau 1. Quelques exemples de prix aux Etats-Unis d'un gallon de liquide conditionné dans du verre. (1 gallon = 3,785 litres). [6]

1.2. Définition du verre

Le verre est défini comme un solide non cristallisé présentant un phénomène de transition vitreuse [7]. La transition vitreuse est un phénomène réversible qui tend à faire évoluer une forme dure vers une forme plus visqueuse [8]. Ceci rend le verre plus proche d'un liquide à très haute viscosité que d'un solide. Le verre présente ainsi un désordre structural tel que représenté dans la Figure 1.

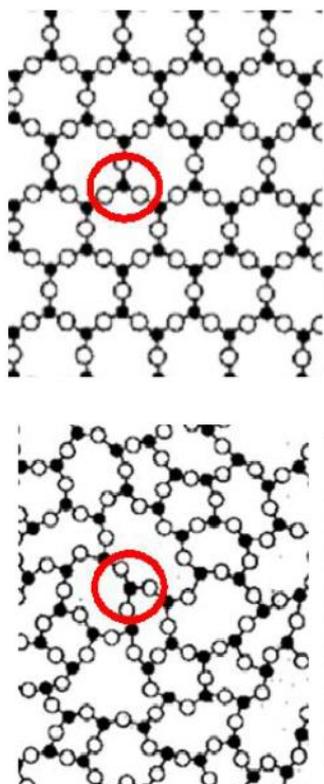


Figure 1. Représentation en 2D de l'organisation structurale. En haut, la structure du SiO2 sous forme cristalline. En bas le SiO2 sous forme vitreuse. [7]

Dans une organisation cristalline (en haut dans la Figure 1), les atomes sont organisés selon un motif qui se répète au sein de la matrice de manière homogène, et ce dans toutes les directions de l'espace. Dans le cas d'une forme vitreuse le motif est le même, cependant, l'organisation et la répétition du motif dans l'espace ne sont plus homogènes : il y a un désordre structural.

Ces organisations ont pu être observées par ADF-STEM (Microscopie électronique à balayage à transmission (STEM) en mode imagerie par couronne en champ sombre (ADF)). (Figure 2)

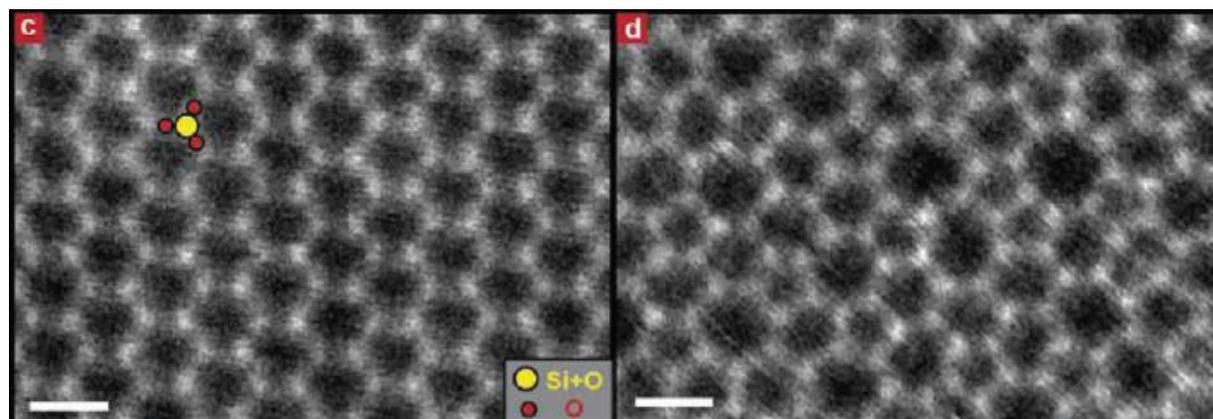


Figure 2. Imagerie en ADF-STEM d'une organisation cristalline à gauche (c), et d'une organisation non cristalline à droite (d). [9]

2. Composition et mode de production

2.1. Composition d'un verre à usage pharmaceutique

Il est possible de former différents types de verre pour divers usages (optique, arts de la table, alimentaire...), cependant le verre à usage pharmaceutique doit respecter une composition spécifique pour être conforme à la pharmacopée européenne mais aussi pour permettre de limiter au maximum les interactions entre le médicament et le contenant.

Un verre à usage pharmaceutique peut être de 2 types :

- Verre borosilicate
- Verre sodocalcique

Ces deux types de verres vont avoir des compositions et des propriétés différentes. Il est possible de façonner des verres transparents et des verres ambrés pour les deux types de verre.

	<i>Verre borosilicate</i>	<i>Verre sodocalcique</i>
SiO_2	65-72%	70-74%
CaO	0-4%	9-13%
Na_2O	5-9%	11-14%
B_2O_3	10-14%	0%
<i>Autres (Al_2O_3, BaO, ZnO, MgO, K_2O...)</i>	8-13%	4-7%

Tableau 2. Comparaison de la composition des verres borosilicates et des verres sodocalciques.

SiO₂ : Dioxyde de silicium ou silice. C'est l'élément majoritairement présent dans la composition d'un verre à usage pharmaceutique, c'est le formateur du réseau vitreux par enchaînement de tétraèdres SiO₄ via des liaisons Si-O-Si. Le trioxyde d'aluminium (Al₂O₃) peut aussi être utilisé en parallèle du dioxyde de silicium permettant une réduction de la température de fusion du mélange.

Na₂O : L'oxyde de sodium est un fondant, il va permettre de baisser la température de fusion de la silice (de 1700°C pour de la silice pure à 1500°C pour cette composition). Cette molécule va apporter un oxygène supplémentaire au réseau de -O-Si-O-Si- et ainsi casser ce réseau pour former un oxygène dit « non pontant » (Figure 3), c'est-à-dire que l'atome d'oxygène ne sera pas lié à deux atomes de silice, mais seulement à un seul^[7].

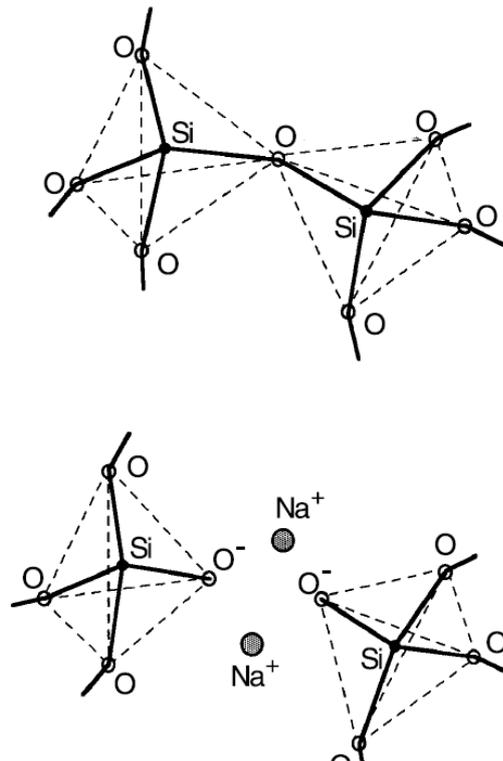


Figure 3. Rupture d'une liaison Si-O par introduction d'une molécule de Na₂O dans le réseau de silice^[10]

L'introduction des oxydes alcalins va donc induire une discontinuité dans le réseau de Si-O. Cette discontinuité va engendrer un abaissement de la température de fusion et une réduction de la viscosité par déstabilisation du réseau vitreux.

CaO : L'oxyde de calcium est un stabilisant. L'ion calcium Ca^{2+} va permettre de stabiliser le réseau vitreux par compensation de charge dans deux principaux cas :

- Stabiliser les tétraèdres d'aluminium lorsque celui-ci est présent dans la matrice.
- Dans le cas d'oxygène non pontant O^- .

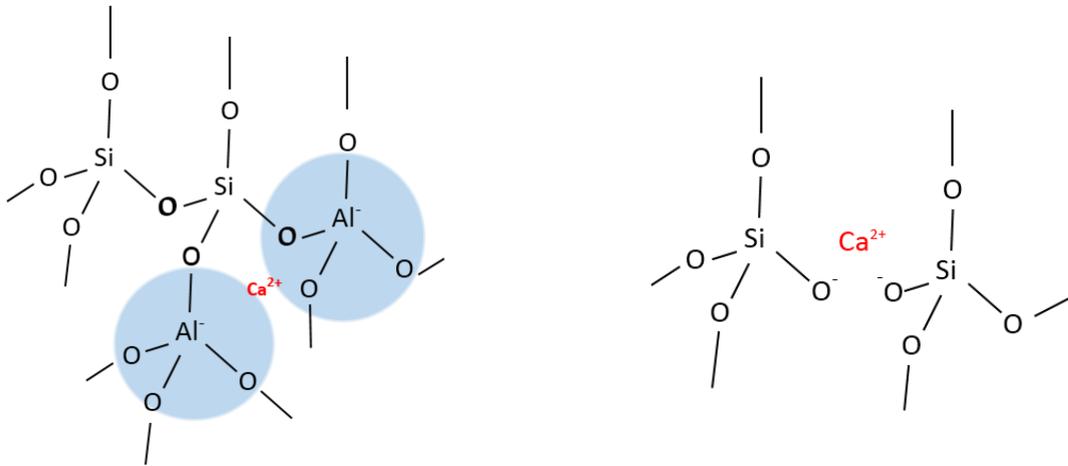


Figure 4. Exemple de compensation de charge de l'ion calcium. A gauche la stabilisation de tétraèdres d'aluminium. A droite la stabilisation d'oxygène non pontant.

De même que l'oxyde de sodium, l'oxyde de calcium provoque la création de deux oxygènes non-pontants. La liaison Si-O-Si du réseau vitreux va aussi être rompue, mais stabilisée de manière plus importante grâce à la charge du calcium : la liaison est partiellement maintenue. Ainsi, les oxydes d'alcalino-terreux vont engendrer un abaissement de la viscosité et de la température de fusion modérée comparé aux oxydes d'alcalin.

B₂O₃ : Trioxyde de dibore, simplifié en trioxyde de bore. C'est un formateur de réseau qui a tendance à former son propre réseau au sein de la matrice de silice. En effet, la structure bi-dimensionnelle du trioxyde de bore formée par ses trois liaisons est moins rigide que le réseau tridimensionnel du dioxyde de silicium formé par ses quatre liaisons. Ainsi, l'ajout de trioxyde de bore permet de remplacer en partie les oxydes d'alcalin et d'alcalino-terreux dans la composition, et d'obtenir les mêmes propriétés en termes de viscosité et d'abaissement de la température de fusion.^[10]

FeO, Fe₂O₃, TiO₂ : Ces composés sont ajoutés pour former un verre ambré. Ces verres sont utilisés en cas de principe actifs sensible à la lumière. La pharmacopée européenne chapitre 3.2.1 définit des limites de transmittance lumineuse pour les

verres colorés. La transmittance lumineuse est définie comme le calcul du rapport entre la grandeur en entrée et en sortie d'un faisceau lumineux :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Où :

T = Transmittance

I = Intensité transmise

I₀ = Intensité incidente

Pour des préparations non destinées aux préparations parentérales, la transmittance mesurée ne doit pas être supérieure à 10% pour des longueurs d'ondes comprises entre 290 nm et 450 nm. Alors que pour des préparations parentérales, la transmittance est dépendante du volume nominal du conditionnement.

Pourcentage maximal de transmission spectrale aux longueurs d'onde comprises entre 290 nm et 450 nm		
Volume nominal (mL)	Réipients scellés à la flamme	Réipients avec système de fermeture
Inférieur ou égal à 1	50	25
Supérieur à 1, inférieur ou égal à 2	45	20
Supérieur à 2, inférieur ou égal à 5	40	15
Supérieur à 5, inférieur ou égal à 10	35	13
Supérieur à 10, inférieur ou égal à 20	30	12
Supérieur à 20	25	10

Tableau 3. Limites de transmittance pour les réipients de verre coloré destinés aux préparations parentérales ^[11].

2.2. Production de verre moulé à usage pharmaceutique

Schéma de principe de la production d'un verre moulé :

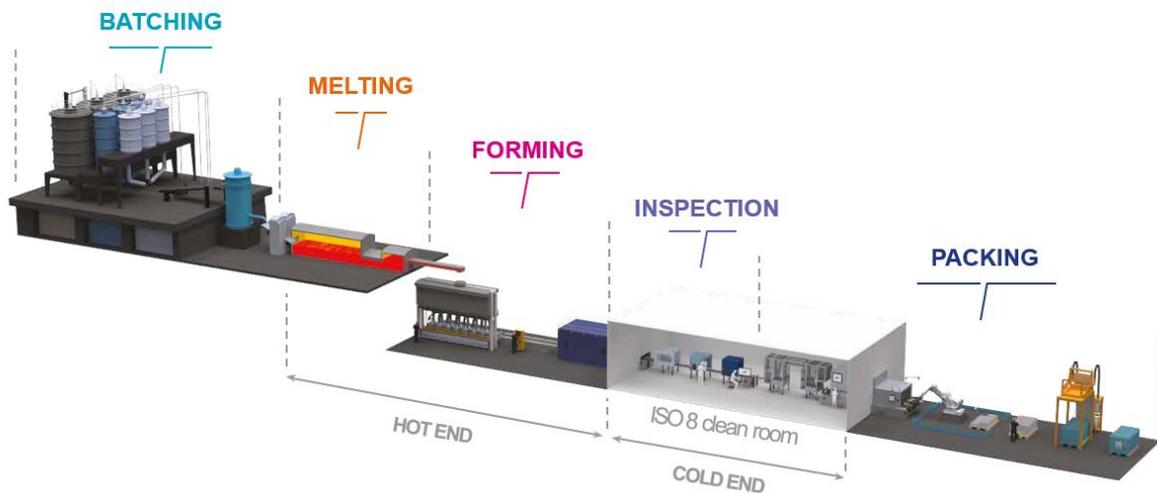


Figure 5. Schéma d'une ligne de production de verre moulé issu d'une présentation commerciale de SGD Pharma .^[12]

La figure 5 présente les 5 étapes de la réalisation d'un flacon en verre moulé. Cette méthode de production est utilisée uniquement pour l'élaboration de flacons. Les autres conditionnements sont produits à l'aide d'un autre procédé.

La première étape est le dosage, ou batching en anglais. L'élaboration d'un verre nécessite d'avoir et de maintenir une composition spécifique, il est donc nécessaire de peser précisément chaque matière première avant de les introduire dans le four. Il existe de nombreuses matières premières parmi lesquelles nous pouvons trouver ^[13] :

- Le sable : cette matière va principalement apporter la silice
- La néphéline ($\text{Na}_3\text{KAl}_4\text{Si}_4\text{O}_{16}$) : principalement source d'aluminium
- Le borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) : utilisé uniquement dans les verres borosilicatés
- Le Feldspath ($\text{Ba, Ca, Na, K, NH}_4$) (Al, B, Si) $_4\text{O}_8$)
- Sulfate de sodium (Na_2SO_4)
- Calcaire (CaCO_3) : principale source de calcium, et de magnésium dans sa forme mixte ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$)

La deuxième étape est la fonte (ou melting en anglais) ainsi que le mélange de ces composés. Il existe de nombreux types de fours qui permettent par des mouvements de convection d'obtenir un mélange homogène après avoir porté ce mélange à environ 1500°C.

La troisième étape est le formage des flacons (ou forming en anglais). A la sortie du four, le verre sous forme visqueuse va tomber à l'aide de la gravité goutte par goutte à l'intérieur des machines de formage. Il existe 2 méthodes pour cette étape : le soufflé-soufflé ainsi que le pressé-soufflé.

Le soufflé-soufflé :

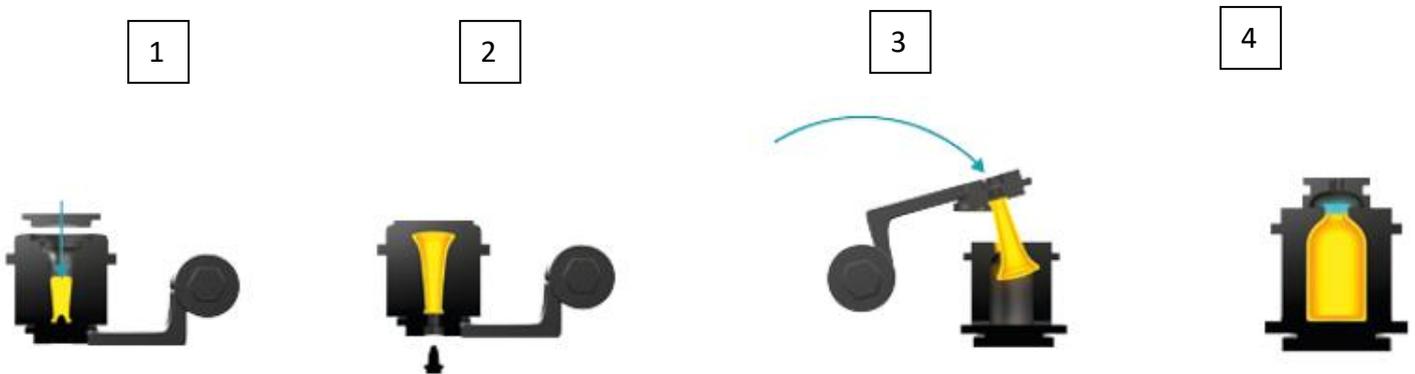


Figure 6. Présentation de la méthode soufflé-soufflé issue d'une présentation commerciale de SGD Pharma ^[12]

La goutte de verre va tomber dans un premier moule appelé ébaucheur présentant un poinçon inférieur permettant de mouler la bague (1). Ensuite, un premier soufflage va être appliqué du bas vers le haut afin de former l'ébauche (2). Cette ébauche va ensuite être transférée dans un autre moule dit finisseur (3). Enfin, une deuxième étape de soufflage du haut vers le bas va permettre de former le flacon final (4).

Le pressé-soufflé :

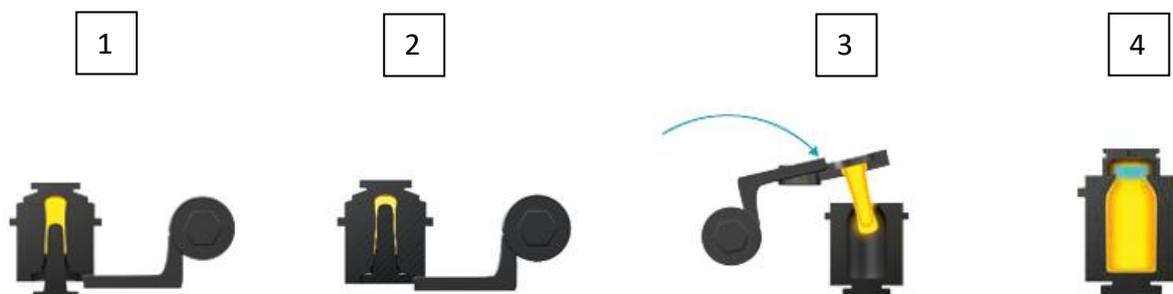


Figure 7. Présentation de la méthode Pressé-soufflé issue d'une présentation commerciale de SGD Pharma ^[12]

Tout comme la méthode précédente, la goutte de verre va tomber dans un premier moule ébaucheur (1). Ce moule dispose d'un poinçon inférieur qui va monter afin de former la bague et l'ébauche par pression (2). L'ébauche va ensuite être transférée dans le moule finisseur (3). Le flacon sera formé par soufflage pour prendre la forme du moule (4).

Après le formage, les flacons vont être réchauffés dans une arche à une température entre 500-600°C et refroidis lentement afin de libérer les tensions internes dues au procédé de fabrication. Cette étape permet de renforcer les propriétés mécaniques du verre.

La quatrième étape de production d'un flacon à usage pharmaceutique est l'inspection. C'est une étape primordiale pour assurer la sécurité du patient final. En effet, chaque flacon est inspecté afin d'éliminer tous les flacons défectueux. Le risque étant d'avoir des flacons présentant des fissures, des fragilités pouvant engendrer une particule de verre après conditionnement final du médicament.

Enfin la cinquième étape est l'emballage et la palettisation pour un envoi sur les sites de production pharmaceutique.

2.3. Production de verre étiré à usage pharmaceutique

Schéma de principe de la production d'un verre étiré :

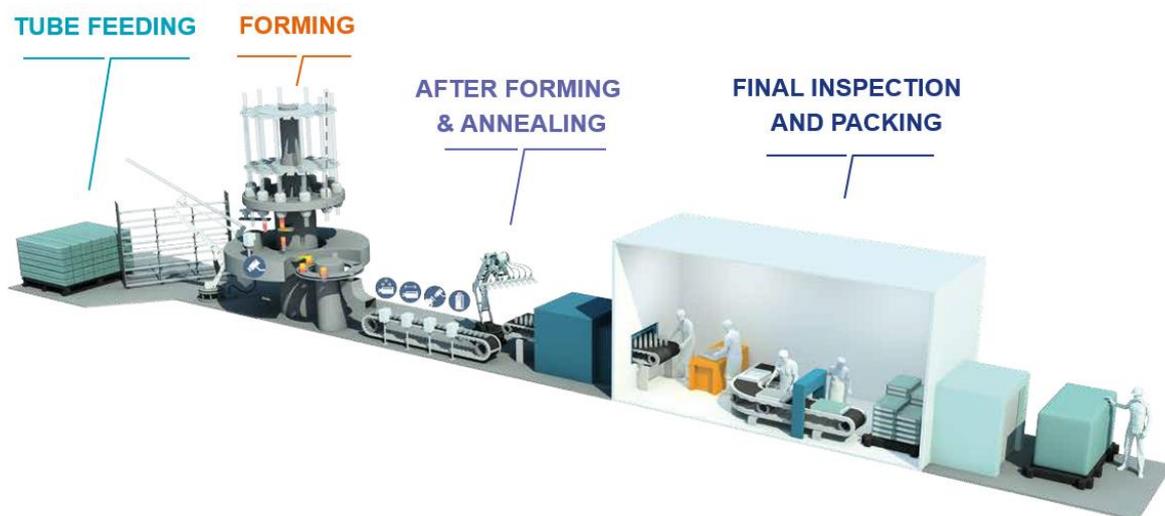


Figure 8. Schéma de production de verre étiré issue d'une présentation commerciale de SGD Pharma^[12]

La figure 8 présente les différentes étapes de production d'un verre dit étiré. Ce mode de production est applicable pour toutes les formes disponibles de conditionnement :

- Flacons
- Seringues
- Ampoules

La première étape (non présentée sur la figure 8) est l'élaboration d'une canne de verre, c'est-à-dire un long tube de verre creux de plusieurs mètres, cette canne est un produit semi-fini.

Ces cannes seront ensuite insérées verticalement dans une machine de conversion. Ces longues cannes vont être chauffées localement afin de les couper et ainsi former le flacon. Par exemple, une canne de verre de 5 mètres va être convertie en 100 flacons de 5 cm de haut.

Ensuite, comme pour la fabrication de verre moulé, ces produits en verre vont être chauffés dans une arche et refroidis progressivement afin de libérer les tensions internes du verre, puis être inspectés pour éliminer tout défaut potentiellement dangereux pour le patient final.

2.4. Avantages et inconvénients des différents modes de production – Cas des flacons

2.4.1 Propriétés chimiques

La résistance chimique est évaluée en fonction de la résistance hydrolytique du conditionnement primaire en verre. La résistance hydrolytique est définie par l'académie nationale de Pharmacie comme : « la résistance offerte par un verre à la cession de substances inorganiques hydrosolubles dans des conditions déterminées de contact entre la surface du récipient et l'eau »^[14].

La pharmacopée européenne définit le protocole pour la réalisation de ces essais. Il existe deux types d'essais de résistance hydrolytique : de la surface interne, sur verre en grains^[11].

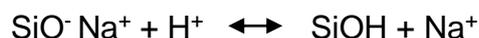
Résistance hydrolytique de la surface interne des récipients en verre :

Les récipients en verre devront être remplis avec de l'eau jusqu'à un volume de remplissage prédéfini puis bouchés à l'aide d'un matériau inerte. Ces récipients seront ensuite autoclavés selon un cycle de référence :

- Élévation de la température à 100°C en 20-30min
- Maintien de la température à 100 ± 1°C pendant 10 ± 1 min
- Elévation de la température à 121°C en 20-22 min
- Maintien de la température à 121 ± 1°C pendant 60 ± 1min
- Baisse de la température à 100°C en 40-44 min

Les flacons peuvent ensuite être retirés de l'autoclave et refroidis jusqu'à la température ambiante en 30min.

L'attaque du verre par de l'eau peut se résumer à une extraction des ions sodium (Na⁺) du verre remplacés par des ions H⁺ suivant l'équation suivante :



La mesure de résistance hydrolytique est donc basée sur un dosage de l'alcalinité de la solution à l'aide d'acide chlorhydrique [0.01N] et le rouge de méthyle comme indicateur de pH coloré^[15].

Plus la quantité d'acide chlorhydrique est important pour observer le virage de l'indicateur coloré, plus la solution est alcaline. C'est-à-dire qu'il y a une présence plus importante de composés inorganiques du verre en solution. Donc que le verre est moins résistant.

Résistance hydrolytique sur verre en grains :

La méthodologie de titrage est similaire à la résistance hydrolytique de la surface interne. Cependant, le récipient en verre sera ici broyé afin de tester l'intégralité et non uniquement la surface interne.

Le verre moulé a une meilleure résistance hydrolytique de surface que les verres étirés pour une même composition. Ceci est expliqué par les deux étapes de fonte du verre pour le processus de production du verre étiré (production de la canne, puis refonte locale pour découper cette canne). Cette deuxième fonte peut provoquer des modifications de la composition du verre en surface sur les zones refondues.

Cependant, le verre étiré a un réseau de formateurs plus important, si on le compare au verre moulé qui est fondu à plus basse température pour pouvoir être façonné. Le verre étiré aura une meilleure résistance hydrolytique en grains. ^[16]

2.4.2 Propriétés physiques

Propriétés mécaniques :

Un flacon en verre moulé aura une masse de verre plus importante qu'un flacon en verre étiré. Ceci va conférer une résistance mécanique (chocs, casse) et une résistance aux chocs thermiques plus importante pour les flacons en verre moulé.

Du fait des processus de fabrication, les flacons en verre étiré auront une meilleure stabilité dimensionnelle, comparé à un verre moulé. De plus, le fait que le verre en fusion soit au contact du métal dans le moule, les flacons en verre moulé seront visuellement « moins beaux » qu'un flacon en verre étiré. Cela étant principalement lié à l'inhomogénéité de la masse de verre d'un flacon moulé et de la rugosité de surface.

Propriétés industrielles :

La cadence de production est l'un des principaux avantages au flacon moulé. En effet, ces flacons pourront être produits à une cadence jusqu'à 10 fois supérieure aux cadences de production d'un verre étiré.

B. Les différents types de verre en industrie de santé, leurs utilisations et interactions.

1. Les types de verre utilisés en industrie pharmaceutique

1.1. Verre type III

Ce sont des verres silico-sodocalciques (SiO_2 , CaO , Na_2O) ; cette catégorie représente la majorité des verres sur le marché. Le verre de type III est utilisé dans tous types de produits ne nécessitant pas une résistance hydrolytique (RH) élevée, comme pour les bouteilles alimentaires, le vitrage, le verre à usage domestique.

Ce type de verre peut être utilisé pour tout médicament injectable non aqueux. Par exemple pour des poudres à reconstituer à l'exception des médicaments lyophilisés.

1.2. Verre type I ^[11]^[17]^[18]

Un récipient en verre de type I est défini à la Pharmacopée Européenne comme un « récipient en verre neutre possédant une résistance hydrolytique élevée due à la composition chimique de la masse ». De plus un récipient en verre neutre est défini comme un verre borosilicaté dont le réseau vitreux contient des quantités significatives d'oxyde borique, d'oxyde d'aluminium, d'oxydes de métaux alcalins et/ou d'alcalino-terreux.

Un verre de type I, en plus de cette résistance hydrolytique élevée, possédera une résistance mécanique plus importante aux tests de :

- Pression interne – Le principe de ce test est de remplir le flacon continuellement en eau jusqu'à rupture de celui-ci. Ce test reflète la capacité d'un conditionnement primaire à supporter des changements de pression, notamment lors de la lyophilisation. Ce test est normalisé dans l'ISO 7458
- Résistance au choc thermique. Le principe de ce test est de volontairement provoquer un choc thermique en immergeant les flacons dans un bain d'eau chaude et d'eau froide. Ce test est normalisé dans l'ISO 7459
- Résistance à une charge verticale – Ce test permet de simuler l'étape du capsulage des flacons après remplissage. Ce test est normalisé dans l'ISO 8113

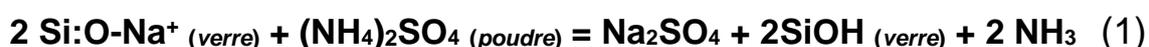
Le verre de type I, possédant une résistance aux chocs thermiques est donc une option très intéressante pour les processus de lyophilisation, de dépyrogénéation, ou de stérilisation terminale en industrie pharmaceutique.

Un récipient en verre de type I est disponible sous de nombreuses formes comme des ampoules, des seringues, des flacons moulés ou étirés. Ce type de verre peut être utilisé pour conditionner la plupart des préparations, qu'elles soient parentérales ou non.

1.3. Verre type II ^[11]

Le verre de type II a été développé pour améliorer la résistance hydrolytique des flacons. C'est un verre de type III, qui a subi un traitement de surface spécifique pour créer une couche désalcalinisée à la surface interne du verre, et permet ainsi d'éviter les échanges d'ions entre le médicament et le verre. Avec le temps, et en contact du médicament, cette couche superficielle peut disparaître et ne plus assurer sa fonction protectrice. Ce type de verre ne peut pas être utilisé pour le stockage de solution alcaline à long terme, mais il peut être utilisé pour tous les autres types de médicaments.

Par exemple, ce type de traitement peut être réalisé à l'aide de sulfate d'ammonium. En contact avec le verre chaud, ce composé va permettre d'extraire les ions sodium en surface du verre suivant l'équation de réaction suivante :



Type III

Type II



Photo 1. Photo d'un flacon Type III à gauche et du même flacon après traitement à droite.

Le traitement de ces flacons est visible généralement par un voile blanc, facilement lavable à l'eau sur la surface du flacon comme montré en photo 1. De plus, des

analyses ToF-SIMS peuvent montrer un appauvrissement en sodium de la surface du verre, pour redevenir type III dans la masse du verre, représenté dans la figure 9.

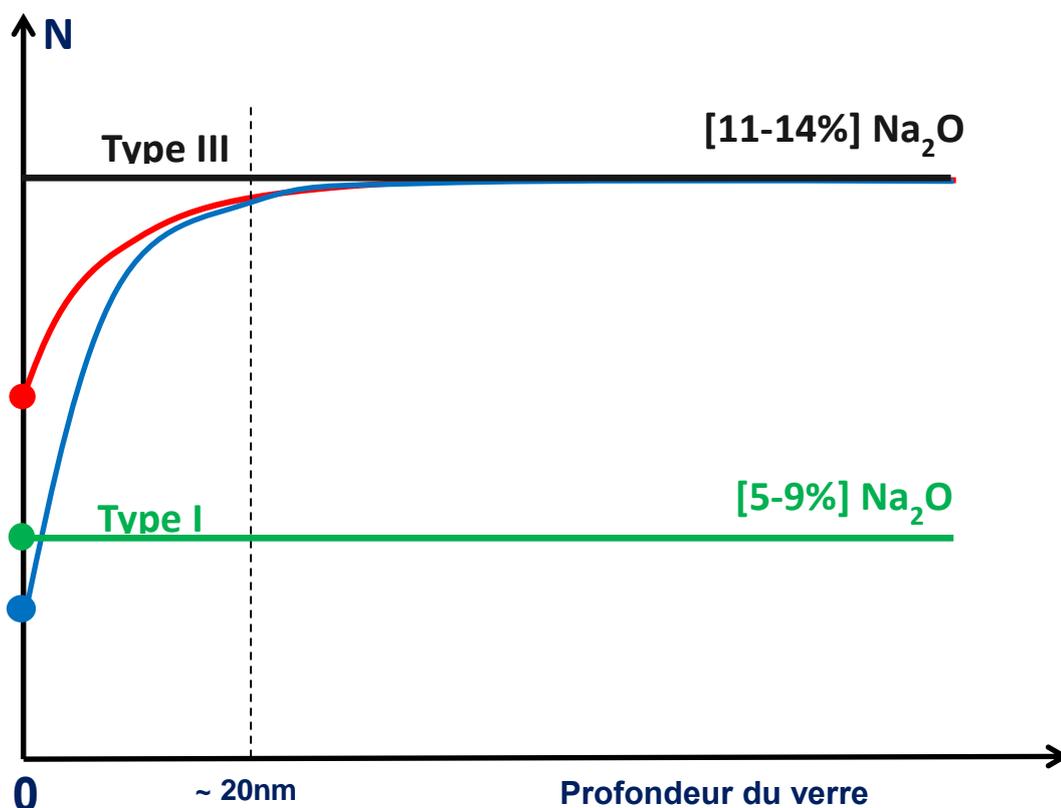


Figure 9. Schéma représentant le taux en sodium en fonction de la profondeur du verre et du type de verre. Les flacons de type II montrent une réduction du taux de sodium en surface et en profondeur du verre. En rouge la représentation d'un verre de type II relativement peu traité, et en bleu la représentation d'un verre de type II mieux traité.

2. Les interactions de produits pharmaceutiques avec un contenant en verre

Il existe de nombreuses compositions de produits pharmaceutiques de nos jours. Cependant, les plus critiques d'entre eux sont les produits à usage parentéral. En effet, ce mode d'administration va permettre d'injecter un produit en s'affranchissant des barrières physiologiques (peau, muqueuse...). La composition des médicaments injectables peut varier, mais le principal solvant est l'eau. Dans ce chapitre, nous allons principalement aborder les interactions entre une solution aqueuse et le verre.

Ces interactions entre le médicament et le verre peuvent provoquer diverses problématiques comme ^[19] :

- La génération de paillette(s) de verre en solution, aussi appelée « Délamination ».
- Des changements de pH du médicament conditionné.
- La concentration d'éléments du verre en solution (Si, Na, Ca, B...)

Il existe principalement trois grandes catégories de réaction qui peuvent avoir lieu entre le verre et une solution aqueuse [20] :

- 1- L'hydratation du verre, qui consiste en une pénétration de molécules d'eau dans la matrice de verre
- 2- L'hydrolyse et la condensation des liaisons Si-O-Si
- 3- L'échange ionique.

De plus, le verre n'est pas inerte vis-à-vis des composés biologiques. Du fait des liaisons Si-OH en surface, ces composés peuvent s'adsorber, comme nous le verrons en partie II.

2.1. Hydratation du verre

Le verre est un matériau généralement stable, mais en présence d'eau sous forme liquide ou de gaz, le verre devient plus vulnérable [21]. Cette hydratation est représentée par des molécules d'eau qui vont pénétrer la matrice du verre. Ces molécules d'eau peuvent fragiliser cette matrice et ainsi favoriser l'apparition de fissures, de débris de verre ou encore accélérer la corrosion [22].

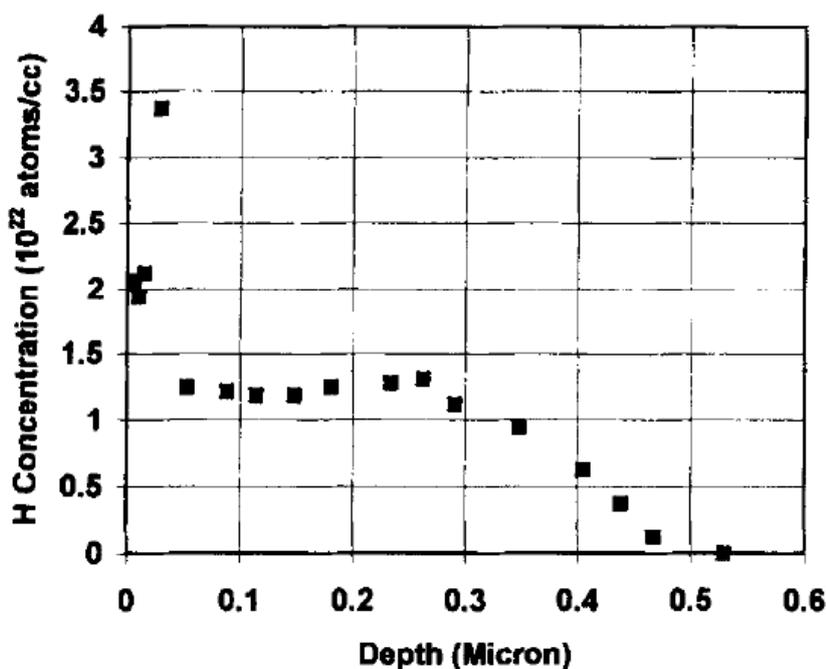


Figure 10. Profil de concentration d'hydrogène mesuré en NRA (Nuclear Reaction Analysis) sur des échantillons exposés à l'air et à l'humidité [22].

La Figure 10 montre une augmentation de la concentration en atome d'hydrogène à la surface du verre mais aussi en profondeur de la masse de verre (sur 0.4 μm). L'intégration des molécules d'eau en profondeur est surtout observable lors d'un contact liquide/solide.

Dans le cas où le verre est uniquement soumis à l'humidité ou de la vapeur d'eau, les molécules d'eau vont s'adsorber à la surface du verre et former un film d'eau. Du fait de la différence d'électronégativité entre l'atome d'oxygène (3,44) et l'atome d'hydrogène (2,2), l'atome d'oxygène va attirer les électrons d'une liaison O-H et ainsi créer un dipôle. Ce dipôle va pouvoir se fixer par des liaisons hydrogènes comme le montre la figure 11.

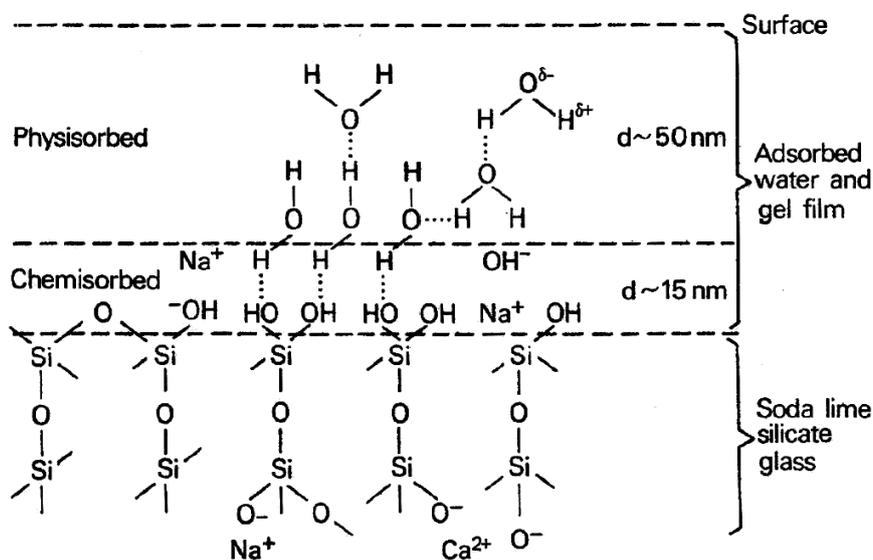


Figure 11. Représentation schématique de la formation d'un film d'eau à la surface du verre [23].

2.2. L'hydrolyse / condensation

L'hydrolyse et la condensation sont deux réactions chimiques opposées qui peuvent rompre et reformer les liaisons Si-O-Si du verre selon l'équation de réaction suivante [20] :



Cette réaction de dissolution du verre est tellement lente à température ambiante que le verre est considéré comme inerte vis-à-vis de la réaction d'hydrolyse, notamment via l'humidité avant remplissage. Généralement, il faudrait plusieurs dizaines d'années

d'exposition à l'humidité pour pouvoir observer une altération significative de la surface. Cependant, en augmentant la température, cette réaction peut être significativement accélérée. [24]

2.3. Les échanges d'ions

Dans le cas où la matrice de verre comporte des ions libres comme Na^+ , le phénomène d'échange d'ion sera prédominant par rapport aux précédents. C'est notamment pour cela que les verres sodo-calciques ont une résistance à l'eau (résistance hydrolytique) moindre qu'un verre borosilicaté. En effet, pour les verres contenant des oxydes d'alcalins, l'eau va déplacer ces éléments par échange d'ions, et ainsi déstabiliser la matrice selon l'équation suivante [19] :



Cette équation peut être complétée sous la forme suivante :



Cette réaction, qui se déroule après le remplissage, va engendrer potentiellement des changements de pH de la solution, une déstabilisation de la matrice, donc une augmentation des composés du verre en solution par lixiviation.

Si les 3 réactions interviennent dans le même temps, chaque réaction peut influencer la cinétique et les mécanismes des autres réactions. [24]

2.4. Relargage des éléments du verre

Par les mécanismes vus précédemment, beaucoup d'autres éléments du verre peuvent se retrouver en solution. Le verre est composé d'unités de silicate isolées séparées par des cations modificateurs par exemple le magnésium, Mg^{+2} . Dans une solution acide les groupes silicate se transforment en acide silicique lorsque les liaisons Mg-O sont protonées. [25]



En déstabilisant la structure non cristalline du verre, les éléments du verre vont se retrouver en solution. Ainsi après un temps de contact significatif des traces de Magnésium, Calcium, Silice, Aluminium, Zinc, Titane, Fer etc... vont être relarguées dans la solution. La quantité va être dépendante du type de verre, du pH de la solution, des excipients.

Le verre est un matériau complexe, les interactions avec une solution sont difficilement prédictibles, chaque formulation est unique et ne réagit pas de la même manière avec le verre.

Il est par exemple reconnu que l'EDTA est un excipient qui accélère la dégradation du verre. Cet excipient est utilisé dans plusieurs formulations de produits biologiques conditionnés dans du verre :

- 4- NUCALA 100mg (MEPOLIZUMAB) indiqué dans l'asthme à éosinophile
- 5- AMIVANTAMAB 50mg indiqué dans le cancer du poumon à petite cellule
- 6- CYTEAL indiqué dans le nettoyage des affections de la peau et des muqueuses primitivement bactériennes ou susceptibles de se surinfecter

Ainsi, des études d'interactions contenant/contenus sont indispensables dans tout développement de médicament afin de s'assurer de la compatibilité chimique de la solution médicamenteuse avec le conditionnement primaire choisi.

3. Synthèse du contexte réglementaire de la production d'articles de conditionnement primaire.

La production d'article de conditionnement primaire en verre, que ce soit des flacons, des ampoules ou des seringues est légalement régie par la pharmacopée européenne

3.2.1. La pharmacopée européenne définit chaque type de verre (I, II, III) ainsi que les résistances hydrolytiques associées. De plus, des essais spécifiques comme l'absence d'Arsenic sont nécessaires afin de libérer des conditionnements primaires en verre à usage humain. La pharmacopée européenne est un recueil de normes communes du Conseil de l'Europe destinées au contrôle de la qualité des médicaments à usage humain ou vétérinaires. En plus de la pharmacopée européenne, il existe trois autres principales pharmacopées : Américaine, Chinoise et Japonaise.

De plus, des normes ISO (International Standard Organisation) sont spécifiquement applicables à ce type de production. La norme ISO 15378 « Articles d'emballage primaire pour médicaments – Exigences particulières pour l'application de l'ISO 9001 prenant en considération les Bonnes Pratiques de Fabrications (BPF) » permet de faire le lien entre le système de management de la qualité défini dans l'ISO 9001 en y ajoutant des exigences présentes dans les BPF européennes éditées par l'EMA et reprises par l'ANSM. L'ISO est l'Organisation Internationale de normalisation composée de représentants de 167 pays. C'est la plus grande organisation non gouvernementale de normalisation au monde dans les domaines industriels et commerciaux.

On va retrouver dans cette norme, par exemple, l'obligation d'une formation complémentaire aux Bonnes Pratiques de Fabrication (section 7.2.2) pour toute personne de l'entreprise, et plus particulièrement aux personnels impliqués dans la fabrication des composants stériles ou des composants destinés à être stérilisés. Ainsi que des exigences relatives à l'enregistrement et au stockage des données (en lien avec l'annexe 11 des BPF), la maîtrise des fournisseurs (en lien avec le chapitre 7 des BPF), la qualification et validation (en lien avec l'annexe 15 des BPF), la propreté et la maîtrise de la contamination (en lien avec le chapitre 3 des BPF et l'annexe 1), la maîtrise des changements et des déviations (en lien avec le chapitre 1 des BPF), l'instauration de la notion de lot et de la libération...

La série de 7 normes ISO 8362 permet aussi de définir les tolérances dimensionnelles en fonction du mode de production du flacon en verre, mais aussi des bouchons et des capsules associées.

L'aspect dimensionnel des conditionnements primaires est aussi régi par de nombreuses normes dans différents pays. Par exemple le CETIE est une association française à but non-lucratif interprofessionnelle et internationale qui édite une documentation technique concernant les emballages en verre et PET dédiés au conditionnement de liquides (alimentaire, cosmétique et pharmaceutique). La série de norme DT 15 va par exemple décrire les capacités ras-bord, les tolérances en hauteur, diamètre corps...

L'équivalent du CETIE existe aux Etats-Unis sous l'appellation GPI (Glass Packaging Institute). C'est une association américaine qui promeut l'utilisation du verre, les règles

de recyclage, mais aussi édite des normes relatives au conditionnement primaire incluant des tolérances dimensionnelles spécifiques pour le marché américain.

Les normes ICH sont aussi applicables dans ce domaine, notamment l'ICH Q3D qui permet de vérifier l'absence de métaux lourds relargués dans une solution pharmaceutique par le conditionnement primaire en verre.

De nouvelles considérations sont à prendre en compte, notamment l'évaluation de l'intégrité des conditionnements primaires pour préparations stériles (ou CCI, Container Closure Integrity). La monographie USP <1207> définit des limites acceptables ou non de fuite du conditionnement primaire afin de garantir et de maintenir la stérilité. De plus, ces considérations se sont renforcées dans la révision de l'annexe 1 des Bonnes Pratiques de Fabrications

Finishing of sterile products

8.20 Open primary packaging containers (including partially stoppered vials or prefilled syringes) should be maintained under Grade A conditions with Grade B background (e.g. Barrier Technology), or under Grade A conditions with physical segregation from operators (e.g. UDAF carts) until the stopper is fully inserted.

8.21 Containers should be closed by appropriately validated methods. Containers closed by fusion, e.g. Blow-fill-seal (BFS), Form-Fill-Seal (FFS), Small and Large Volume Parenteral (SVP & LVP) bags, glass or plastic ampoules, should be subject to 100% integrity testing. Samples of containers closed by other methods should be taken and checked for integrity using validated methods. The frequency of testing should be based on the knowledge and experience of the container and closure systems being used. A scientifically valid sampling plan should be utilized. The sample size should be based on information such as supplier approval, packaging component specifications and process knowledge. It should be noted that visual inspection alone is not considered as an acceptable integrity test method.

8.22 Containers sealed under vacuum (where the vacuum is necessary for the product stability) should be tested for maintenance of vacuum after an appropriate pre-determined period and during shelf life.

8.23 The container closure integrity validation should take into consideration any transportation or shipping requirements that may negatively impact the integrity of the container (e.g. by decompression or temperature extremes).

Figure 12. Extrait de la révision de l'annexe 1 des BPF - Chapitre 8 relatif aux produits finis stériles - Disponible en Anglais

C. Conclusion partie I

Le verre a toujours eu une place de choix lorsqu'il s'agit de conditionner boissons, médicaments ou produits cosmétiques. Les différentes méthodes de production peuvent apporter à ce conditionnement primaires certaines propriétés intéressantes voire primordiales notamment dans le cas de produit stérile. Bien que certains éléments du verre puissent se retrouver dans une préparation pharmaceutique, le verre conserve une certaine neutralité vis-à-vis du médicament.

Dans le cas de médicaments biologiques, le verre peut avoir un impact direct sur le principe actif, plus particulièrement sur les protéines. Les protéines ont une structure biologique complexe qui leur permet d'avoir une activité spécifique sur le fonctionnement du corps humain. Si cette protéine est dégradée, une perte d'activité voire un risque pour le patient peut avoir lieu.

Partie 2 : Interaction verre – Biomolécules

A. Les protéines - définitions

Avant de s'intéresser au mécanisme d'adsorption des protéines, il est important de comprendre la structure de base d'une protéine. Une protéine est un biopolymère, c'est-à-dire, une association de bio-monomères. Pour une protéine, cette structure de base sont les acides aminés.

Les protéines jouent un rôle primordial dans le vivant, elles ont un rôle structural en participant au renouvellement des tissus musculaires, des cheveux, des poils, de la matrice osseuse, de la peau... [26] Elles participent aussi à de nombreux processus physiologiques : par exemple à la digestion via des enzymes digestives, au transport de l'oxygène (hémoglobine). Ce sont aussi les hormones et les récepteurs, qui jouent le rôle de messenger chimique permettant de réguler la croissance, la reproduction, le sommeil, la faim, l'humeur, le métabolisme... Les protéines sont aussi essentielles dans l'immunité : les anticorps, ou encore la cascade d'enzymes du système du complément.

1. Les acides aminés

Il existe, dans le vivant, plus de 140 acides aminés différents [27]. Seulement 20 (+2) acides aminés sont dit « protéinogènes », ce sont l'association et l'enchaînement de ces acides aminés qui peuvent conduire à établir une protéine.

Les acides aminés protéinogènes ont une structure de base commune du type $H_2N-HCR-COOH$, illustrée dans la Figure 13.

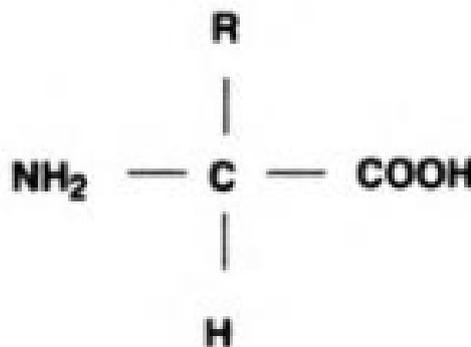


Figure 13. Structure de base d'un acide aminé [28]

Seule la chaîne latérale « R » permet de différencier les 22 types d'acides aminés et de les discriminer en 5 groupes :

- Non-polaire, aliphatique
- Polaire, non chargé
- Aromatique
- Chargé positivement
- Chargé négativement

Ces chaînes latérales sont représentées dans la Figure 14 pour les 20 acides aminés essentiels de l'être humain.

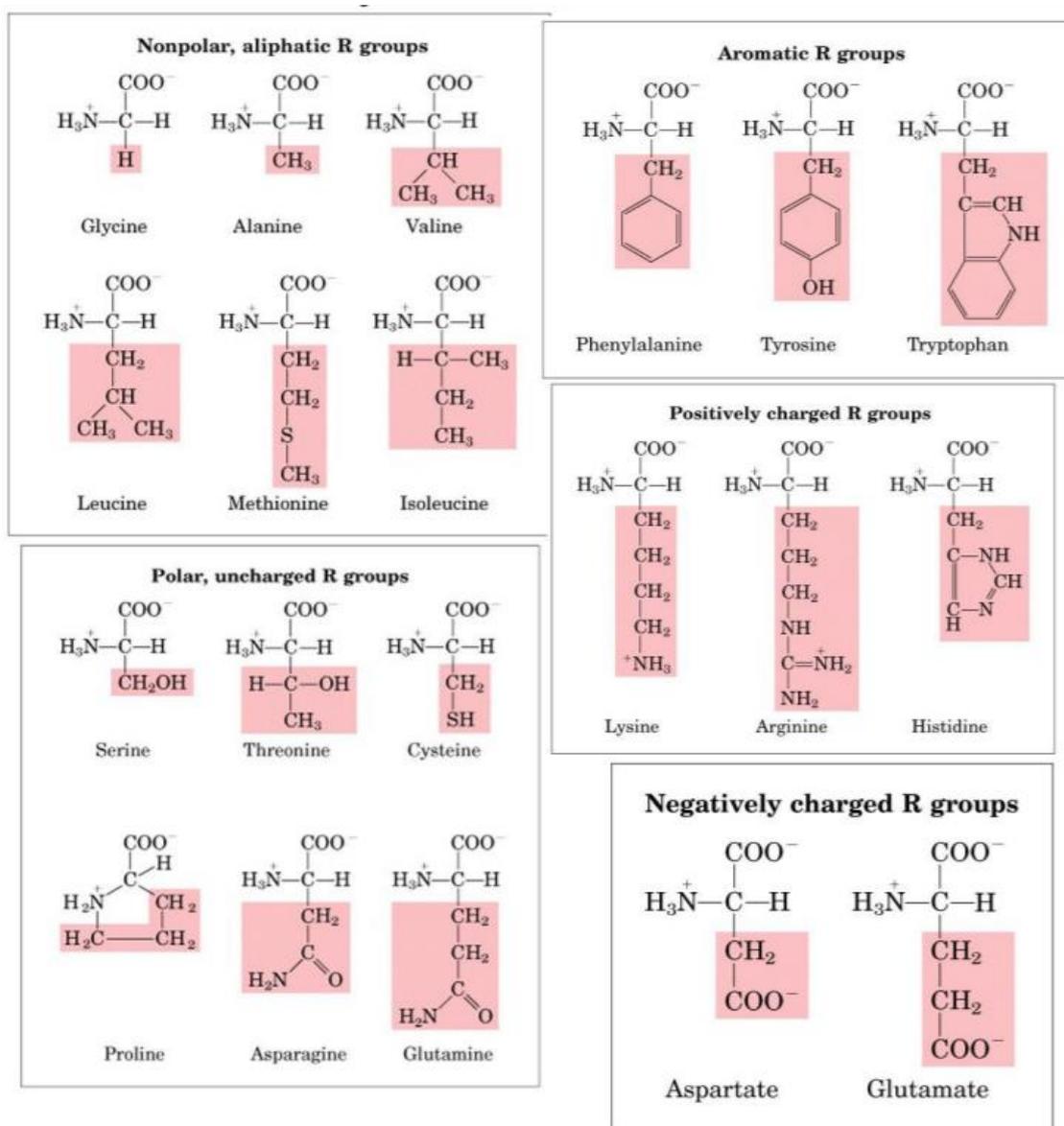


Figure 14. Représentation des 20 acides aminés. [29]

Il existe 2 autres acides aminés protéinogènes : La Sélénocystéine et la Pyrrolysine.

La sélénocystéine est un acide aminé dérivé de la cystéine qui comporte un atome de sélénium à la place de l'atome de soufre. C'est un acide aminé rare qui entre dans la composition de certaines enzymes.

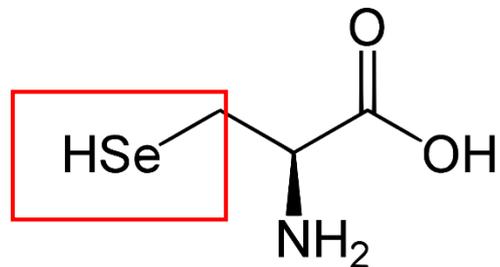


Figure 15. Représentation de la Sélénocystéine.

La pyrrolysine est un acide aminé uniquement présent dans des archées méthanogènes dans des enzymes spécifiques à leur métabolisme représenté dans la Figure 16.

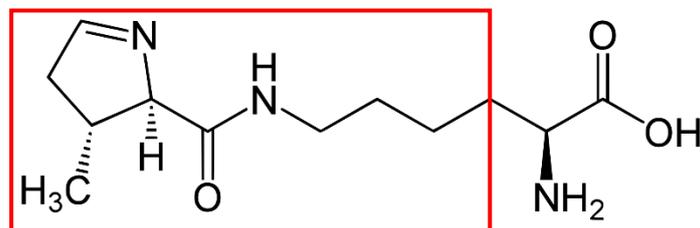
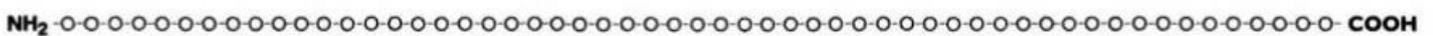


Figure 16. Représentation de la Pyrrolysine

2. Constitution d'une protéine

Une protéine est définie comme une macromolécule constituée par l'association d'acides aminés unis entre eux par des liaisons peptidiques ^[30]. L'enchaînement d'acides aminés linéaires constitue la structure primaire d'une protéine comme représenté dans la Figure 17.



○ = acide aminé

Figure 17. Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine.

Cette structure primaire linéaire est obtenue à partir du génome par des processus de transcription et traduction à l'intérieur d'une cellule tel que décrit ci-après :

La première étape est la transcription des gènes de l'ADN en ARN messager (=ARNm) dans le noyau. La molécule d'ADN (double brin) sera ouverte, puis le brin antisens sera transcrit. La molécule d'ARNm est synthétisée par l'ARN polymérase selon le code complémentaire : c'est-à-dire que si l'ADN présente une base Adénine (A), l'ARN polymérase va intégrer une base Uracile (U) à l'ARNm, il en est de même pour les 4 bases azotées selon le tableau de correspondance suivant :

ADN – Bases azotées	ARNm – Bases azotées
Adénine (A)	Uracile (U)
Guanine (G)	Cytosine (C)
Cytosine (C)	Guanine (G)
Thymine (T)	Adénine (A)

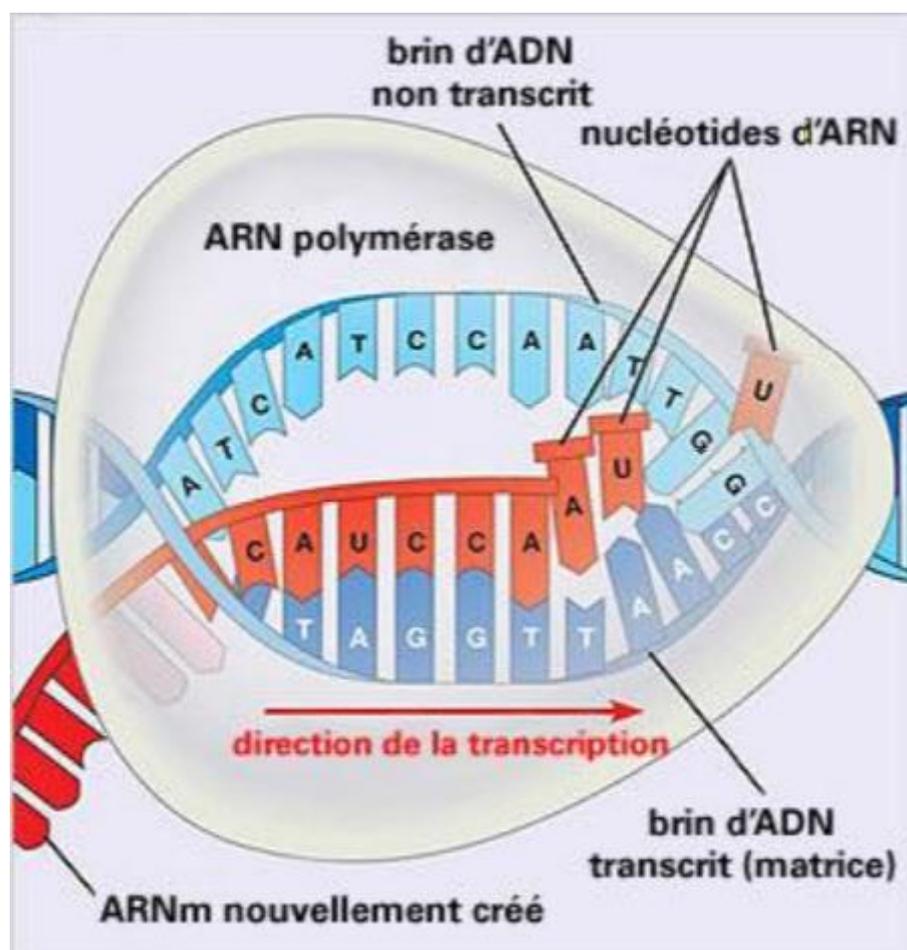


Figure 18. Transcription de l'ADN en ARN messager dans le noyau [31]

Cet ARNm va migrer du noyau vers le cytoplasme de la cellule via des pores nucléaires où aura lieu la traduction [32].

La traduction est l'étape de la synthèse de la protéine. Un ribosome va se fixer sur l'ARNm et avancer de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Le ribosome va lire une succession de 3 paires de bases (ex : AUG) appelé codon qui va représenter un acide aminé spécifique selon le tableau suivant :

LE CODE GENETIQUE

		ARN messenger Codon : deuxième base azotée				
		U	C	A	G	
ARN messenger Codon : première base azotée	U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
		Phe	Ser	Tyr	Cys	C
		Leu	Ser	STOP	STOP	A
		Leu	Ser	STOP	Trp	G
	C	Leu	Pro	His	Arg	U
		Leu	Pro	His	Arg	C
		Leu	Pro	Gln	Arg	A
		Leu	Pro	Gln	Arg	G
	A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
		Ile	Thr	Asn	Ser	C
		Ile	Thr	Lys	Arg	A
		Met	Thr	Lys	Arg	G
	G	Val	Ala	Asp	Gly	U
		Val	Ala	Asp	Gly	C
		Val	Ala	Glu	Gly	A
		Val	Ala	Glu	Gly	G
		ARN messenger Codon : troisième base azotée				

Tableau 4. Tableau présentant la traduction d'un ARNm en acide aminés

Ainsi, si la séquence d'ADN est **GGTCACTCTATT**, l'ARNm va présenter la séquence suivante : **CCAGUGAGAUAA**, l'enchaînement linéaire d'acides aminés sera donc : **Proline – Methionine – Arginine**. Il existe 3 codons « stop », ces codons permettent de donner l'information au ribosome d'arrêter la traduction de l'ARNm en protéine, la séquence est terminée après ces codons.

A ce stade, la protéine est sous une forme linéaire telle que représentée dans la figure 17, on l'appelle structure primaire.

La dernière étape est la modification post-traductionnelle comme la glycosylation (liaison covalente d'ose) qui a lieu dans le réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi.

Il existe des milliers de protéines qui doivent reconnaître spécifiquement un ou plusieurs ligands. Devant une telle diversité d'interactions, il est nécessaire d'avoir une variabilité et des irrégularités de structure des protéines afin d'avoir cette interaction spécifique protéine-ligand. Pour se faire, une protéine va devoir adopter cette conformation spécifique dans l'espace : une conformation tridimensionnelle.

3. Structure tridimensionnelle des protéines : structure secondaire et tertiaire

La structure secondaire d'une protéine est une modification spatiale en 3 dimensions de la linéarité de la structure primaire située localement sur la chaîne d'acides aminés. Cette configuration dans l'espace est stabilisée par des liaisons hydrogène entre les groupements C=O et N-H des liaisons peptidiques^[33] (Figure 19).

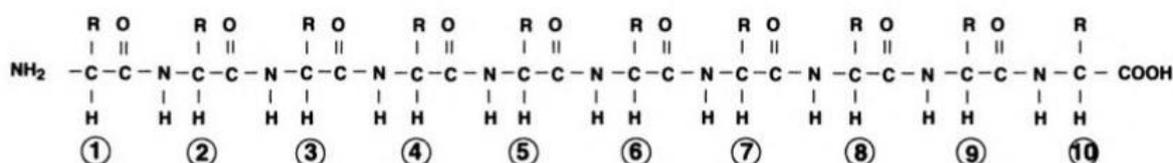


Figure 19. Exemple d'un polypeptide de 10 acides aminés.

Il existe une grande diversité des structures secondaires, mais ces structures sont essentiellement de 3 types :

- Les hélices
- Les feuillets bêta
- Les coudes

Une hélice protéique est une structure obtenue par la rotation de la chaîne polypeptidique. Cette rotation résulte de la succession d'angles. Par exemple, le cas de l'hélice alpha présente un angle phi de -57° et angle psi de -47° , elle s'élève de 0,15 nm par résidu et de 0,54 nm à chaque tour et compte 3,6 résidus par tour^{[34][35]}.

Elle est stabilisée par des ponts hydrogènes entre l'hydrogène du groupement aminé -NH et l'oxygène d'un groupement carboxylique -C=O situé quatre résidus plus loin [34] [35].

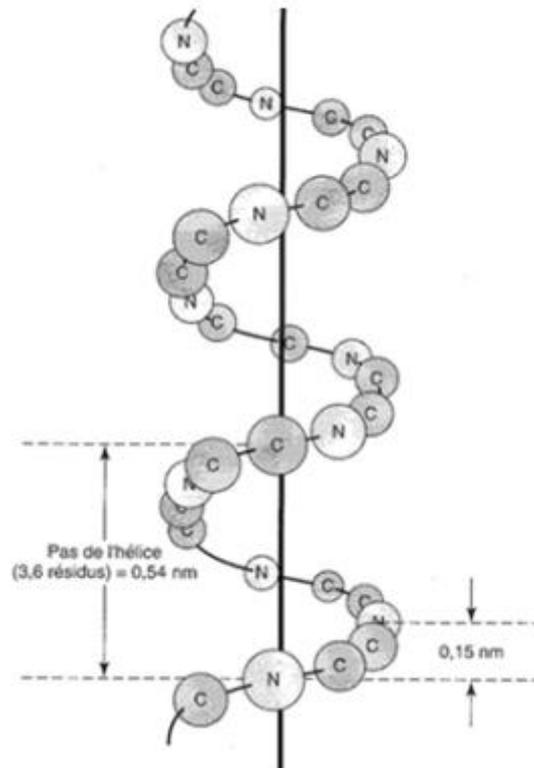


Figure 20. Représentation d'une hélice protéique obtenue par la rotation de la chaîne peptidique

Nous pouvons prendre pour exemple la myoglobine qui présente plusieurs hélices alpha dans sa structure. La myoglobine est une protéine qui transporte l'oxygène dans le cytoplasme des cellules. Cette protéine comporte sept hélices alpha représentées par des spirales dans la figure 20.

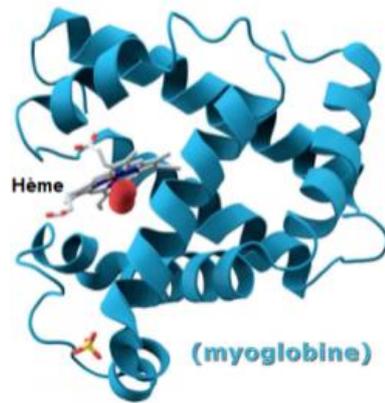


Figure 21. Représentation dans l'espace de la myoglobine [34]

Les feuillets beta sont les structures protéiques les plus répandues [36]. Ces structures se forment quand de longues chaînes polypeptidiques se replient et se font face l'une l'autre en formant des ponts hydrogènes avec la chaîne voisine. Les feuillets beta peuvent être parallèles si les chaînes vont dans le même sens, ou antiparallèles.

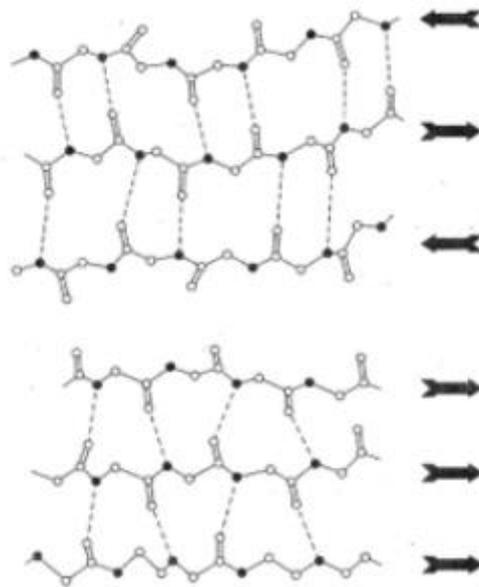


Figure 22. Représentation d'un feuillet beta parallèles et antiparallèles

Ces feuillets sont représentés dans les modèles structuraux par une flèche plate indiquant sa direction, la pointe est dirigée vers son extrémité COOH.

Le coude ou épingle à cheveux beta est le motif secondaire le plus simple, que l'on retrouve souvent à la jonction de deux segments de la chaîne formant un feuillet beta antiparallèle. Il implique généralement 4 résidus d'acides aminés.

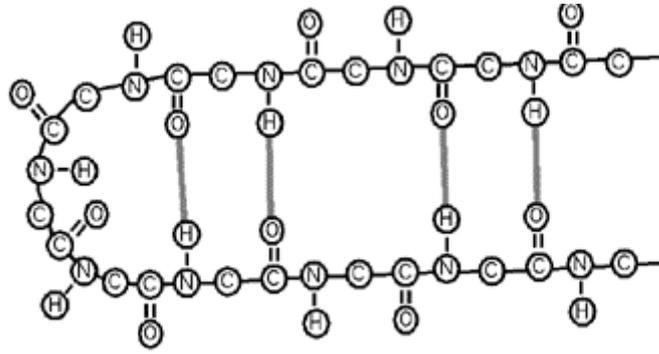


Figure 23. Représentation d'une structure protéique secondaire de type coude

A ce stade, l'enchaînement d'acides aminés qui forme la protéine a une structure linéaire présentant localement une structure tridimensionnelle.

La structure tertiaire d'une protéine est un repliement dans l'espace de la totalité de la chaîne polypeptidique. C'est donc l'organisation dans l'espace des structures secondaires. Ce repliement va permettre à la protéine d'avoir l'intégralité de ses propriétés comme ses sites de fixation, de reconnaissance, le site actif d'une enzyme...

Cette structure va être maintenue par différentes forces :

- Interactions électrostatiques
 - o Charge-Charge (NH_3^+ et COO^-)
 - o Charge – dipôle
 - o Liaisons hydrogènes
- Interactions hydrophobes (cycle aromatique des groupements phénylalanine et tyrosine par exemple)
- Forces de Van der Waals
- Ponts disulfures : c'est une liaison covalente entre deux cystéines formées dans le réticulum endoplasmique lors de la formation de la protéine dans la cellule.

Enfin, certaines protéines vont adopter une structure quaternaire lorsque plusieurs sous-unités indépendantes ayant une structure tertiaire vont s'associer pour former la protéine finale ^[35]. L'hémoglobine est un exemple d'une protéine ayant une structure quaternaire formé par 4 sous-unités (Figure 24).

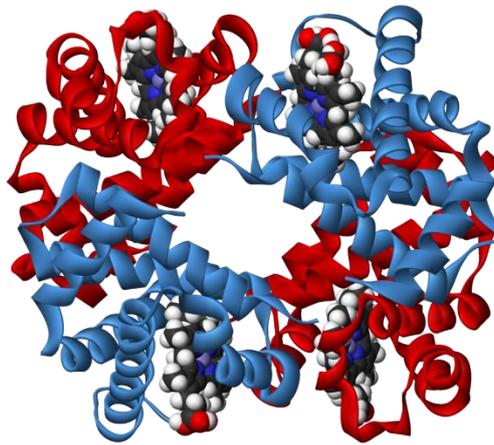


Figure 24. Représentation de l'hémoglobine, une protéine ayant une structure quaternaire. En rouge et en bleu, quatre sous-unités protéiques ayant une structure tertiaire identique deux à deux ^[37].

4. Définitions des immunoglobulines (= Ig) ^[38] ^[39]

Les immunoglobulines (ou anticorps) sont une famille de protéines plasmatiques contribuant majoritairement à la réponse immunitaire adaptative. Ces protéines ont deux fonctions, la première est leur capacité à fixer très spécifiquement des molécules d'un pathogène (aussi appelé antigène) et induire une réponse immunitaire. La deuxième est le recrutement de cellules ou molécules capables de détruire le pathogène.

Une immunoglobuline comporte 2 chaînes : une chaîne lourde et une chaîne légère. Sur ces chaînes un fragment est dit constant, l'autre fragment est appelé variable. La partie variable d'une immunoglobuline est celle responsable de la reconnaissance et de la fixation sur l'antigène : ainsi pour pouvoir reconnaître spécifiquement chaque antigène, la composition et la conformation des acides aminés de la partie variable va changer en fonction de l'antigène à reconnaître. Au sein de la partie variable, il existe des régions hypervariables formant le site de fixation de liaison avec l'antigène.

La partie constante est la partie effectrice de l'immunoglobuline et ne varie pas autant que la partie variable, cette partie va permettre de se fixer au complément ou recruter des macrophages afin d'éliminer le pathogène. Il existe 5 formes de cette partie constante qui caractérisent l'isotype de l'immunoglobuline :

- Immunoglobuline M (IgM) : elles ne représentent qu'environ 10% des Ig totales. C'est une molécule à structure pentamérique. Elles ont principalement un rôle lors de la réponse immunitaire primaire.
- Immunoglobuline G (IgG) : elles sont majoritaires dans le sérum normal, représente 75% des immunoglobulines totales. Elles ont principalement un rôle lors de la réponse immunitaire secondaire.
- Immunoglobuline D (IgD) : elles ne représentent que moins de 1% des Ig totales, le plus souvent attachées à la surface des lymphocytes B, leur rôle est principalement lié à la maturation des lymphocytes, c'est-à-dire dans l'induction de la différenciation du lymphocyte B par l'antigène.
- Immunoglobuline E (IgE) : elles sont retrouvées sous forme de traces dans le sérum, elles jouent principalement un rôle dans les réactions d'hypersensibilité immédiate (réaction allergique), mais aussi interviennent dans la lutte contre les parasites.
- Immunoglobuline A (IgA) : elles représentent environ 15% des Ig totales et permettent une protection des muqueuses, que ce soit respiratoires ou digestives par exemple.

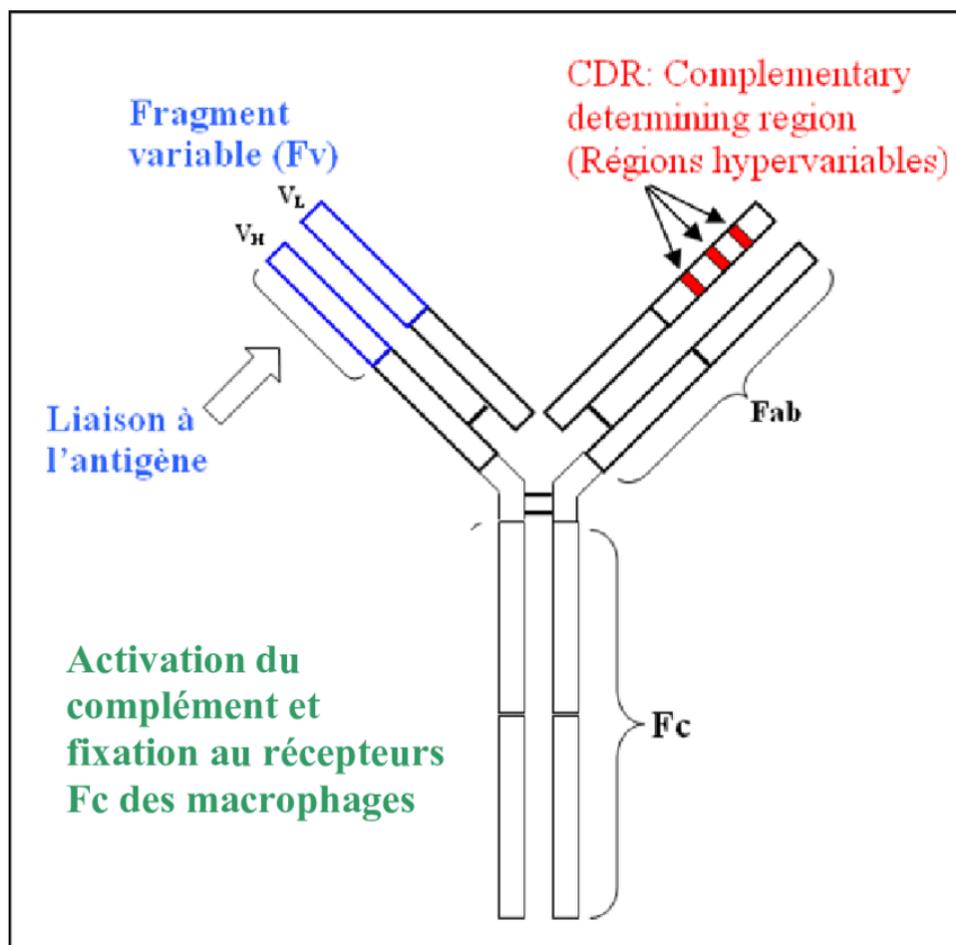


Figure 25. Schématisation d'un anticorps. ^[40]

5. Conclusion

Toutes les protéines humaines proviennent de notre génome, de la molécule d'ADN. Pour être fonctionnelle, une protéine doit avant tout être synthétisée de manière linéaire par le ribosome afin d'obtenir la structure primaire de la protéine.

Cette protéine va ensuite se replier localement pour former des structures secondaires, puis se replier sur elle-même pour former la structure tertiaire. Ces différentes étapes sont représentées en Figure 26. Enfin, plusieurs sous-unités ayant une structure tertiaire vont pouvoir s'associer pour former une protéine ayant une structure quaternaire.

Les protéines sont des constituants indispensables au fonctionnement du corps humain. Elles sont les muscles, les os, les ongles, les cheveux... mais aussi les enzymes, les anticorps. Elles permettent aussi d'être un apport d'énergie pour le corps, des messagers cellulaires (insuline, récepteurs membranaires), de réguler notre ADN (histone), de transporter d'autres éléments indispensables (Hémoglobine pour l'oxygène par exemple).

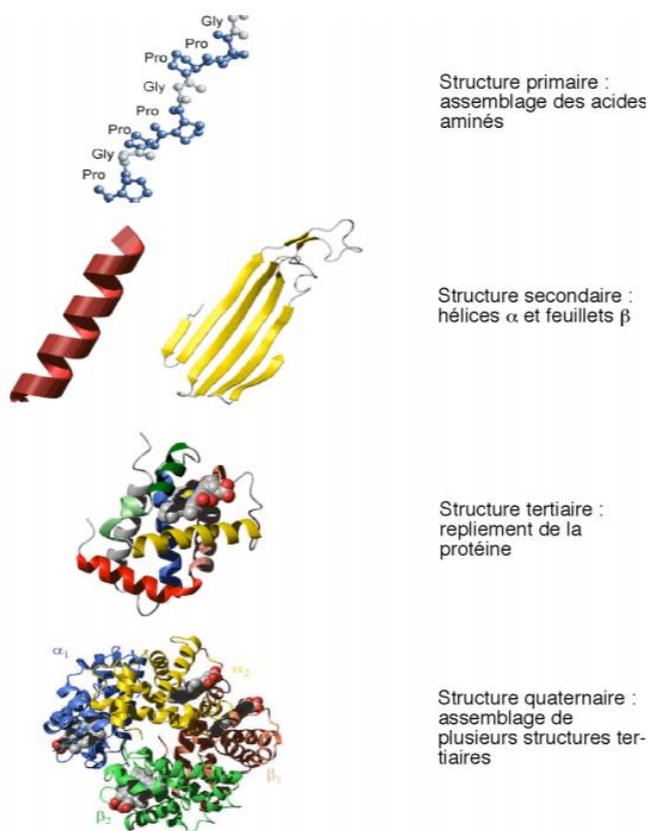


Figure 26. Synthèse de la conformation d'une protéine. De la structure primaire à la structure quaternaire ^[41].

B. Interactions entre le conditionnement primaire en verre et les protéines

Les protéines à usage thérapeutique sont utilisées pour traiter de nombreuses maladies comme le cancer, le diabète, l'hémophilie, la maladie de Crohn et la polyarthrite rhumatoïde [42]. Pour un usage médicamenteux, une protéine (insuline, albumine, facteurs de coagulation...) doit être dans sa conformation tridimensionnelle et solubilisée dans une solution aqueuse permettant l'administration du médicament.

La dénaturation des protéines intervient lorsque celle-ci perd sa conformation tridimensionnelle. Il existe 3 grandes méthodes de dénaturation des protéines : chimique, thermique et mécanique.

Pour assurer un médicament de qualité, il est très important de maintenir la pureté chimique et la conformation des protéines lors du conditionnement, stockage et transport jusqu'à l'injection au patient. Les protéines peuvent être dénaturées par plusieurs phénomènes, la résultante de ces dénaturations est principalement l'agrégation des protéines en solution. [43]

L'agrégation des protéines peut varier de la simple association physique avec une autre protéine sans aucun changement de sa structure primaire (agrégation physique) ou par la formation de nouvelles liaisons covalentes (agrégation chimique). La formation de telles liaisons peut soit directement lier les protéines entre-elles ou indirectement altérer la tendance naturelle d'une protéine à s'agréger. [44] Les deux mécanismes peuvent intervenir simultanément sur une protéine, et engendrer la formation d'agrégat soluble ou insoluble.

1. Dénaturation des protéines

1.1 Dénaturation chimique

1.1.1 Impact du pH sur la dénaturation des protéines et leur solubilité

Le pH est une mesure de l'état acido-basique d'une solution contenant des ions H^+ , définie par $pH = -\log[H^+]$, où $[H^+]$ est la concentration de la solution en ion H^+ [45]. Les acides aminés sont sensibles à cette notion de pH puisqu'en effet chaque protéine comporte 2 groupements ionisables dans sa structure de base :

- un groupement carboxylique : $COOH \leftrightarrow COO^-$
- un groupement amine : $NH_2 \leftrightarrow NH_3^+$

L'état d'ionisation d'un groupement acide est défini par la constante d'acidité pKa. Lorsque le pH d'une solution est en-dessous de cette valeur de pKa, le groupement acide contenu dans cette solution sera non chargé. Inversement, lorsque le pH de la solution est supérieur au pKa, le groupement sera sous forme ionisée et donc chargé. Pour le groupement carboxylique des acides aminés le pKa est compris entre [1,82-2,38].

L'état d'ionisation d'un groupement basique est défini par la constante de basicité pKb. Lorsque le pH d'une solution est en-dessous de cette valeur de pKb, le groupement basique contenu dans cette solution sera chargé. Inversement, lorsque le pH de la solution est supérieur au pKb, le groupement sera sous forme non-ionisée et donc non chargé. Le groupement amine des acides aminés a un pKb compris entre [8,08-10,96].

De plus, certains acides aminés présentent une chaîne latérale ionisable ayant un pK spécifique ^[46] :

- Chaîne latérale de la Tyrosine : pKb = 10,07
- Chaîne latérale de la Cystéine : pKb = 10,28
- Chaîne latérale de l'acide aspartique : pKa = 3,65
- Chaîne latérale de l'acide glutamique : pKa = 4,25
- Chaîne latérale de l'Histidine : pKa = 6
- Chaîne latérale de la Lysine : pKb = 10,53
- Chaîne latérale de l'Arginine : pKb = 10,07

Une protéine étant un enchaînement complexe d'acides aminés, nous pouvons déterminer que la zone de solubilisation maximum d'une protéine se situe à un pH au-delà du pKa le plus élevé et en deçà du pKb le plus faible : entre [6-8,08].

Dans leur état biologique (pH=7,2), ces groupes chimiques sont dans un état d'ionisation leur permettant une solubilité en milieu aqueux. Les chaînes latérales chargées des acides aminés étant orientées vers l'extérieur lorsque la protéine est dans une conformation tridimensionnelle, cela permet de former des ponts hydrogènes avec l'eau et ainsi de solubiliser la protéine. ^[47]

Lors d'une attaque chimique du verre par de l'eau, basée sur la réaction décrite dans la partie I, section 2.3 :



la concentration en $[\text{OH}^-]$ en solution va augmenter et la concentration en $[\text{H}^+]$ diminuer. Lors d'une attaque du verre, le H^+ va s'intégrer dans la matrice du verre à la place du Na^+ . En solution aqueuse, si l'attaque du verre est trop importante, la solution aqueuse verra son pH augmenter. Cette augmentation de pH peut induire un changement de l'état de charge (positive ou négative) des acides aminés et ainsi entraîner un changement de la charge totale de la protéine et donc affecter les interactions électrostatiques. La résultante est une perte de solubilité de la protéine et ainsi une précipitation de celle-ci.

Le pH a une très forte influence dans le taux d'agrégation des protéines. Les protéines sont très souvent stables dans une petite plage de pH, et peuvent s'agréger très rapidement en solution en dehors de cette plage. Il existe plusieurs études de l'impact du pH sur la stabilité des protéines en solution, en voici quelques exemples ^[42] :

- Facteur VIII recombinant ^[48]
- Urokinase de bas poids moléculaire ^[49]
- Relaxine ^[50]
- Désoxyhémoglobine ^[51]
- Interleukine-1 β ^[52]
- Ribonucléase A ^[53]
- Insuline ^[54]

La présence d'un agrégat de protéines dans un médicament peut engendrer, si ce médicament est injecté, une efficacité réduite, une réaction immunitaire non souhaitée ou encore un choc anaphylactique. ^[55]

1.1.2 Impact de la force ionique sur la solubilité des protéines

Lorsqu'un composé se retrouve dissout en solution, celui-ci sera dissocié sous forme d'ion. L'exemple le plus couramment connu est la dissociation du chlorure de sodium (NaCl). Une fois en solution le composé NaCl sera sous forme ionisé en $\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$.

La force ionique a été définie par Lewis et Randall en 1921 pour refléter les effets des charges sur les interactions entre les électrolytes. Cette force ionique est définie par la formule suivante ^[56] :

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2 \quad (6)$$

Où : C_i représente la concentration molaire de l'ion et Z_i sa charge

L'impact de la force ionique sur la solubilité peut être synthétisé par l'équation suivante ^[57] :

$$\log S = \beta - K'_s \mu \quad (7)$$

La solubilité est donc inversement proportionnelle à la force ionique d'une solution. Plus la force ionique μ sera importante, plus la solubilité S sera faible. Cette équation est principalement vraie dans le cas de forte concentration en sel en solution, ce qui peut être le cas lorsque des sels sont volontairement ajoutés comme excipient dans une formulation galénique.

Cependant, les électrolytes ont un effet plus complexe sur la stabilité physique des protéines en solution pouvant modifier la conformation et l'équilibre de la structure des protéines et ainsi augmenter le taux d'agrégation. Par exemple, le taux d'agrégation du facteur VIII recombinant diminue en présence de NaCl en solution. Inversement, la présence de NaCl augmente le taux d'agrégation du GCSF (granulocyte colony stimulating factor). D'autres sels démontrent le même phénomène favorisant ou diminuant l'agrégation des protéines en solution. Ainsi, la concentration en sel d'une solution va modifier la stabilité d'une protéine en solution.

Les sels vont interagir sur la liaison peptique qui a une charge partielle positive sur le groupement amine, et une charge partielle négative sur le groupement carboxylique. Les ions en solution peuvent se fixer à ces charges et potentiellement déstabiliser l'état normal d'une protéine. Parce que le pH détermine l'état d'ionisation des chaînes latérales, la charge totale, et la distribution des charges au sein d'une protéine, cet effet des sels et donc de l'impact de la force ionique est très dépendant du pH. ^[58]

Des validations de la compatibilité entre le médicament et le conditionnement primaire en verre doivent être menées afin de vérifier que les minéraux relargués par le verre

ne viennent pas modifier le fragile équilibre qui permet à une protéine de rester soluble dans une solution non naturelle.

1.1.3 Agrégation des protéines par des oxydes métalliques

Des oxydes métalliques peuvent être ajoutés à la composition du verre. Ces oxydes se comportent, soit comme formateurs du réseau, soit comme des modificateurs. Ils peuvent aussi être utilisés pour créer une coloration du verre. Les oxydes métalliques les plus fréquemment retrouvés dans un verre à usage pharmaceutique sont l'oxyde d'aluminium (Al_2O_3), l'oxyde de fer (Fe_2O_3), l'oxyde de zinc (ZnO) et l'oxyde de titane (TiO_2). [59]

Il existe des exemples de protéines thérapeutiques en développement qui ont été conditionnées dans des seringues préremplies et en flacons. Durant l'étape de purification de la protéine, des métalloprotéinases (enzyme de la classe des peptidases qui participe à la catalyse de la coupure de la liaison peptique) ont été copurifiées avec cette protéine. Ces métalloprotéinases ont été activées par les oxydes métalliques relargués par le verre et ainsi provoqué la dénaturation et l'agrégation des protéines. [60]

Les agences de santé recommandent donc une caractérisation et la création d'une stratégie de contrôle pour prévenir l'agrégation de protéines pendant le développement de produit biopharmaceutique.

1.2 Dénaturation par action mécanique

1.2.1 Augmentation particulière par le phénomène de cavitation

L'industrie pharmaceutique a réalisé de nombreuses améliorations pour réduire ce risque de dégradation lors du processus de production, de stockage et de transport des médicaments. Cependant, il y a très peu de contrôles qualités après la libération du médicament. Par exemple, le transport à l'hôpital, ou des mauvaises manipulations involontaires peuvent causer des dégradations du médicament, difficiles, voire impossible à détecter. [61]

Une des causes les moins connues et décrites pouvant engendrer des dommages à une protéine est le choc mécanique des conditionnements primaires. Lorsqu'un flacon ou une seringue tombe et heurte une surface solide, la solution à l'intérieur sera impactée par ce choc mécanique. Le résultat est l'apparition d'une onde de choc pouvant provoquer un phénomène de cavitation. [62]

La cavitation est définie comme la formation, l'agrandissement et l'effondrement de cavités gazeuses dans un liquide soumis à des ondes [63]. La représentation de ce phénomène est visible sur la figure 27. Lorsque ces cavités s'effondrent violemment, des points chauds sont créés. Ces points chaud ont une durée de vie extrêmement courte et sont très localisés. A ces endroits, la température peut augmenter de manière extrême (plusieurs centaines de degré Celsius) et une pression de plusieurs atmosphères. [63] De plus, lors de l'effondrement de la cavité gazeuse, de l'hydrogène et des radicaux libres OH^\cdot peuvent être formés. Le résultat de ces conditions de température et de pression extrêmement localisées en plus de la formation de radicaux libres contribue fortement à la formation d'agrégats de protéines et donc de particules. [64]

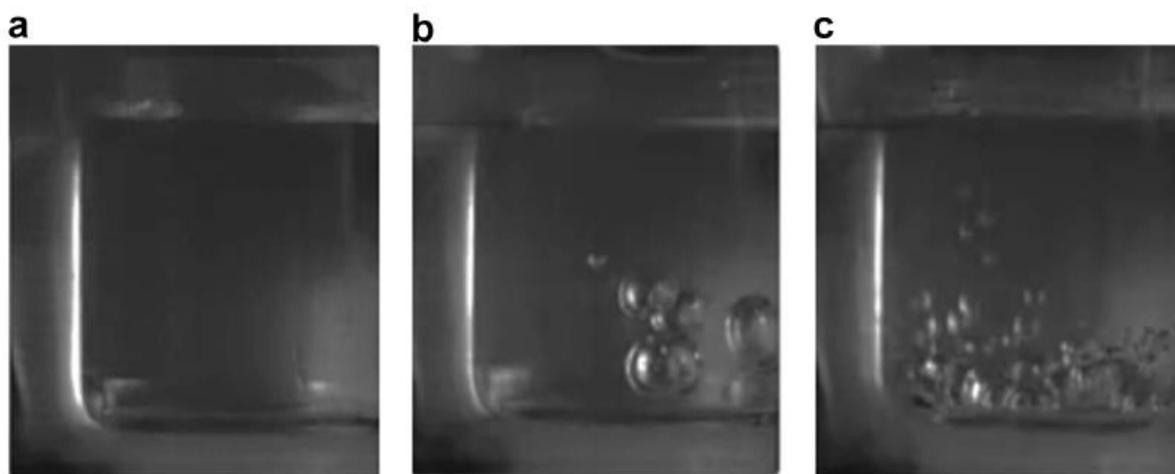


Figure 27. Le phénomène de cavitation est initié à la surface interne des flacons. Chaque flacon contient 2ml d'une solution d'anticorps monoclonaux à 1mg/ml qui est tombé d'une hauteur d'un mètre. Les flacons sont en verre. Le flacon (a) présente une seule bulle dans le coin inférieur gauche et une charge particulaire d'environ 1100 particules/ml, le flacon (b) environ 1200 particules/ml et de multiples bulles, de même pour le flacon (c) qui comporte 3900 particules/ml. [65]

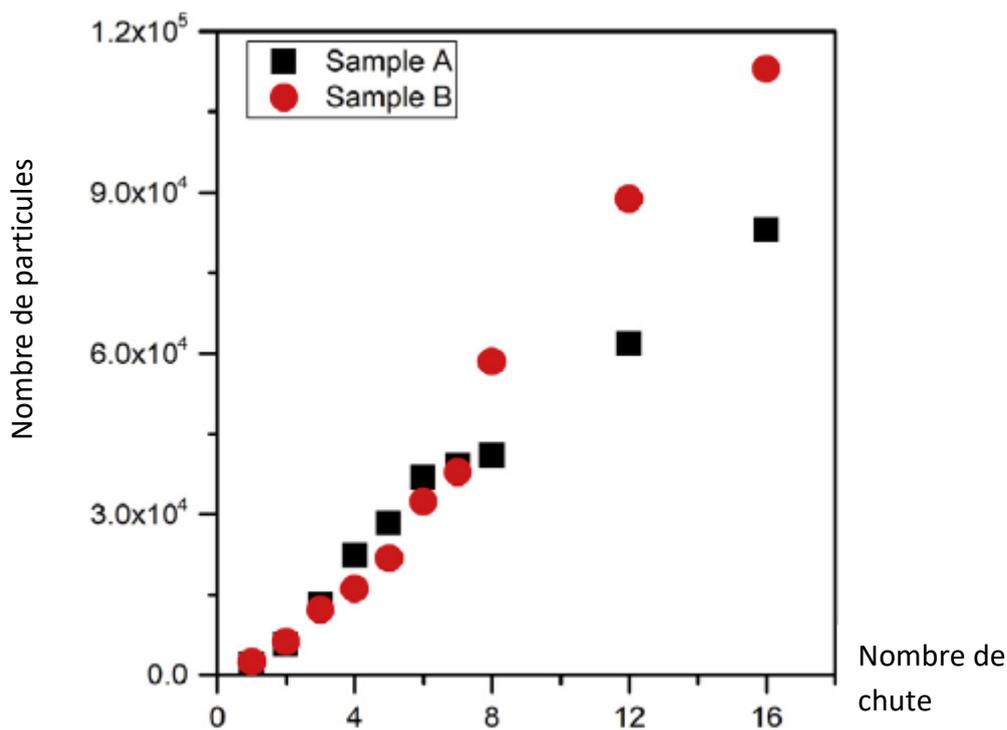


Figure 28. Génération de particule en fonction de la répétition d'une chute d'un flacon en verre de 3ml rempli avec 2ml de solution d'anticorps monoclonaux à 1mg/ml. Le nombre total de particules dans les flacons est rapporté relativement à la mesure dans un flacon de contrôle qui n'a pas subi de chute.

Il est intéressant de constater que l'augmentation de particules est directement en lien avec le nombre de chocs mécaniques que subit un flacon rempli d'un médicament biologique. Après seulement 4 applications d'un choc vertical d'une hauteur de 0,5 m, il y a une augmentation de particules de l'ordre de 2×10^4 . Cette augmentation semble linéaire jusqu'à 16 chutes répétées pour une augmentation du nombre de particules de $1,2 \times 10^5$. Dans cette étude, il n'y a pas de mention relative à la taille des particules observées.

L'USP <788> « *Particles matter in Injection* » et les chapitres de la Pharmacopée Européenne 2.9.19 « Contamination particulaire : particules non visibles » et 5.17.2 « Recommandations relatives à l'essai de contamination particulaire : particules visibles » définissent une limite en nombre de particules en fonction de la contenance du flacon. Par exemple, pour un flacon de 3 ml les limites sont :

- 6000 particules $\geq 10 \mu\text{m}$
- 600 particules $\geq 25 \mu\text{m}$

La question qui se pose est de savoir si ce nombre de chutes répétées d'un flacon rempli d'un composé biologique pourrait engendrer un nombre de particules en dehors des spécifications des pharmacopées ?

Cependant, aucune étude faisant le lien entre l'augmentation de particules liées à des chutes répétées de flacons et les limites des pharmacopées n'est disponible. En revanche, certaines études se sont intéressées à l'augmentation particulière après une agitation.

L'augmentation particulière, provient des protéines qui vont s'agréger après l'application d'un stress mécanique. La résultante est la perte de protéine solubilisée.

[69]

Les flacons de la figure 30 sont remplis d'une solution d'immunoglobulines pour injection intraveineuse dans 3 types de flacons :

- Flacons en verre non traité
- Flacons en verre avec un revêtement interne en Polyéthylèneglycol (PEG), connu pour limiter les interactions entre la surface du verre et le médicament.
- Flacons en verre avec un revêtement interne en Octadécyltrichlorosilane de formule $C_{18}H_{37}Cl_3Si$ (OTS,). Cette molécule, une fois fixée sur les groupes Si-OH en surface du verre va exposer une longue chaîne carbonée, ce qui rend la surface interne hydrophobe et réduit les interactions entre la solution et la surface du verre.

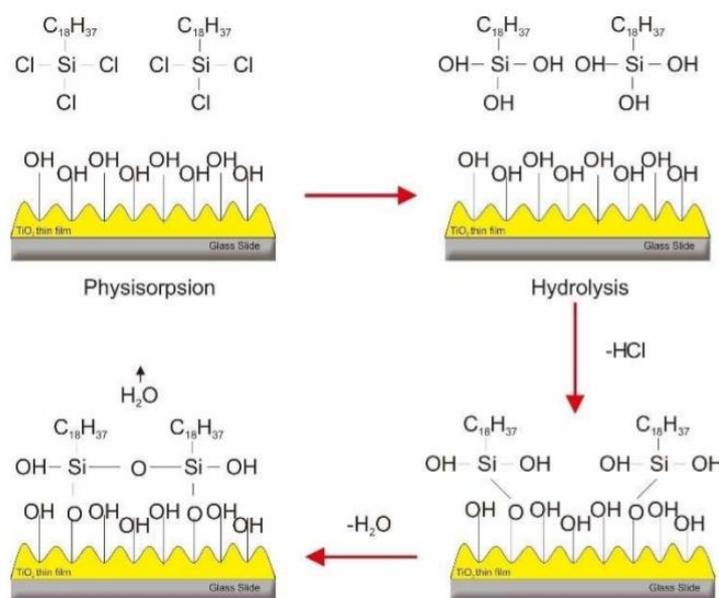


Figure 29. Illustration schématique de la greffe de groupement OTS à la surface du verre [66]

Ces flacons sont déposés sur une table vibrante pendant une minute, quatre minutes et sept minutes. L'objectif de ces vibrations est de simuler le transport (ex : camion) mais aussi la manutention des cartons. Les données de cette étude montrent une diminution de la quantité soluble restante en immunoglobuline en fonction du temps, la quantité insoluble représente les protéines dénaturées et donc sous forme d'agrégat non soluble. Après une minute de vibration, la quantité restante est de l'ordre de [98-99%] en fonction des flacons. Cependant après 7 minutes, la quantité en immunoglobuline restante est toujours de l'ordre de 98% pour les flacons avec un revêtement en PEG. Pour des flacons non traités, et traité avec de l'OTS, la quantité restante a diminué jusqu'à 95%. [67]

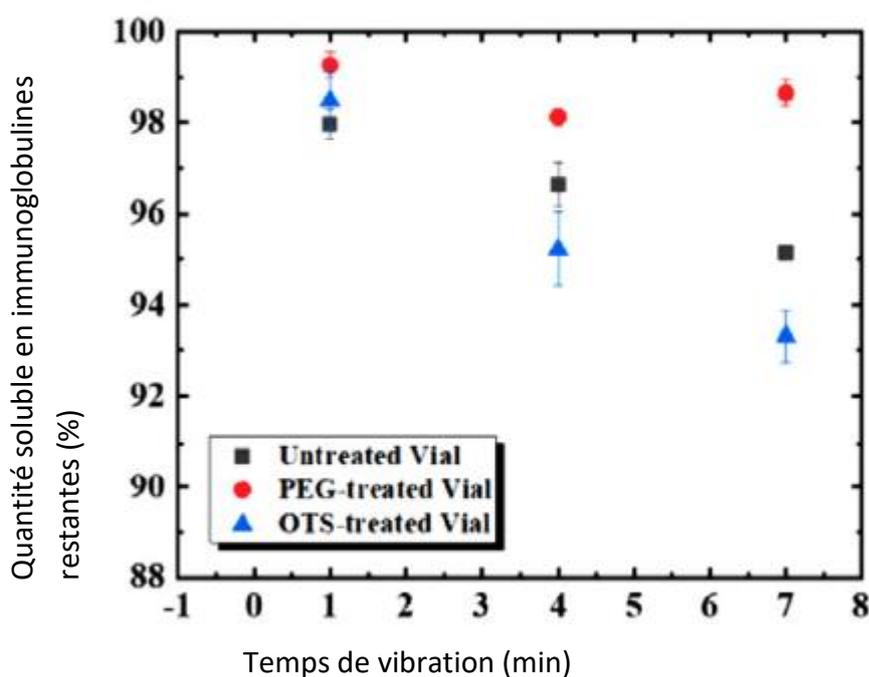


Figure 30. Agrégation de protéines d'une solution d'immunoglobulines soumise à un stress mécanique via des vibrations mesurée par la quantité soluble restante par SE-HPLC. 3 flacons différents sont étudiés : Flacon non traité, flacon traité avec du PEG et flacon traité avec de l'OTS. La barre d'erreur représente l'écart-type (n=3)

Ces études montrent la nécessité des validations de transport des médicaments, et notamment de surveiller la génération de particules et l'agrégation de protéines. De plus, ces phénomènes peuvent être exacerbés lors du transport notamment à cause de la température dans les conteneurs lors du transport maritime, comme le démontre la loi d'Arrhenius qui décrit la variation de la vitesse d'une réaction chimique en fonction de la température.

Il est aussi très important d'utiliser le bon format de flacon en fonction du volume de remplissage nominal du médicament. En effet, le lien entre la hauteur de remplissage d'un flacon et le diamètre de la base joue un rôle important dans l'apparition du phénomène de cavitation. En comparant un flacon ayant un large diamètre (une contenance de 5ml par exemple) à un flacon plus petit (d'une contenance de 2ml) remplis avec le même volume de solution, le diamètre le plus grand a une probabilité plus faible d'apparition du phénomène de cavitation. De plus, les flacons en plastique semblent favoriser ce phénomène comparé aux flacons en verre ^[68]. Lors du développement d'un médicament biologique, ce phénomène devrait être plus généralement pris en compte dans le choix du conditionnement primaire.

1.2.2 Augmentation particulière par agitation

L'agitation est un stress mécanique très courant pour un médicament à visée thérapeutique, principalement lors du transport de celui-ci. En reproduisant des conditions de transport par un agitateur de laboratoire sur 3 protéines différentes : albumine humaine, lysozyme provenant du blanc d'œuf, anticorps monoclonaux type IgG2, une augmentation particulière peut être observée. ^[69]

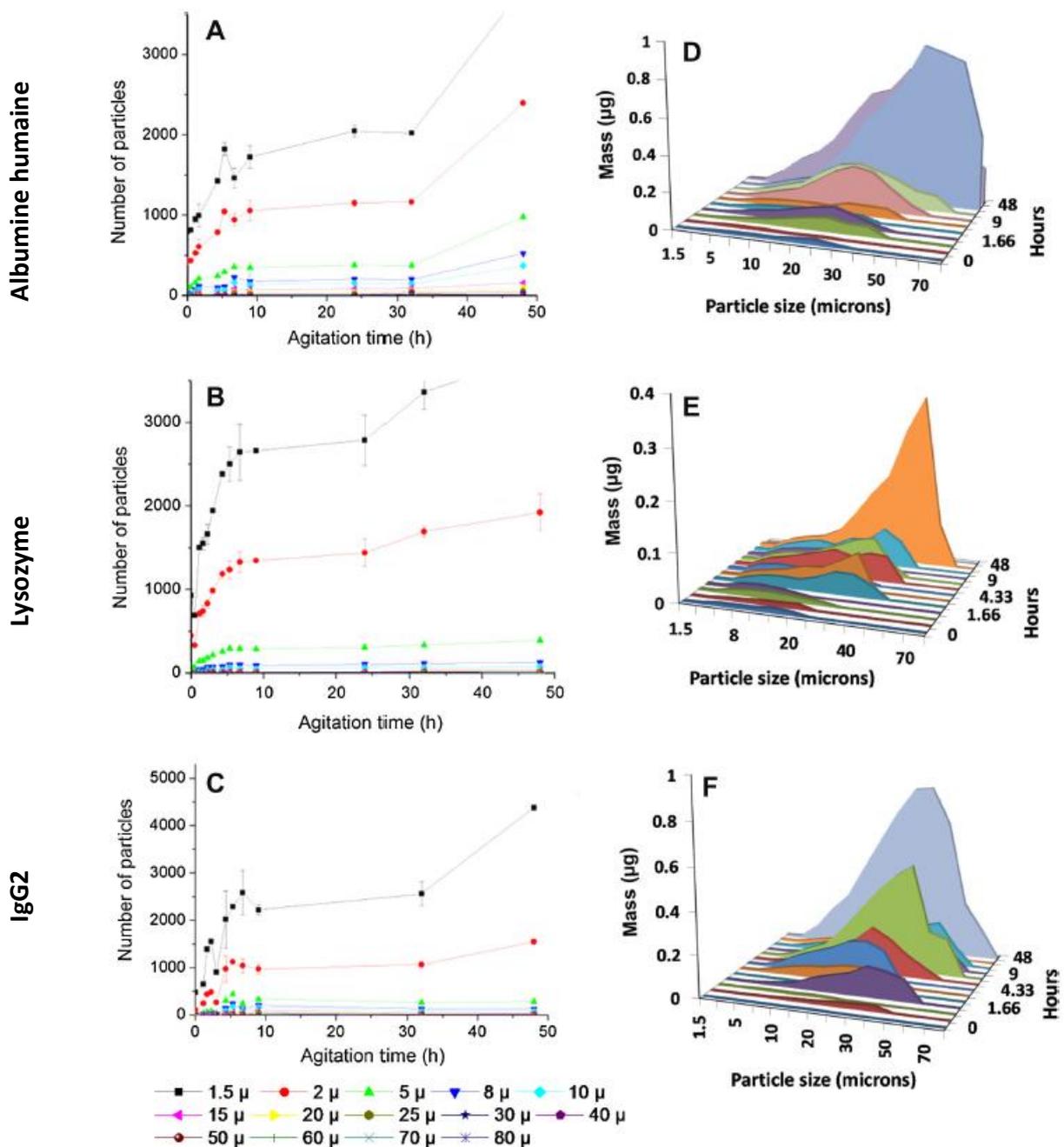


Figure 31. Analyse de l'augmentation particulaire de 3 solutions protéiques (Albumine, Lysozyme, IgG2) sous agitation pendant 50h. Le nombre de particules augmente rapidement pendant 9h d'agitation pour des tailles allant de 1,5 à 80 μm puis plus lentement de 9h à 48h. [69]

Cette étude montre clairement une augmentation des particules non visibles de différentes tailles allant de 1,5 μm jusqu'à 80 μm pour les trois protéines. Le nombre de particules augmente en 2 phases ; une première phase rapide jusqu'à 9h d'agitation suivie d'une phase plus lente de 9h à 48h. Les particules prédominantes sont les plus petites dans la phase initiale et avec le temps, ces petites particules peuvent se condenser en particules plus grosses (> 25-80 μm).

Il est commun de penser que l'agrégation des protéines induites par l'agitation est la conséquence de protéines mal ou non repliées à l'interface liquide-air [70]. L'influence

de l'agitation sur l'agrégation peut varier, en fonction du poids moléculaire de la molécule, de sa stabilité structurale, de la distribution spatiale des sites hydrophobes des protéines.

Pour nos trois protéines, l'agitation conduit donc à un repliement partiel des protéines à l'interface solution-air. Il y a une association des monomères non pliés formant ensuite des oligomères (polymère formé d'un petit nombre de monomères) pour l'albumine humaine, ou de plus gros agrégats (0,2-2µm) pour les lysozymes et les IgG. Jusqu'à une certaine taille d'agrégats, la réaction semble partiellement réversible. En revanche, lors d'une agitation constante les oligomères où les agrégats vont continuer de se former et condenser en plus grosses particules de manière non réversible, voir Figure 32.

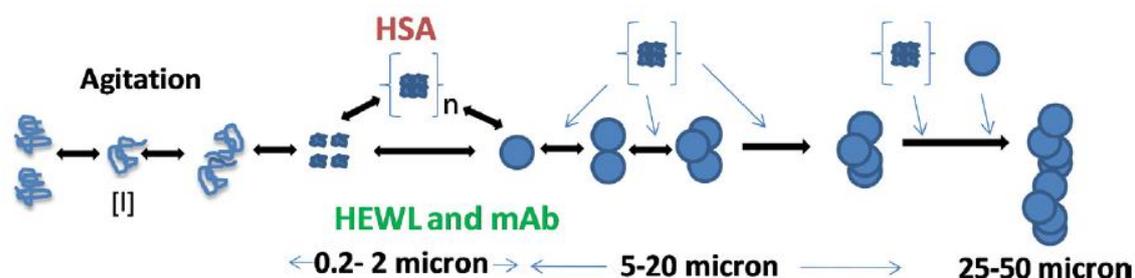


Figure 32. Schématisation de l'agrégation de protéines en solution. Après agitation, les protéines vont se replier partiellement formant des monomères. Ces monomères vont s'associer pour former des oligomères non solubles et ainsi provoquer des agrégats. [69]

De plus, il a été démontré qu'un effet de synergie existe entre la cavitation induite par une chute et l'agitation des flacons sur la génération d'agrégats de protéines. La combinaison de chute et d'agitation de flacons conduit à une quantité plus importante de particules que la somme des particules obtenues par chaque stress mécanique séparément. [71]

1.2.3 Comment mitiger ce phénomène

L'agrégation des protéines peut être inhibé par changement de la structure protéique (changement interne) ou par l'adaptation des propriétés de l'environnement des protéines (externe).

Les modifications internes peuvent être directement réalisées sur certains sites identifiés par des modifications chimiques. Le principal challenge dans la modification structurelle est de conserver l'activité de la protéine, vu que cette activité est

directement liée à sa structure. Cependant, plusieurs modifications structurelles ont montré une tendance à réduire l'agrégation. Par exemple la conjugaison de methoxypoly ethylene glycol sur les acides aminés PheB1 ou LysB29 de l'insuline permet d'augmenter sa résistance au phénomène d'agrégation par agitation. [72]

Le changement de l'environnement d'une protéine est une autre méthode pour permettre de réduire l'agrégation des protéines. La principale méthode est d'ajouter des excipients à la formulation. Plusieurs types d'excipients peuvent être utilisés comme des sucres, des polyols, d'autres acides aminés, des sels, des polymères ou des surfactants. Ces excipients stabilisent une protéine par des interactions préférentielles [73]. Quelques exemples historiques sont présentés dans le tableau 5.

Protéines	Formulation	Conditions de dénaturation	Résultats
rhGH ^[74] (recombinant human growth hormone)	0,0667 mg/ml dans 4,5M de Chlorure de guanidium	Etude de la génération d'agrégat pendant le repliement de la protéine (4h)	Mesure par absorbance : A ₃₅₀ = 0,6
	+ Tween 20		36% de réduction de l'absorbance
	+Tween 40		65% de réduction de l'absorbance
	+Tween 80		55% de réduction de l'absorbance
rhGH ^[75]	0,5mg/ml dans 20 mM de phosphate, 7,4	Agitation par vortex pendant 1 minute	67% d'agrégation
	+ 0,1% de Tween 80, 0,1% Pluoronic F68 ou 0,013% de Brij35 ⁽¹⁾		Aucun agrégat détectable
IgG ^[76]	50mg/ml dans 100 mM de phosphate, pH 6,8	Incubation à 60°C pendant 1h30	32,2% d'agrégation

	+ 33% de sorbitol		6,5% d'agrégation
pGH ^[77] (placental growth hormon)	0,5 mg/ml dans 50 mM de bicarbonate d'ammonium	Incubation à 63°C pendant 1h	60% d'agrégation
	+1% de Tween 20		40% d'agrégation
Hemoglobine ^[78]	50mg/ml dans du PBS, pH 7,4	5 cycles de congélation / décongélation (-20°C)	1,4x10 ⁴ particules > 2µm / ml
	+0,0125% Tween 80		2x10 ³ particules > 2µm / ml
	+0,1 M sucrose		7x10 ³ particules > 2µm / ml
RNase A ^[79]	5mg/ml dans 100mM de Tris-HCl, pH = 7,8	Incubation à 75°C pendant 24h	Agrégation détectable
	+ 0,1% sulfate de dextran		Agrégation non détectable
	+0,1% SDS		Agrégation non détectable

Tableau 5. Tableau présentant des exemples d'excipients permettant de limiter la génération de particules de plusieurs protéines. Le chlorure de guanidium est un agent chaotropique, dénaturant des protéines. Les Tweens sont des tensio-actifs non ioniques reconnus pour stabiliser les protéines, de même que le Pluoronic F68, qui est un tensio-actif non ionique qui est reconnu pour protéger les membranes cellulaires du déchirement. Le Brij 35 est aussi un tensio-actif. Le sorbitol est un polyol (sucre). Le PBS ou Tampon Phosphate Salin est un soluté physiologique. Le sulfate de dextran est un polyanion. Enfin le SDS ou Sodium Dextran Sulfate est un sel de sodium utilisé comme gélifiant et agent de contrôle de la viscosité.

2. Adsorption des protéines

Les interactions des protéines avec la surface des conditionnements primaires est un problème dans le domaine des biotechnologies. En 1976, Felgner et Wilson durant leurs recherches sur l'hexokinase, remarquent que lorsqu'ils utilisent des prélèvements bruts, aucune difficulté n'était rencontrée. Cependant, en utilisant des préparations purifiées à l'aide d'une centrifugeuse et de tube en polypropylène, l'activité de l'hexokinase était diminuée. Les investigations menées ont montré que cette perte d'activité était due à l'adsorption de l'hexokinase au tube en polypropylène.

L'adsorption de protéines à la surface de verrerie de laboratoire a aussi été rapportée, par exemple la ribonuclease. ^[80]

En 1992, Carl J. Burke et son équipe décrivent l'adsorption de 14 protéines différentes allant de 6,7 à 670 kDa sur plusieurs surfaces, verre et plastique dont ^[81] :

- Un verre non-traité – type I ou III
- Un verre siliconé (partie 2.3)
- Un verre de type II « Sulfur-treated glass »
- Un verre spécifique de la société Corning – Purecoat®

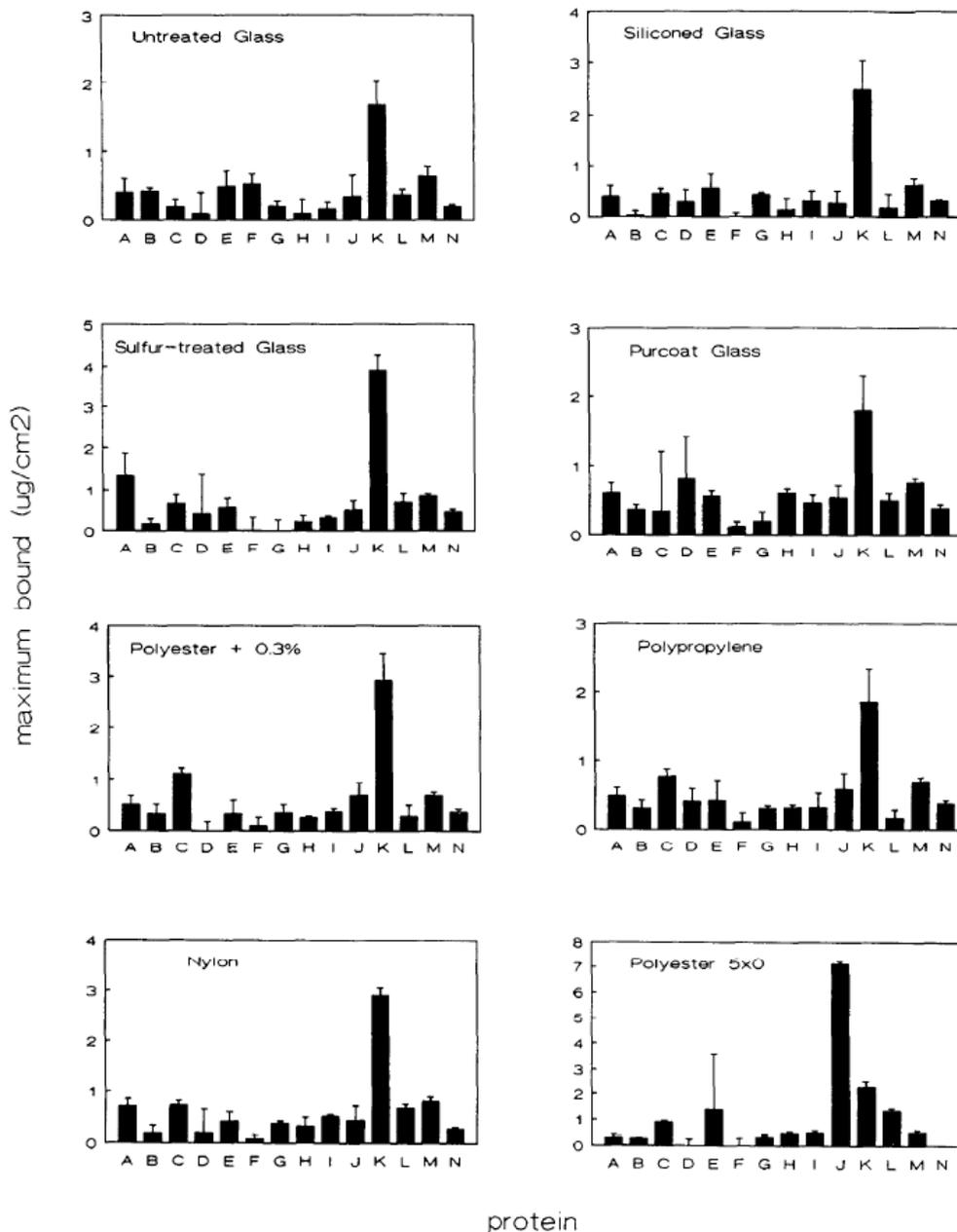


Figure 33. Etude montrant la quantité adsorbée de 14 protéines différentes en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en ordonnée en fonction de différents matériaux. A : aFGF, B : Alcool déshydrogénase, C : Apoferritine, D : Aprotinine, E : β -amylase, F : Albumine bovine, G : α -chymotrypsinogène, H : Conalbumine, I : Cytochrome C, J : Immunoglobuline G, K : Lactate déshydrogénase, L : Lysozyme, M : Thyroglobuline, N : Facteur de croissance [81]

La quantité adsorbée semble être principalement une propriété intrinsèque à chaque protéine comme la lactate déshydrogénase (en K) qui montre une quantité importante adsorbée sur chacun des types de surfaces.

Les propriétés des surfaces ont une influence sur l'adsorption. En effet, l'albumine (en F sur le graphique) montre une affinité significative pour le verre non traité, mais aucune affinité pour un verre présentant une surface siliconée.

D'une manière générale, le verre semble adsorber moins que les différents types de plastique. Dans les verres, le verre présentant une couche de silicone montre le moins d'interactions avec des protéines.

2.1 Mécanismes d'interactions

Il existe deux mécanismes prédominants d'adsorption des protéines sur une surface. Le premier mécanisme est la résultante d'interaction charge-charge (entre la charge de la protéine et celle de la surface, ou des interactions électrostatiques) ; le deuxième mécanisme d'adsorption intervient via des interactions hydrophobes accompagnées d'une déshydratation des protéines. Plusieurs autres types d'interactions tels que charge-dipôle, dipôle-dipôle ou force de Van der Waal existent en plus des liaisons hydrogène et peuvent jouer un rôle dans le processus d'adsorption. Cependant, les énergies de ces liaisons sont généralement faibles. [82]

Le modèle général utilisé pour décrire l'adsorption d'une protéine via la déshydratation de celle-ci sur une surface est illustré en figure 34. Le processus peut être décrit selon l'équation suivante :

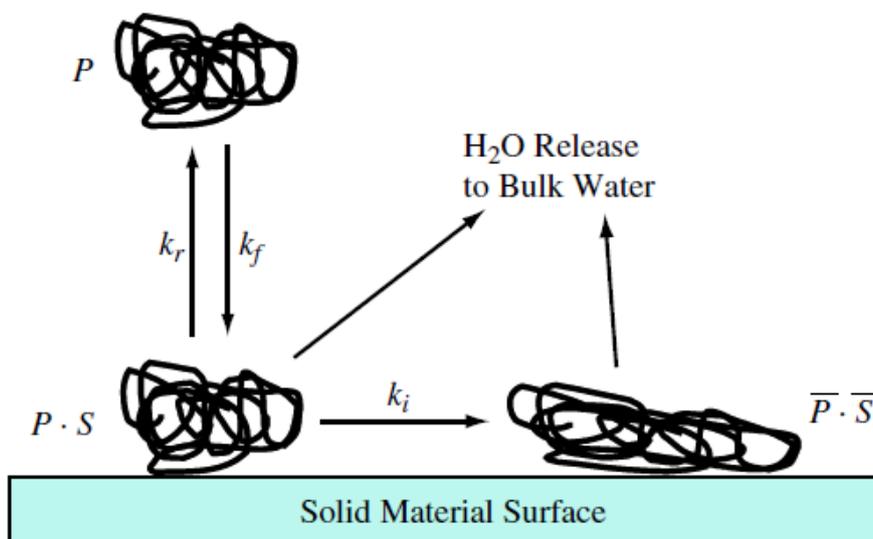


Figure 34. Schématisation de l'adsorption d'une protéine sur une surface solide.

où P est la concentration de la protéine en solution, S est la surface disponible pour les sites d'adsorption, $P.S$ est la concentration de protéines adsorbées de façon réversible via les constantes k_r et k_f . $\bar{P} . \bar{S}$ est la concentration de protéines adsorbées de façon irréversible en fonction de la constante k_i . L'eau est montrée complexée à la protéine et à la surface, qui est ensuite libérée dans la solution au cours des divers stades d'adsorption. Ceci montre l'importance de l'eau en tant que constituant moléculaire dans le processus d'adsorption plutôt que d'être simplement un solvant inerte. En raison de la présence de l'irréversibilité de l'étape montrée à droite de l'équation, une surface qui adsorbe une protéine d'une manière irréversible deviendra inévitablement saturée de la protéine adsorbée si le temps d'interaction est suffisant. [83]

2.2 Enjeu et Problématique de l'adsorption des protéines

Les peptides et protéines étant par nature des molécules amphiphiles, ils vont facilement se fixer sur une grande variété de surface. Cette tendance à l'adsorption peut mener à des résultats inexacts et donc à mauvaises conclusions lors de diverses études : recherche fondamentale, en développement de médicaments...

Une étude a été menée en utilisant plusieurs types de matériaux pour conditionner des protéines : du verre borosilicate, du verre sodocalcique, et divers matériaux plastiques (polystyrene, polypropylène, polyallomère, polycarbonate). La fraction récupérable pour chaque protéine/conditionnement est présentée en figure 35. Ainsi cette figure montre le pourcentage minimal et maximal de récupération pour plusieurs protéines. Il est possible d'observer qu'une perte importante intervient lorsque le mauvais tube est utilisé. Par exemple pour la protéine ghréline (hormone digestive stimulant l'appétit), le pourcentage de récupération varie de 20.0 +/- 1,4% contre 90,3 +/- 1,9%, $P < 0.001$). [84]

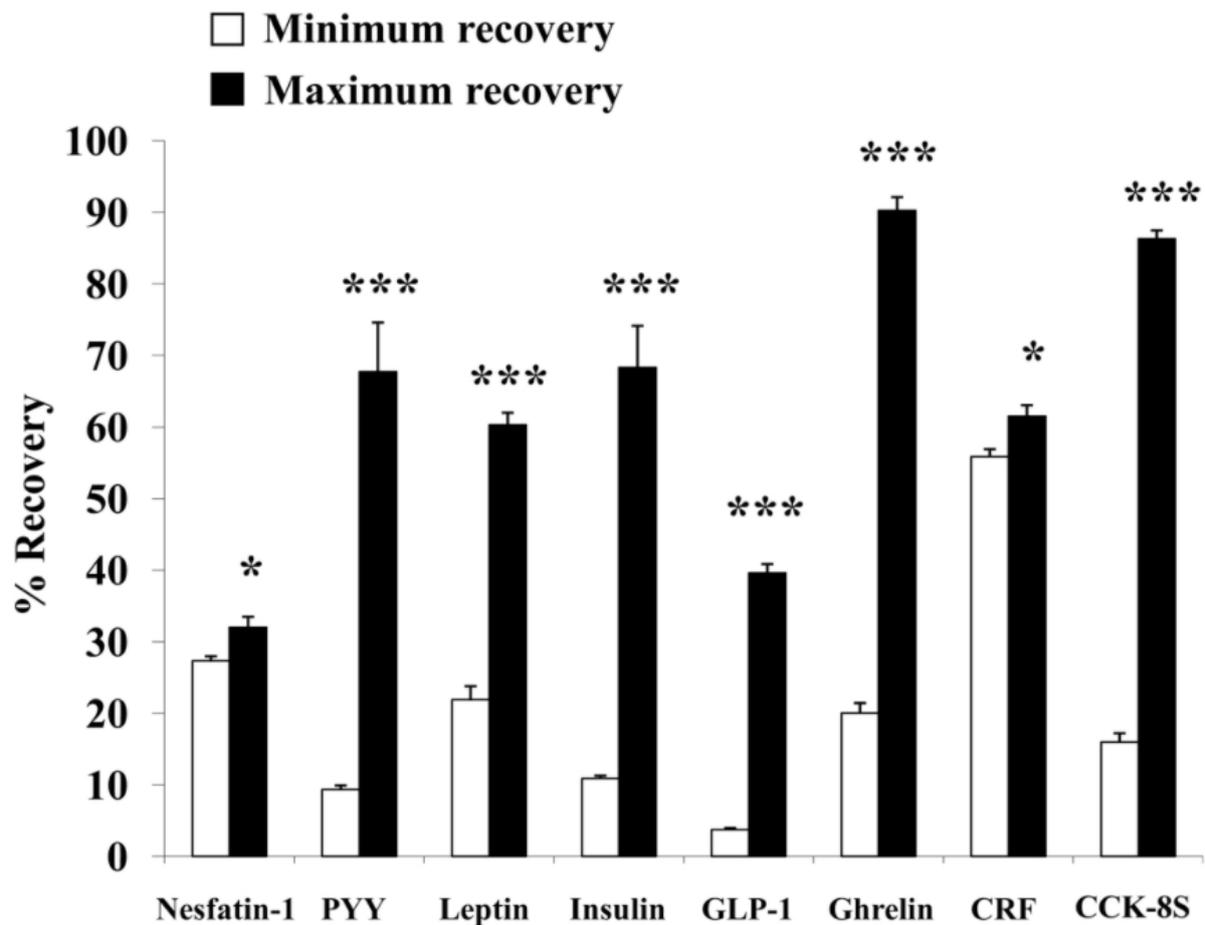


Figure 35. Graphique représentant la quantité minimum et maximum de récupération de 8 solutions protéiques différentes en fonction du type de matériaux utilisé pour le conditionnement. Les pourcentages de récupération des protéines varie entre 20% et 90% [84].

Pour les formulations pharmaceutiques de protéines, l'adsorption est un problème majeur quand cette protéine médicamenteuse entre en contact avec des matériaux de process comme des filtres, des tubulures, mais aussi le conditionnement primaire. Avec plus de 50% du marché, les flacons en verre sont les conditionnements les plus fréquemment utilisés pour les formulations injectables.

La proportion d'adsorption d'une IgG1 a été étudiée sur des flacons siliconés. Il a été démontré que l'adsorption de cette immunoglobuline est très fortement dépendante de la formulation, du pH et de la force ionique. L'état des charges totales d'une protéine est un facteur primordial dans le phénomène d'adsorption [85]. La modification de ces charges par le conditionnement primaire en verre peut ainsi favoriser l'adsorption d'une protéine thérapeutique, et engendrer des phénomènes néfastes sur l'efficacité d'un traitement, ou pire, directement sur la santé du patient.

2.3 Comment mitiger ce phénomène d'adsorption ?

Une solution possible en étape de recherche et développement est de « protéger » la solution protéique en saturant la surface interne du conditionnement primaire à l'aide d'une protéine neutre comme l'albumine bovine ^[86]. Les micelles de Tween 20, un excipient largement utilisé dans les formulations de protéines thérapeutiques, peut permettre de réduire l'adsorption des protéines. ^[87]

Une autre possibilité est d'utiliser des conditionnements primaires ayant un revêtement de surface permettant de réduire la tendance des protéines à interagir avec une surface. Il est possible par exemple d'utiliser des conditionnements primaires avec un revêtement en polyéthylène glycol, ou encore avec un revêtement à base de silicone. ^[84]

2.3.1 Modification de la surface interne des flacons : couches barrières et modifications de la surface du verre

Il existe des possibilités de modifier la surface interne du verre afin de modifier certaines propriétés. Comme nous l'avons vu précédemment pour l'obtention d'un verre de type II à l'aide de l'extraction des ions Na⁺ permettant une meilleure résistance hydrolytique, certains procédés peuvent modifier intégralement la surface du verre.

Le siliconage :

Ce procédé va permettre l'ajout d'une couche hydrophobe à l'aide d'un silicone. Le plus commun étant le PolyDiMéthylSiloxane ou PDMS. Le PDMS est un enchaînement du motif : $-\text{[O-Si(CH}_3\text{)}_2\text{]}_n-$ défini à la pharmacopée européenne (3.1.9) représenté ci-après ^[88] :

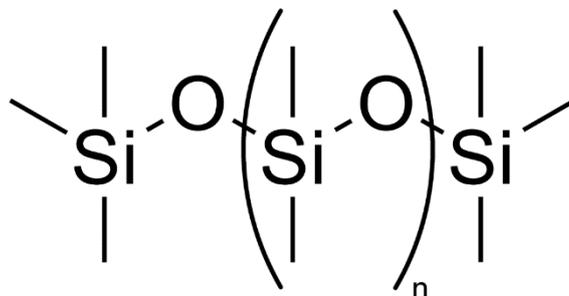


Figure 36. Représentation de la molécule de PDMS

Un verre sans traitement de surface, ni couche barrière présentera en surface des motifs Si-OH / Si-O⁻ comme le montre la Figure 37.

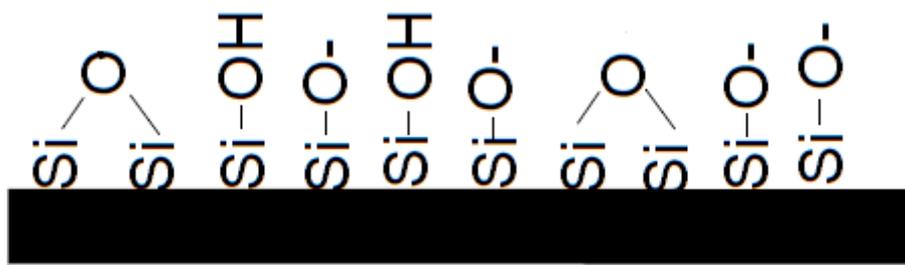


Figure 37. Schématisation de la surface d'un verre.

En raison des différences d'électronégativité entre les atomes de silicium (1,9) d'oxygène (3,44) et d'hydrogène (2,2), ces liaisons covalentes de surface seront polarisées. Cette polarisation de surface entraîne des interactions entre la surface du verre et un liquide aqueux par exemple.

Cependant, ces motifs vont permettre au PDMS de se fixer au verre via une des liaisons Si-O-Si et ainsi masquer la polarité de surface. Ainsi une surface en verre siliconée ne présentera plus de liaisons polarisées mais des motifs -CH₃ apolaires comme représenté en Figure 38.

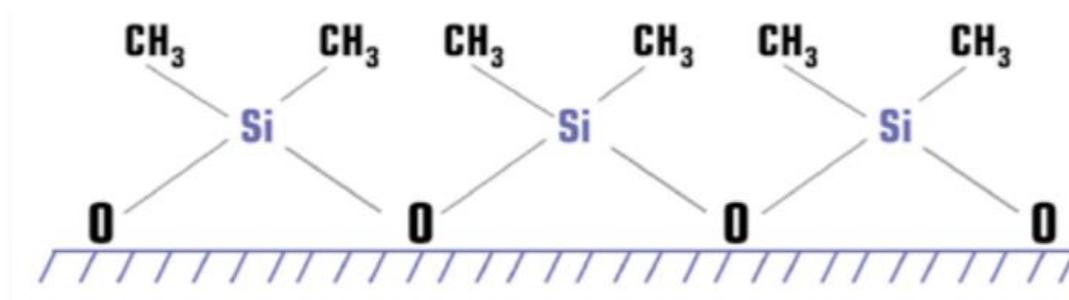


Figure 38. Schématisation d'une surface en verre siliconée [89].

Cette surface hydrophobe est notamment visible par un essai d'angle de goutte. Dans le cas d'une surface siliconée, une goutte d'eau aura tendance à minimiser ses interactions avec la surface et présentera un angle de goutte important. Si nous prenons une surface non-siliconée disposant de liaisons polarisées en surface, la goutte d'eau aura tendance à s'étaler sur la surface.

Le siliconage permet d'apporter des propriétés comme une diminution des interactions entre un médicament aqueux et la surface du verre, mais aussi pour certaines protéines, réduire l'adsorption et/ou la dénaturation de celle-ci, en plus d'aider l'écoulement d'une solution aqueuse pour perfusion, ou le prélèvement de cette solution à l'aide d'une seringue.

Couche de SiO₂ :

La société SCHOTT AG a développé une méthode de dépôt d'une couche de SiO₂, ce qui permet de réduire la lixiviation des différents ions mobiles (Na⁺, Mg⁺, Ca²⁺, Al³⁺...) par une solution conditionnée dans un emballage primaire en verre ainsi que diverses interactions, comme l'adsorption de protéines [90,91].

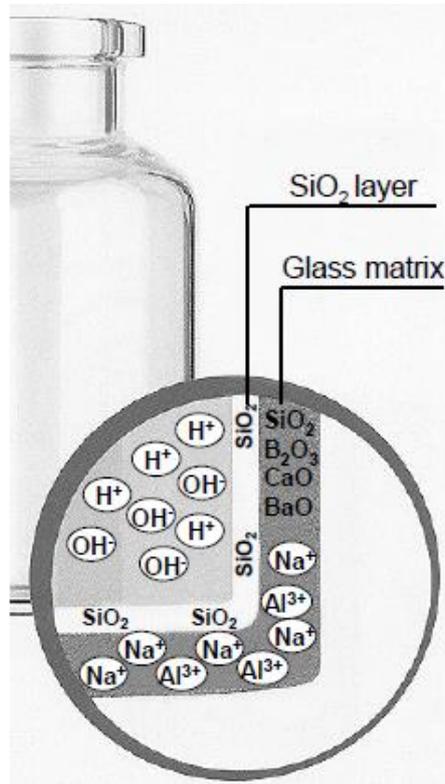


Figure 39. Schématisation d'un flacon Schott Type I plus® [91].

Cette couche de SiO₂ est homogène, d'une épaisseur de 100-200 nm liée de manière covalente à la surface du verre. Cette couche est déposée par PICVD (Plasma Impulse Chemical Vapor Deposition). Un précurseur sous forme de gaz va être combiné avec de l'oxygène puis pulsé à l'intérieur du conditionnement à revêtir (flacons, seringues...) afin d'y déposer une fine couche, ici du SiO₂ [92].

Conclusion

Bien que le verre soit reconnu comme étant le conditionnement le plus neutre existant vis-à-vis d'un médicament, certaines précautions sont à prendre lors du développement galénique d'un candidat médicament. Lorsque le verre est envisagé comme choix de conditionnement primaire, plusieurs questions interviennent : quelle méthode de production : verre moulé, verre étiré ? quel type de verre ?

De plus, des études d'interactions contenant-contenu sont à mener de manière précoce lors de ce développement. Certaines formulations galéniques peuvent être incompatibles avec le verre, ou dans certains cas la formulation galénique peut être adaptée pour réduire les interactions verre-protéine.

Les protéines sont des molécules fragiles pouvant être impactées lors du transport. Des études spécifiquement ciblées du maintien de la qualité de la formulation après différents types de transport doivent être menées, notamment en termes de génération de particules qui peut être délétère pour le patient.

Enfin, l'adsorption des protéines est un phénomène à prendre en compte de manière précoce, dès le développement d'un candidat médicament. Ce phénomène peut engendrer de mauvaises conclusions lors de ce développement, mais aussi engendrer un effet du médicament réduit, si la concentration protéique est faible en solution.

Bibliographie

- [1] L. Solomun *et al*, "The impact of primary packaging on the quality of parenteral products", J Pharm Bio Ana, 48, 2008, 744-748.
- [2] J.E. Shelby, « Introduction to Glass Science and Technology », Second Edition, Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 2005, p3.
- [3] C.J. Graham *et al*, « Pointes de flèches et petits Outils de pierre en roches autres que le silex, en Ecosse. » ,Bulletin de la Société préhistorique de France, tome 27, n°4, 1930, p. 213-220
- [4] <http://www.societechimiquedefrance.fr/Verre>, consulté le 31/12/2019.
- [5] P. Richet, « Une brève histoire du verre », Une petite encyclopédie du verre, vol. 13, no 4, 2007, p. 4-8.
- [6] R.A. Schaut *et al*, "Historical Review of Glasses Used for Parenteral Packaging", PDA J Pharm Sci and Tech, vol 71, p 279-296, 2017.
- [7] Jerzy Zarzycki (ed.), « Les verres et l'état vitreux », Masson, 1982.
- [8] ISO 11357-2 :2013 Partie 2 : Détermination de la température de la transition vitreuse [...]
- [9] P. Y. Huang *et al*, "Direct Imaging of a Two-Dimensional Silica Glass on Graphene," Nano Lett., vol. 12, 2012, p 1081–1086.
- [10] J. Barton et C. Guillemet, « Le VERRE Science et Technologie », Les Ulis, EDP Sciences, 2005, p13-23.
- [11] Pharmacopée Européenne, version 10.0 applicable au 01/2020, monographie 3.2.1, p489-497
- [12] Présentation commerciale. Utilisé avec l'aimable autorisation de SGD Pharma.
- [13] J.L Boutonnier, « Verre d'emballage alimentaire », Dossier techniques de l'ingénieur, l'expertise technique et scientifique, 10 mars 2012.
- [14] <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Verre>, consulté de 07/01/2020
- [15] M. Mossé, « Emballages en verre », Technique de l'ingénieur, p.11
- [16] C. Wagner, « Le verre à usage pharmaceutique », Emballages pharmaceutiques, 2014, p52-55.
- [17] S. A. Pillai *et al*, « Pharmaceutical Glass Interactions : A Review of Possibilities" J. Pharm. Sci. & Res. Vol. 8(2), 2016, 103-111

- [18] P. Nasa, "A Review on Pharmaceutical Packaging Material", World Journal of Pharmaceutical research, Vol 3(5), 2014, 344-368
- [19] R. Iacocca *et al*, "Corrosive attack of glass by a pharmaceutical compound", J Mater Sci, vol 42, 2007, p 801-811
- [20] M. Ciccotti, "Stress-corrosion mechanisms in silicate glasses", J. Phys. D: Appl. Phys, vol 42, 2009.
- [21] R.H Doremus, Glass Science, Wiley-Interscience. New York. 1994.
- [22] K. Cummings *et al*, "Weathering of glass in moist and polluted air", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B 136-138, p 858-862, 1998.
- [23] C.G Pantano, "Glass Surface Treatments : Commercial Processes Used in Glass Manufacture" Penn State University.
- [24] B.B Bunker "Molecular mechanisms for corrosion of silica and silicate glasses", J. Non-Cryst. Solids 179, 1994, 300–8
- [25] Casey, W. H. et al, "CHAPTER 10. LEACHING OF MINERAL AND GLASS SURFACES DURING DISSOLUTION". Mineral-Water Interface Geochemistry, edited by Michael F. Hochella and Art F. White, Berlin, Boston: De Gruyter, 2018, pp. 397-426.
- [26] <https://www.anses.fr/fr/content/les-prot%C3%A9ines> consulté le 03/01/2022
- [27] A. Ambrogelly et al, « Natural expansion of the genetic code », Nature Chem Biol, vol. 3, no 1, 2007, 29-35
- [28] Christine Brooker (ed.), « Le corps humain : Etude, structure et fonction », de boeck, 2000.
- [29] Marianne Øksnes Dalheim, PhD candidate Biopolymers, TBT4135, Autumn 2013
- [30] <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/prot%C3%A9ine/64527> (consulté le 27/01/2020)
- [31] <https://esr.cscmonavenir.ca/files/2010/12/fiche-etudeSyn-Prot.pdf> (consulté le 27/01/2020)
- [32] http://biochimej.univ_angers.fr/Page2/COURS/7ReIStructFonction/2Biochimie/1SyntheseProteines/1SyntheseProt.htm
- [33] W.Kabsch et al, "Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features", Biopolymers, Vol. 22, 1983, 2577-2637.
- [34] <https://www.coursdebio.fr/biochimie-structurale/partie-bs1-les-protides/prot9-structure-secondaire-des-prot%C3%A9ines/> (consulté le 19/02/2020)

- [35] <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/2b.html> (consulté le 19/02/2020)
- [36] J.S. Richardson et al, "Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation", PNAS, Vol.99 n°5, 2002, 2754-2759.
- [37] https://fr.wikipedia.org/wiki/H%C3%A9moglobine#Structure_et_fonctionnement
- [38] http://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/Cours%20Immuno/chapitre10.html
consulté de 27/12/2021
- [39] http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/bcm/chapitre1/Chapitre1_antikorps.pdf
consulté le 27/12/2021
- [40] Salhi, Imed. (2005). Ciblage des cancers de l'ovaire par un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de type II de l'hormone anti- Müllerienne (AMHR-II)
- [41] A.L. Abraham, « Caractérisation et analyse évolutive des répétitions intragéniques : une étude au niveau des gènes, des séquences protéiques et des structures tridimensionnelles », sous la direction du Dr.E.Rocha et du Dr.J.Pothier, Paris, Université Pierre et Marie Curie, 2008.
- [42] E.Y Chi *et al*, "Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation", Pharm Res. 20(9), 2003,1325–1336.
- [43] W. Wang *et al*, "Antibody structure, instability, and formulation". J Pharm Sci 96(1), 2007, 1-26.
- [44] A.L Fink, "Protein aggregation : folding aggregates, inclusion bodies and amyloid", Fold Des. 3, 1998, R9-R23.
- [45] <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/pH/60061> (consulté le 04/08/2021)
- [46] <https://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/1b.html> (consulté le 04/08/2021)
- [47] http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/siitub/proprecip.html (consulté le 04/08/2021)
- [48] A. Fatouros *et al*, "Recombinant factor VIII SQ - influence of oxygen, metal ions, pH and ionic strength on its stability in aqueous solution", Int. J. Pharm, 155, 1997, 121–131.
- [49] M. Vrkljan *et al*, "Thermal stability of low-molecular-weight urokinase during heat treatment. 2. Effect of polymeric additives", Pharm. Res, 11, 1994, 1004–1008.
- [50] T. H. Nguyen and S. J. Shire. Stability and characterization of recombinant human relaxin. In R. Pearlman and Y. J. Wangs (eds.), Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs, Plenum Press, New York, 1996, pp. 247–211.

- [51] B. A. Kerwin *et al*, “Acute and longterm stability studies of deoxy hemoglobin and characterization of ascorbate-induced modifications”, *J. Pharm. Sci*, 88, 1999, 79–88.
- [52] L. C. Gu *et al*, “Stability of interleukin-1-beta (IL-1-gamma) in aqueous solution — analytical methods, kinetics, products, and solution formulation implications” *Pharm. Res*, 8, 1991, 485–490.
- [53] M. W. Townsend *et al*, “Stability of ribonuclease-a in solution and the freeze-dried state” *J. Pharm. Sci*, 79, 1990, 1083–1086.
- [54] L. Nielsen *et al*, “Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism” *Biochemistry*, 40, 2001, 6036–6046.
- [55] AS Rosenberg. “Effects of proteins aggregates : An immunological perspective.” *AAPS J*, 8(3), 2006, E501-E507.
- [56] T. Solomon, « The Definition and Unit of Ionic Strength”, *Journal of Chemical Education*, 2001, vol 78(12), p1692.
- [57] AA Green. “Studies in the physical chemistry of the proteins. VIII. The solubility of hemoglobin in concentrated salt solutions. A study of the salting out of proteins”. *J Biol Chem* 93, 1931, 495–516.
- [58] E. Y. Chi *et al*, “Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation”, *Pharm Res*. 20(9), 2003,1325–1336.
- [59] J. Phalippou, “Verres- Aspects théoriques”, *Sciences fondamentales / Physique Chimie, Techniques de l’ingénieur*, 2001.
- [60] US department of health and human services, FDA, CDER, CBER “ Guidance for Industry : Immunogenicity assessment for therapeutic protein products” , 2014.
- [61] M. R. Nejadnik *et al*, “Postproduction handling and administration of protein pharmaceuticals and potential instability issues”, *J.Pharm. Sci.*, 2018, 107(8),
- [62] T.W Randolph *et al*, « Do not drop : Mechanical shock in vials causes cavitation, protein aggregation, and particle formation”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 104, 602-611.
- [63] KS Suslick *et al*, “Inside collapsing bubble : Sonoluminescence and the conditions during cavitation”. *Annu Rev Phys Chem* 59, 2008, 659-683
- [64] RT Dean *et al*, “Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation”. *Biochem J.*, 324, 1997, 1-18.
- [65] H. Wu *et al*, “Container surfaces control initiation of cavitation and resulting particle formation in protein formulations after application of mechanical shock”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109, 2020, 1270-1280.

- [66] N. Pratiwi *et al* « A facile Preparation of Transparent Ultrahydrophobic glass via TiO₂/Octadecyltrichlorosilane coatings for self-cleaning material, 2020, ChemistrySelect, 5, 1450-1454.
- [67] S. Movafaghi *et al*, “The effect of container surface passivation on aggregation of intravenous Immunoglobulin Induced by Mechanical Shock”, Biotechnology Journal, 2020, Vol 15, n°9.
- [68] R. Rodrigues *et al*, « Parameters Influencing Cavitation Within Vials Subjected to Drop Shock », nature research, Scientific reports, 2019, 9, 19210.
- [69] M. Jayaraman *et al*, “Agitation-induced aggregation and subvisible particulate formation, 87, 2014, 299-309.
- [70] R.M Resinmeyer *et al*, « effect of ions on agitation- and temperature induced aggregation reactions of antibodies, Pharm. Res. , 26, 2009,903-913.
- [71] T. Torisu *et al*, « Synergistic effect of cavitation and agitation on protein aggregation”, J Pharm Sci, 2016, 1-9.
- [72] K. Hinds *et al*, « Synthesis and characterization of Poly(ethylene glycol) – Insulin Conjugates », Bioconjugate Chem. 2000, 11, 2, 195–201.
- [73] W. Wang, “Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics”, International Journal of Pharmaceutics, 289(1–2) ,2005,1-30.
- [74] N.B Bam *et al*, « Molten globule intermediate of recombinant human growth hormone: stabilization with surfactants”. Biotechnol. 12, 1996, 801–809.
- [75] M. Katakam *et al*, “Effect of surfactants on the physical stability of recombinant human growth hormone”. J. Pharm. Sci. 84, 1995, 713–716
- [76] M. Gonzalez *et al*, « Thermal stability of human immunoglobulins with sorbitol. A critical evaluation”. Vox.Sang. 68, 1995, 1–4.
- [77] S.A Charman *et al*, “Techniques for assessing the effects of pharmaceutical excipients on the aggregation of porcine growth hormone. Pharm. Res. , 10, 1993, 954–962.
- [78] B.A Kerwin *et al*, “Effects of Tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at –20 °C of a recombinant hemoglobin”. J. Pharm. Sci. 87, 1998, 1062–1068.
- [79] A.M Tsai *et al*. “Electrostatic effect in the aggregation of heat-denatured RNase A and implications for protein additive design”. Biotechnol. Bioeng. 59, 1998, 281–285.
- [80] P.L. Felgner *et al*, 1976, “hexokinase bindings to polypropylene test tubes”, Analytical biochemistry 74, 1976, 631-635.
- [81] Carl J. Burke, « The adsorption of proteins to pharmaceutical container surfaces », Inter J of Pharm, 86,1992, 89-93.

- [82] M.R. Duncan *et al*, « Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene ». *Inter J of Pharm*, 120 (2), 1995, 179-188
- [83] R.A. Latour, « Biomaterials : Protein-surface interactions », *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 2005.
- [84] M. Goebel-Stengel *et al*, « The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides », *Anal Biochem*, 414, 2015, 38-46.
- [85] Kerstin Höger *et al*, « IgG1 Adsorption to siliconized glass vials – Influence of pH, Ionic strength, and nonionic surfactants, *J of Pharm Sci*, 104, 2015, 34-43.
- [86] P.L Gelgner *et al*, “Hexokinase binding to polypropylene test tubes : artifactual activity losses from protein binding to disposable plastics”, *Anal. Biochem.* 74,1976, 631-635.
- [87] C. Ruiz *et al*, “Effect of ethylene glycol on the thermodynamic and micellar properties of Tween 20.” *Colloid Polym Sci*, 281(6), 2003, 531-541.
- [88] https://fr.wikipedia.org/wiki/Polydim%C3%A9thylsiloxane#cite_note-5 (consulté le 22/01/2020)
- [89] https://www.sgd-pharma.com/sites/default/files/mediacenter/sgd_pharma_siliconization.pdf (consulté de 22/01/2020)
- [90] https://www.schott.com/pharmaceutical_packaging/french/products/vials/top-line-options/type-1-plus.html (consulté le 22/01/2020)
- [91] Dr Robert Hormes SCHOTT AG, *Pharma symposium*, 2006.
- [92] <https://www.schott.com/rd/english/coating/picvd.html> (consulté de 22/01/2020)

Université de Lille

FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Année Universitaire 2021/2022

Nom : BOUST

Prénom : Romain

Titre de la thèse :

LE FLACON EN VERRE A USAGE PHARMACEUTIQUE : PRODUCTION, PROPRIETES ET L'IMPACT DE CE CONDITIONNEMENT SUR LA FORMULATION D'UN MEDICAMENT BIOLOGIQUE

Mots-clés :

Verre à usage pharmaceutique, verre moulé, verre étiré, Type I, Type II, Type III, interactions contenant-contenues, protéines, immunoglobuline, précipitation, adsorption.

Résumé :

Le rôle d'un conditionnement primaire est de conserver les propriétés d'un médicament acquis lors de la production, notamment les propriétés particulières, de stérilité et le pH de la solution.

Cependant, par divers mécanismes, un conditionnement primaire peut impacter directement la qualité d'une préparation médicamenteuse d'origine biologique. La principale structure biologique utilisée en médicament sont les protéines. Le verre peut relarguer certains éléments pouvant impacter le pH d'une solution, mais aussi générer des particules par précipitation des protéines.

Le conditionnement primaire est primordial à prendre en compte lors du développement du médicament mais aussi en routine pour s'assurer de l'efficacité et l'innocuité d'une préparation médicamenteuse de principe actif biologique.

Membres du jury :

Présidente et Directrice, conseillère de thèse : MUSCHERT Susanne, Maître de conférences (HDR), Laboratoire de pharmacotechnie industrielle / UFR3S-Pharmacie.

Assesseur : HAMOUDI Mounira, Maître de conférences, Laboratoire de pharmacotechnie industrielle / UFR3S-Pharmacie.

Membre extérieur : BICHET Jean-Paul, Pharmacien, Expert scientifique validation & JENNEVE Marion, Pharmacienne, LFB à Lille.