

# Caractérisation par microcalorimétrie des matériaux pharmaceutiques

TA Instruments France, une division de WATERS SAS

Jacques Loubens : [jloubens@tainstruments.com](mailto:jloubens@tainstruments.com)  
Frédéric Hoppenot : [fhoppenot@tainstruments.com](mailto:fhoppenot@tainstruments.com)



- Rappels technologiques sur les techniques suivantes:
  - Analyse calorimétrique différentielle – Nano DSC
  - Calorimètre de titration isotherme – Nano ITC et Affinity ITC
  - Thermal Activity Monitor – TAM IV
  
- Exemples d'Applications en Développement pharmaceutique:
  - Caractérisation des virus et leurs interactions
  - Stabilité des biomolécules en solution
  - Stabilité et compatibilité des solides
  
- Session de questions/réponses (via le chat)

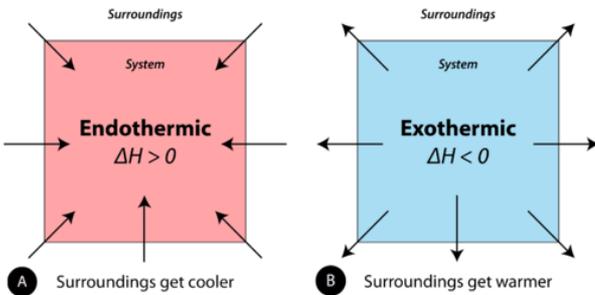
## Rappels technologiques

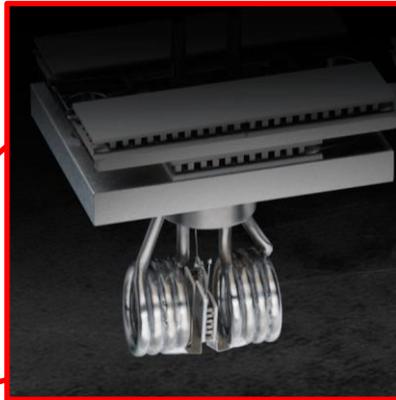
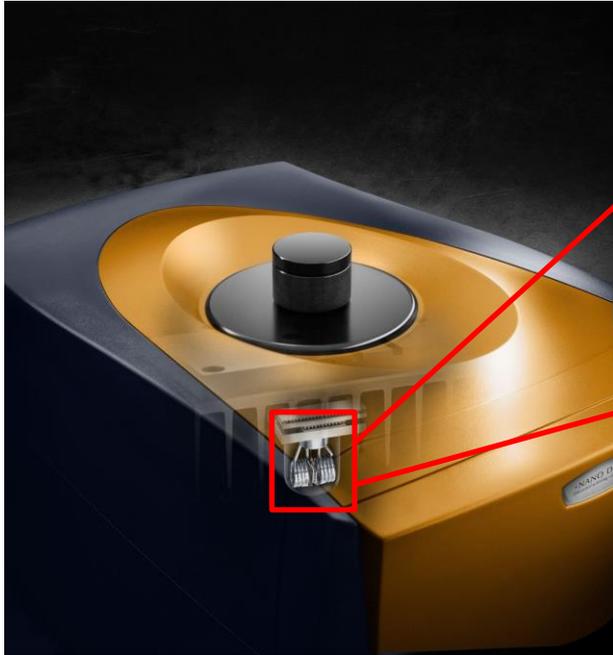
**TA Instruments France, une division de WATERS SAS**

Jacques Loubens : [jloubens@tainstruments.com](mailto:jloubens@tainstruments.com)  
Frédéric Hoppenot : [fhoppenot@tainstruments.com](mailto:fhoppenot@tainstruments.com)



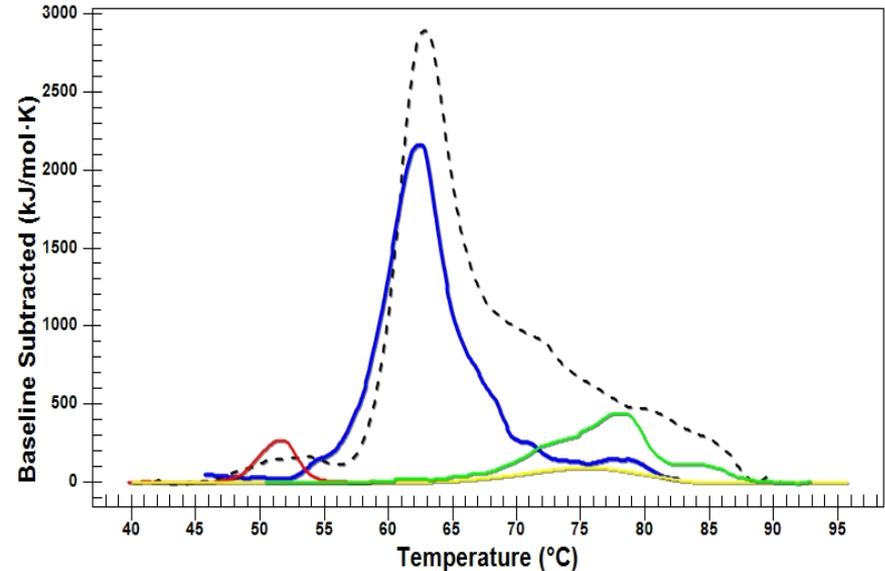
- Le mot DSC est l'acronyme anglais pour Differential Scanning Calorimetry
- L'analyse Calorimétrique Différentielle fournit des informations qualitatives et quantitatives sur les transformations physico-chimiques entraînant des échanges de chaleur endothermiques ou exothermiques
- Dans le cas de la Nano DSC, nous travaillons sur des échantillons liquides de petit volume (300µL de volume dans la cellule)
- Le calorimètre à compensation de puissance Nano DSC est conçu pour caractériser la stabilité moléculaire en solution





- Principe de calorimétrie par compensation de puissance
  - Température de  $-10^{\circ}\text{C}$  à  $130^{\circ}\text{C}$
  - Forme de cellules de type capillaire pour maximiser la surface d'échange et la sensibilité pour un petit volume ( $300\ \mu\text{L}$ )
  - La forme de cellules capillaire permettant également d'éviter l'agrégation des protéines
  - Capillaire en platine pour une meilleure sensibilité
- 
- Possibilité de mettre en option un passeur d'échantillons

- Stabilité et structure des biopolymères
  - Etude du dépliement des biopolymères
  - Etude des dénaturations des protéines
  - Domaine, molécule de base, oligomères
- Interaction avec des ligands
  - Interactions principe actif avec des protéines ou acides nucléiques
- Structure des membranes
  - Bicouches lipidiques
  - Protéines membranaires
  - Libération d'oligoéléments par des micelles ou lipides
- Milieux complexes



Pointillés = Plasma sanguin

Solide = Protéines pures dans du plasma

# Rappels technologiques – Pourquoi la Nano DSC ?

- Echantillons natifs
  - Pas besoin d'utiliser de technique de dérivation pour obtenir un résultat exploitable
  - Pas de limites de poids moléculaire
  - Ne dépend pas de fluorophores
  - Compatible avec divers tampons et excipients
  - Compatible avec les détergents
- 
- Profil thermodynamique en une seule mesure :  $T_m$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta C_p$ ,  $\Delta G$



## ■ Variation de $C_p$ ( $\Delta C_p$ )

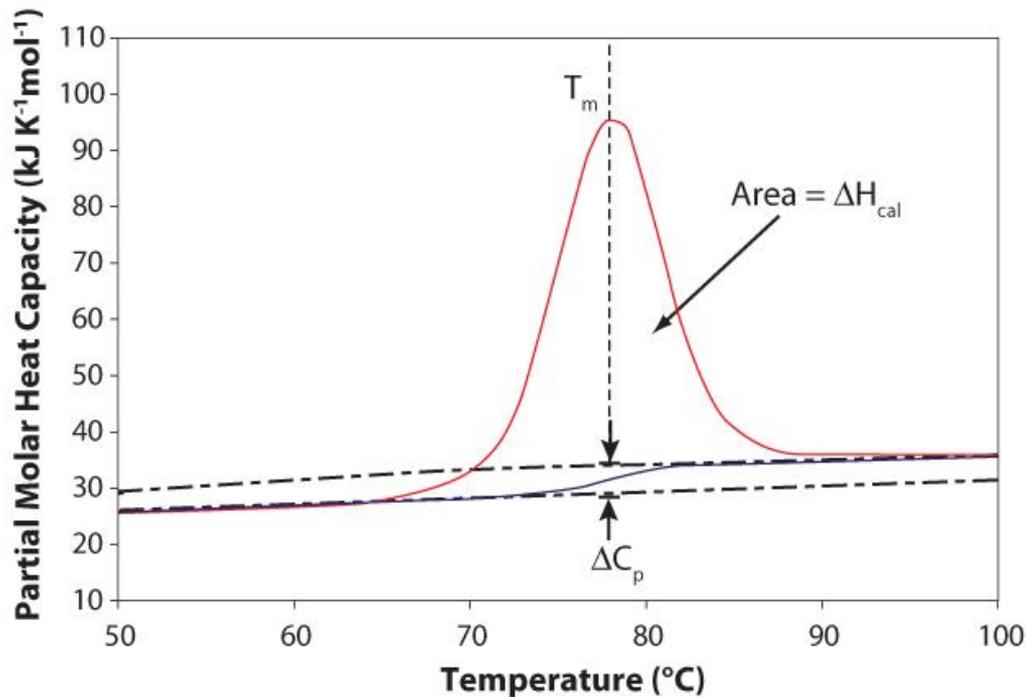
- Reflète principalement l'exposition des groupes hydrophobes ( $\Delta C_p$  est positif)
  - Augmentation de la flexibilité, perte de structure  $\rightarrow$  entropie

## ■ Enthalpie

- Montre les forces de stabilisation
- $\Delta H$ : interactions non covalentes – hydrophobes & électrostatiques, liaisons  $H^+$

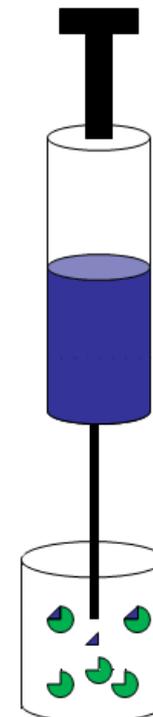
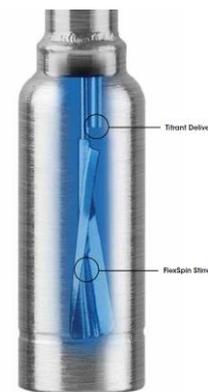
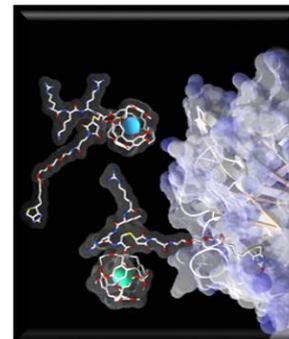
## ■ $T_m$ :

- Stabilité des macromolécules



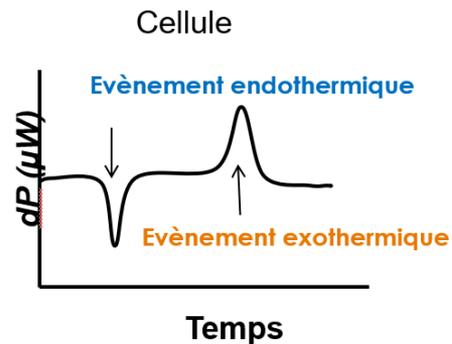
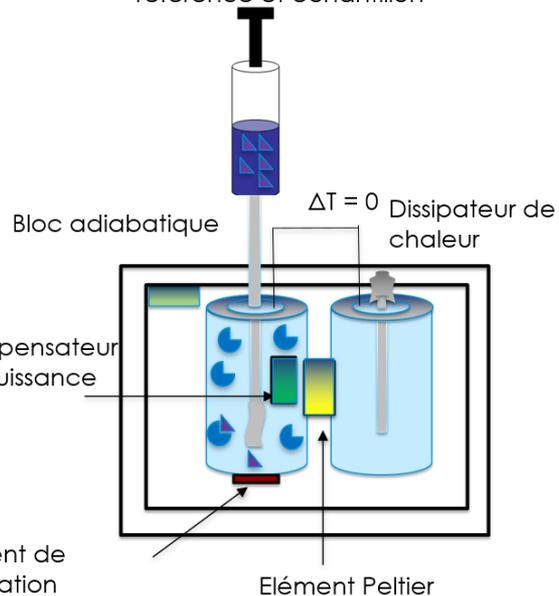
# Rappels technologiques – Nano ITC

- Le mot ITC est l'acronyme anglais pour Isothermal Titration Calorimeter
- L'ITC est une technique de calorimétrie isotherme dans laquelle nous allons quantifier l'affinité entre deux molécules à une température donnée
- La mesure se fait par injections successives d'un milieu dans un autre
- Cellules de 190  $\mu\text{l}$  ou 1 mL en Or (degré d'oxydation 0) (pour tous les pH) ou aussi en hastelloy
- Design des cellules en tube pour limiter la vitesse d'agitation (75 rpm suffisent)
- Possibilité de système manuel, semi-auto ou tout automatisé
- Cela permet de déterminer :
  - $\Delta H$ ,  $K_d$ ,  $K_a$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ , stoechiométrie,
  - $\Delta C_p$ ,  $\Delta[\text{H}^+]$ ,
  - Constantes cinétiques :  $K_m$ ,  $k_{\text{cat}}$



- L'ITC à l'instar de la Nano DSC fonctionne par compensation de puissance

L'instrument fournit de l'énergie ou en absorbe pour maintenir  $\Delta T$  constant entre la cellule référence et échantillon

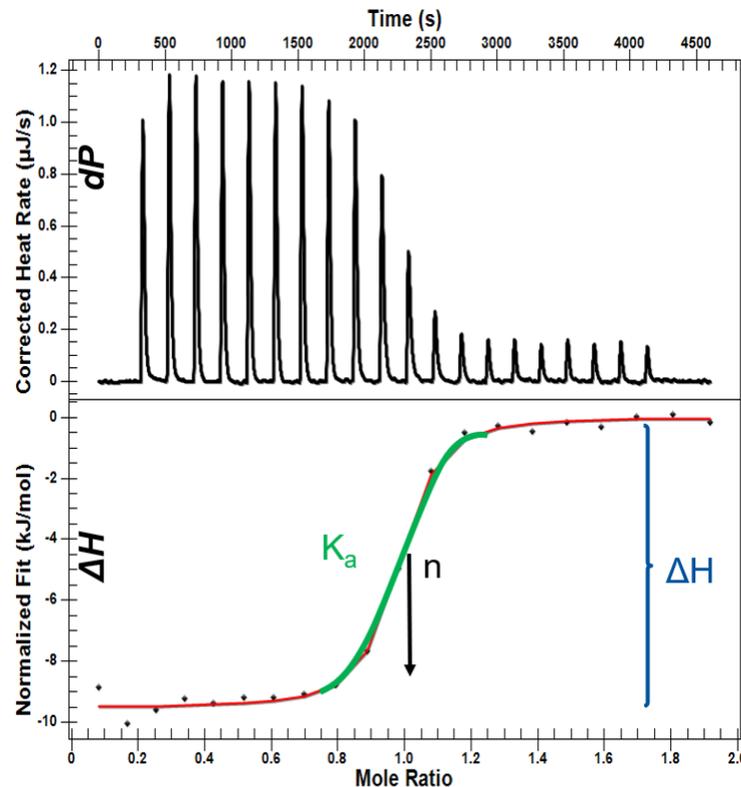




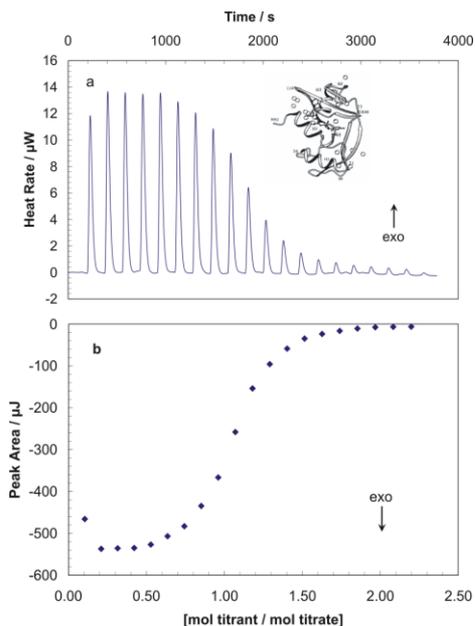
- Le flux de chaleur augmente proportionnellement avec la création du complexe [PL] et diminue au fur et à mesure que le nombre de sites disponibles P diminue

$$\Delta q = \Delta[PL] \Delta H^\circ V_{\text{cell}}$$

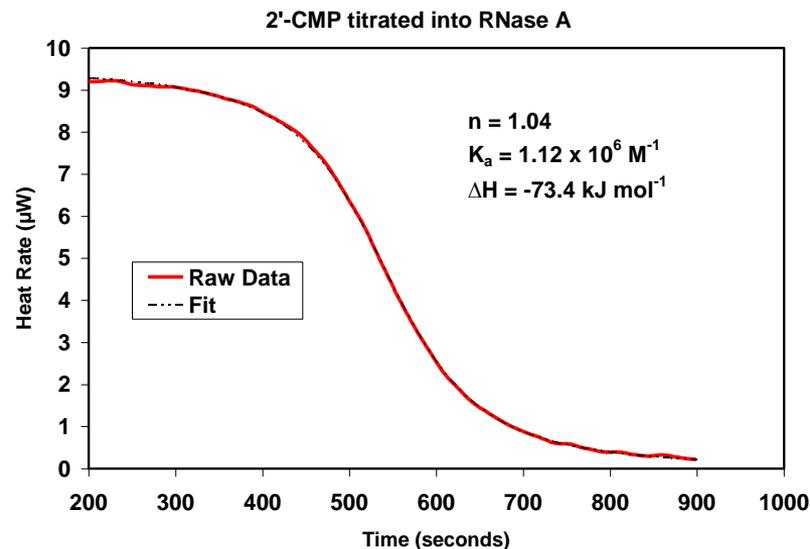
- Nous déterminons  $K_a$  par modélisation
- La modélisation nous informe sur
  - La stœchiométrie
  - La constante d'affinité
  - Enthalpie ( $\Delta H_{\text{ITC}}$ )
- Paramètres Thermodynamiques :
  - $\Delta G = -RT \ln(K_a)$
  - $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$



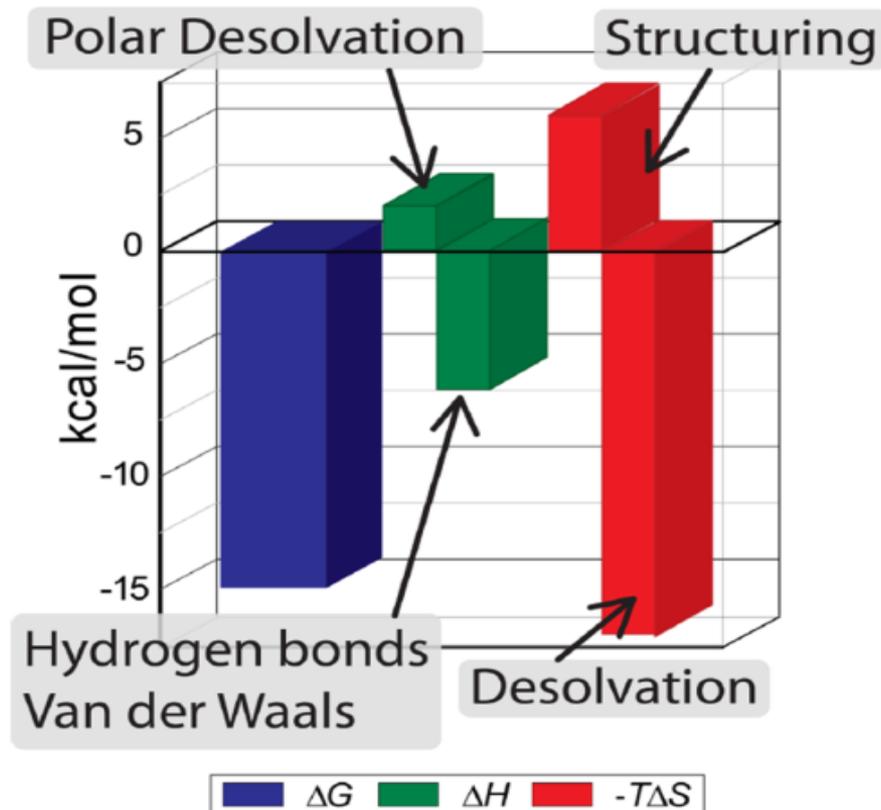
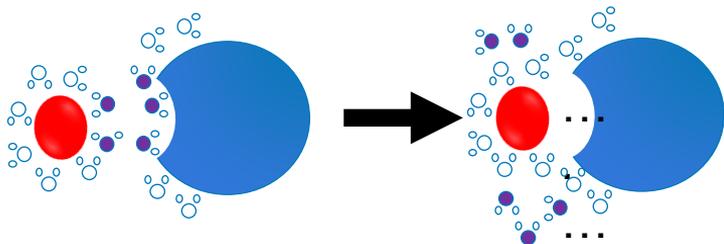
- Plusieurs types d'essais sont réalisables
  - Par incréments : Test classique / Compétition (A+B puis on injecte C pour obtenir A+C)



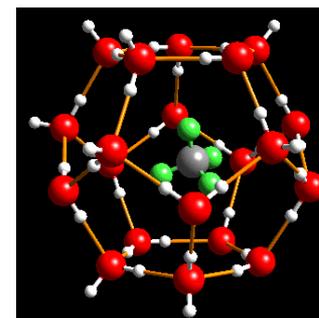
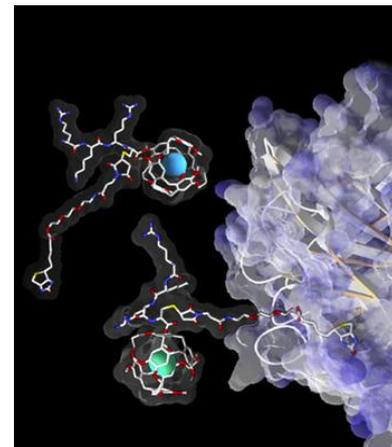
- Par injection continue



- L'ITC permet de déterminer les mécanismes mis en jeu en étudiant si la réaction est guidée par l'enthalpie ou l'entropie



- Deux molécules interagissent de façon **non-covalente** par les groupes ou les terminaisons hydrophobes.
- La **spécificité** augmente avec la complémentarité de la forme et de la polarité, les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques, etc.
- L'interaction a la fois une composante **enthalpique** et une composante **entropique**.
- **Enthalpique**: augmentation des liaisons hydrogène, des forces de van der Waals, des paires électrostatiques, etc.
- **Entropique**: changements de conformation (généralement défavorable) et libération d'eau liée quand les groupements hydrophobes interagissent (très favorable).
- Pour que deux molécules se lient, elles doivent avoir plus d'affinité entre elles que chacune pour le solvant.

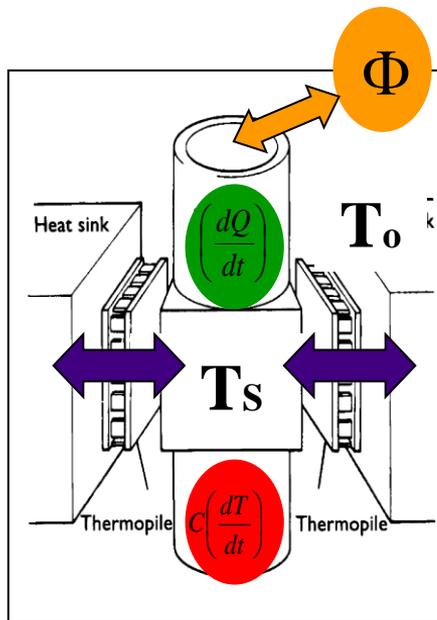


- Le Thermal Activity Monitor (TAM IV) est un calorimètre isotherme très polyvalent permettant de nombreux types d'essais en ampoules fermées ou ouvertes

- Essais de stabilités
- Essais de compatibilité
- Essais sur les batteries
- Essais de Titration isotherme
- Cinétiques de réaction
- Amorphicité
- Polymorphisme
- Réticulation
- Essais de sécurité (explosifs)
- Croissance de microorganismes
- Etc ....



- Fonctionnement du TAM



Après calibration :

## Equation générale

$$\frac{dQ}{dt} = \Phi + C \left( \frac{dT}{dt} \right)$$

Chaleur produite =  $\underbrace{\text{Echange de chaleur}}_{\text{Propriété mesurée}} + \text{Chaleur accumulée}$

Flux de chaleur  
(dQ/dt)

=

Flux de chaleur  
mesuré par le TAM

- Equation du flux de chaleur du TAM

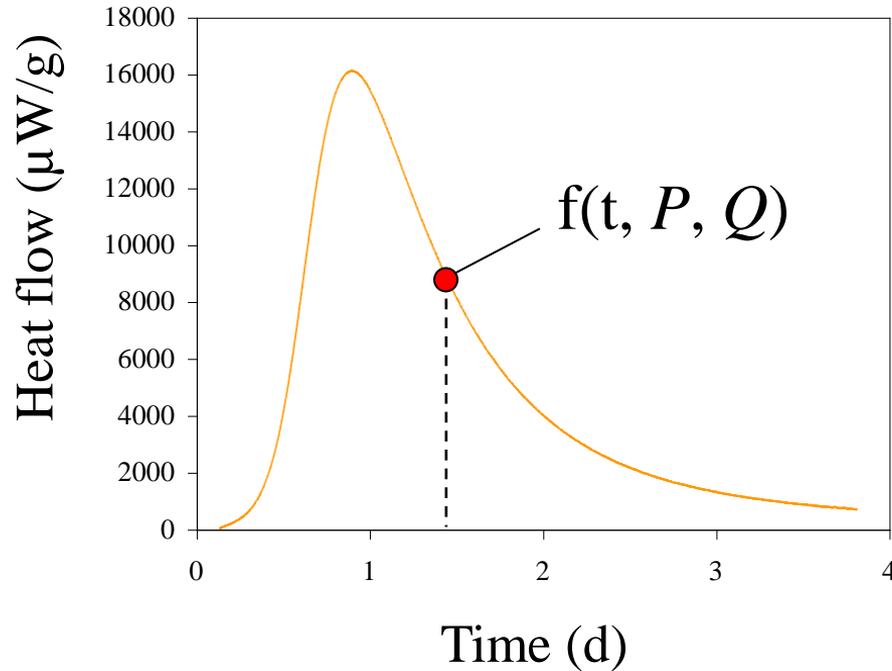
$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H \cdot k \cdot f(c) = \text{Flux de chaleur déterminé par le TAM}$$

Enthalpie →  
Information  
thermodynamique

Taux de réaction →  
Information  
cinétique

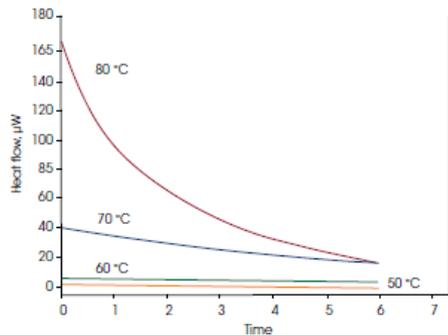
Concentration →  
Information  
analytique

- On étudie un flux de chaleur différentiel en fonction du temps (parfois plusieurs jours) pour déterminer une réaction

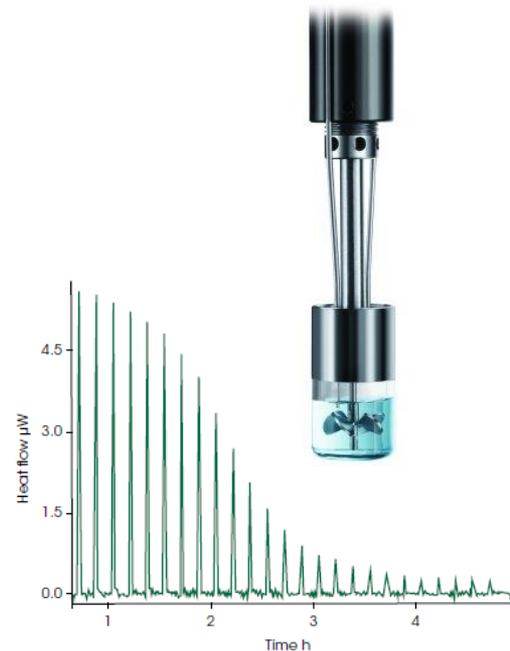


## ▪ Essais statiques

- Stabilité
- Compatibilité (principe actifs / excipients par exemple)
- Cinétiques de réaction
- Amorphicité
- Polymorphisme
- Réticulation
- Essais de sécurité
- Croissances de microorganismes



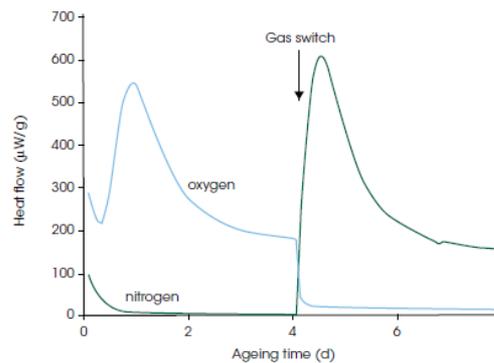
- Essais de titration ITC
  - Constante d'affinité, stoechiométrie et thermodynamique
  - Formations de complexes
  - Détermination de cmc
  - Cinétiques enzymatiques
  - Enthalpie de mélange
  - Cinétiques de dissolution
  - Absorption
  - Cinétiques de réaction
  - Effet de principe actifs
- Par rapport aux ITC standards le volume est plus élevé (4 mL) et permet de travailler sur des suspensions



# Rappels technologiques – Type d'essais

- Perfusion de gaz ou liquide

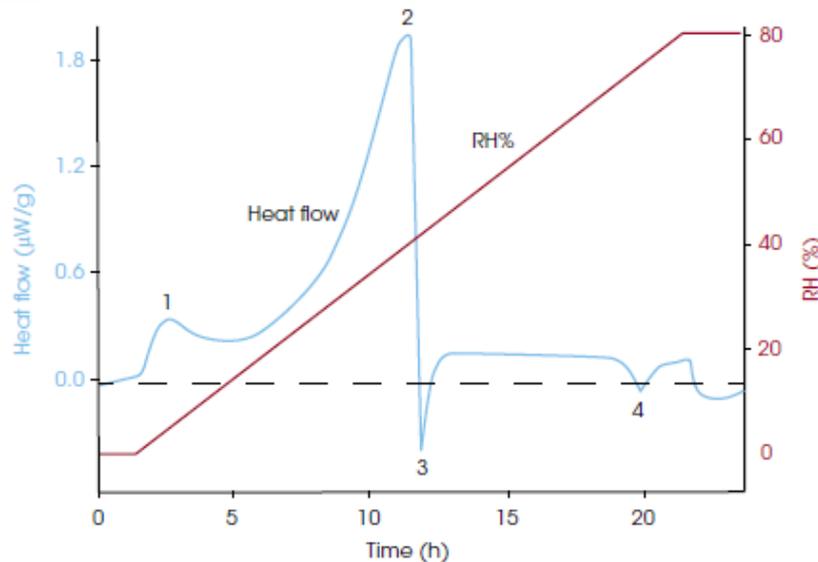
- Stabilité
- Compatibilité
- Absorption
- Cinétiques de réaction
- Oxydation
- Essais de sécurité
- Hydratation
- Métabolisme d'organismes



# Rappels technologiques – Type d'essais

- Essais en humidité relative

- Amorphicité
- Polymorphisme
- Stabilité
- Compatibilité
- Cinétiques de réaction
- Absorption
- Essais de sécurité
- Hydratation

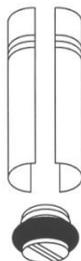


- Essais de dissolution (Sol/cal)

- Chaleur de dissolution
- Chaleur d'humidification
- Amorphicité
- Polymorphisme
- Cinétique de dissolution



Ampoule de microsolution  
(échantillon solide)



Solution Calorimeter (SolCal)  
(échantillons solides ou liquides)

## Applications – ITC, DSC , TAM

**TA Instruments France, une division de WATERS SAS**

Jacques Loubens : [jloubens@tainstruments.com](mailto:jloubens@tainstruments.com)  
Frédéric Hoppenot : [fhoppenot@tainstruments.com](mailto:fhoppenot@tainstruments.com)



# Applications – Caractérisation des virus et leurs interactions

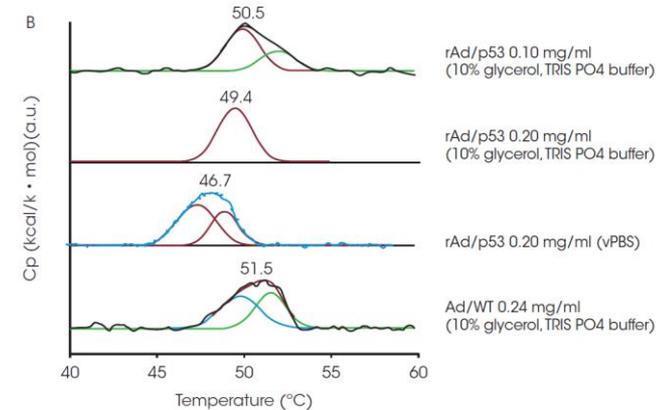
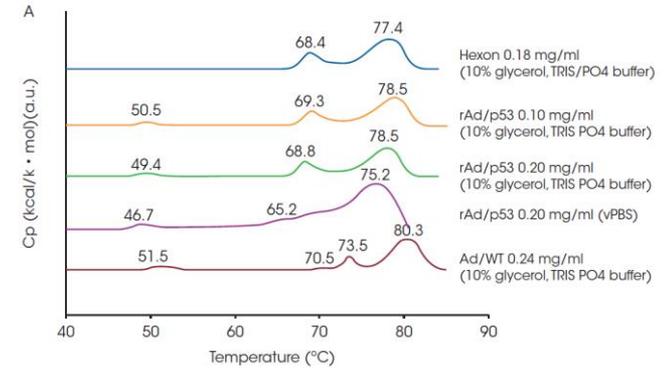
TA Instruments France, une division de WATERS SAS

Jacques Loubens : [jloubens@tainstruments.com](mailto:jloubens@tainstruments.com)  
Frédéric Hoppenot : [fhoppenot@tainstruments.com](mailto:fhoppenot@tainstruments.com)

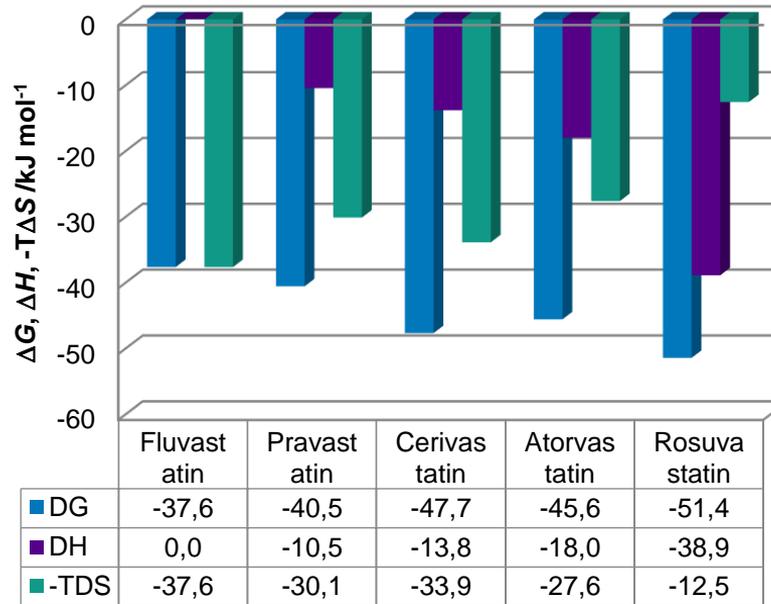


# Caractérisation des virus et leurs affinités par DSC

- Les protéines dans lesquelles sont les virus ont généralement deux pics observables en DSC
- Ces protéines étant sensibles au pH, si l'on modifie le pH, la température de ces pics évolue. Souvent elle est plus stable à pH bas (ainsi le virus lors de l'ingestion est plus résistant)
- La figure A. montre un essai DSC à 1°C/min d'hexon (protéine purifiée seule), un virus mutant (rAd/p53) à deux concentrations dans des tampons différents et un virus à l'état natif (Ad/WT)
- Nous observons que le virus natif donne quatre endothermes alors que le virus muté donne seulement trois endothermes
- Nous observons également que le milieu dans lequel se trouve le virus muté influe également sur la stabilité de celui-ci
- Dans la figure B nous étudions la déconvolution du pic vers 50°C qui est caractéristique du virus en lui-même. En complément avec d'autres analyses nous en déduisons que cette transition correspond à la dissociation du virus en protéines et acides nucléiques
- Cette transition à 50°C est non réversible, et nous observons également dans cette figure B que le processus est dépendant du milieu dans lequel se trouve le virus et sa concentration



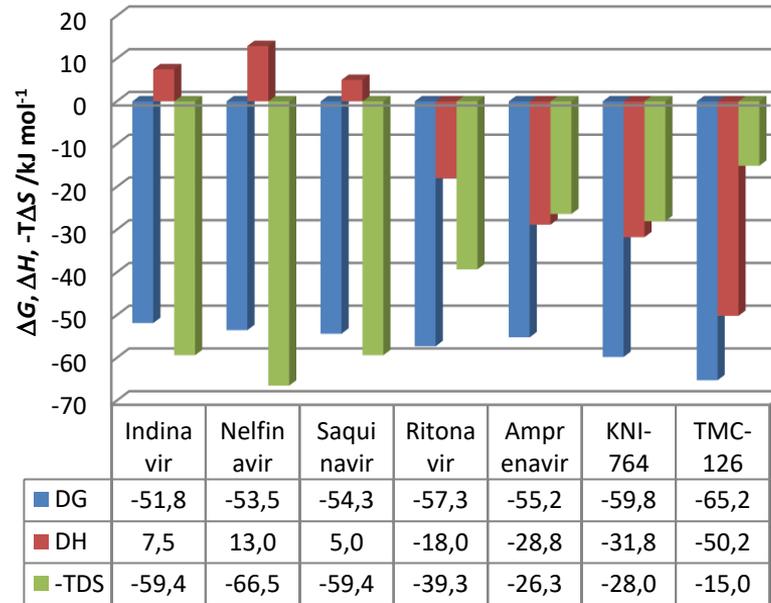
- Des profils thermodynamiques complets des deux classes de produits pharmaceutiques suivantes ont été publiées :
  - L'évolution des statines. Inhibiteurs de la HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthyl glutaryl coenzyme A réductase), une enzyme de la voie de biosynthèse du cholestérol. Le rôle des inhibiteurs est de réduire l'activité enzymatique et donc le taux de cholestérol dans le plasma.  
*Ref: Carbonell and Freire (2005) Biochemistry 44.*
  - L'évolution des inhibiteurs de la protéase du VIH-1. Le but des inhibiteurs est de se lier fortement et sélectivement au site actif de la protéase et ainsi de diminuer ou de désactiver le pouvoir catalytique de l'enzyme.  
*Ref: Ohtaka et al (2002) Protein Science 11.*



## Profils thermodynamiques de quelques statines

Affinités de quelques statines (qui abaissent le cholestérol) avec la HMG-CoA reductase.

L'évolution vers une spécificité plus élevée est liée à une augmentation de la contribution enthalpique



## Profils thermodynamiques de quelques proteases inhibitrices de HIV-1

Profils thermodynamiques d'affinité de 5 protéases inhibitrices approuvées par la FDA et deux inhibiteurs de deuxième génération (KNI-764 and TMC-126) avec le HIV-1.

- Les différentes classes de produits pharmaceutiques pour lesquelles des informations thermodynamiques complètes sont disponibles suggèrent que l'évolution des composés sur plusieurs années ou décennies avec la motivation d'une meilleure puissance, d'une plus grande sélectivité, d'une meilleure pharmacocinétique etc. évolue également dans le sens d'une affinité plus élevée ( $K_d$  0,5  $\mu$ M à 2 nM pour les statines et 2 nM à 10 pM pour les protéases du VIH-1).
- Les études de cas révèlent également que si l'affinité augmente de plusieurs ordres de grandeur, la contribution entropique à la liaison devient moins favorable.
- La contribution de l'augmentation d'affinité est donc due à une meilleure optimisation enthalpique des médicaments à mesure qu'ils deviennent plus efficaces.
- .. alors pourquoi ne pas optimiser d'un point de vue enthalpique les médicaments dès le début?

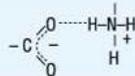
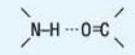
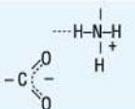
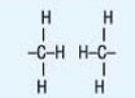
# Applications – Stabilité des biomolécules en solution

**TA Instruments France, une division de WATERS SAS**

Jacques Loubens : [jloubens@tainstruments.com](mailto:jloubens@tainstruments.com)  
Frédéric Hoppenot : [fhoppenot@tainstruments.com](mailto:fhoppenot@tainstruments.com)

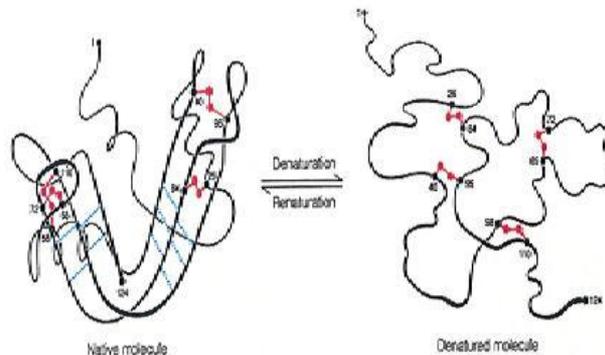


# Comment la Structure des Protéines est-elle stabilisée ? Waters™ |

Chemical Interactions that Stabilize Polypeptides				
Interaction	Example	Distance dependence	Typical distance	Free energy (bond dissociation enthalpies for the covalent bonds)
Covalent bond	$-C_{\alpha}-C-$	-	1.5 Å	356 kJ/mole (610 kJ/mole for a C=C bond)
Disulfide bond	$-Cys-S-S-Cys-$	-	2.2 Å	167 kJ/mole
Salt bridge		Donor (here N), and acceptor (here O) atoms <3.5 Å	2.8 Å	12.5–17 kJ/mole; may be as high as 30 kJ/mole for fully or partially buried salt bridges (see text), less if the salt bridge is external
Hydrogen bond		Donor (here N), and acceptor (here O) atoms <3.5 Å	3.0 Å	2–6 kJ/mole in water; 12.5–21 kJ/mole if either donor or acceptor is charged
Long-range electrostatic interaction		Depends on dielectric constant of medium. Screened by water. 1/r dependence	Variable	Depends on distance and environment. Can be very strong in nonpolar region but very weak in water
Van der Waals interaction		Short range. Falls off rapidly beyond 4 Å separation. 1/r <sup>6</sup> dependence	3.5 Å	4 kJ/mole (4–17 in protein interior) depending on the size of the group (for comparison, the average thermal energy of molecules at room temperature is 2.5 kJ/mole)

- La plupart des protéines sont présentes en solution dans l'eau. Environ 30% se trouvent dans les membranes
- Rôle des interactions hydrophobes : les amino acides lipophiles d'une protéine s'éloignent de l'eau en se plaçant vers le centre de la structure
- L'eau environnant la protéine est moins libre que l'eau du milieu

# Dénaturation Simple



Protéine Native (N)  $\leftrightarrow$  Protéine Dénaturée (U)

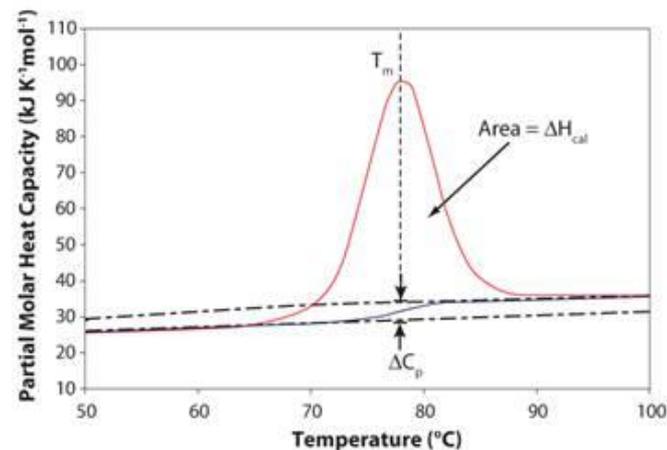
$$K(T) = \frac{U}{N}$$

$$\Delta G = -RT \ln K$$

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

# Thermogramme de Dénaturation Simple

- L'aire sous le pic est l'**enthalpie** ( $\Delta H$ ) de la dénaturation. Elle est liée à la rupture des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes.
- La variation de **capacité calorifique** ( $\Delta C_p$ ) est déterminée à partir du décalage de ligne de base entre avant et après le pic. Il reflète essentiellement l'exposition des groupes hydrophobes.



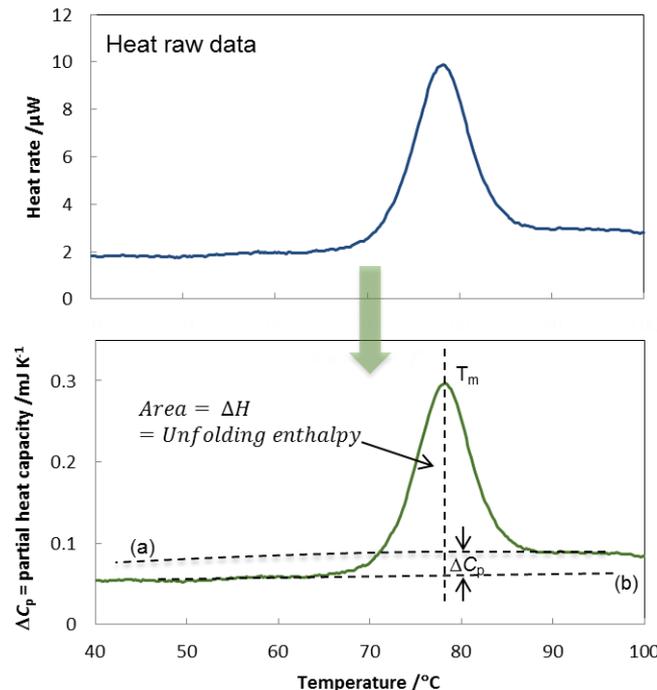
- Le point du milieu du pic de dénaturation (T<sub>m</sub>) est la température à laquelle la moitié des molécules se sont dépliées. Indication de la stabilité thermique.
- La DSC est la seule technique qui permet la mesure directe de T<sub>m</sub>, ΔC<sub>p</sub> et ΔH.
- A partir des valeurs mesurées, il est possible de calculer l'entropie (ΔS quantification du désordre moléculaire) et l'énergie libre (ΔG).

## Etude d'une dénaturation de protéine par DSC

- Résultats d'une mesure DSC de Lysozyme HEW, une protéine de 14 kDa
- Le graphique supérieur montre la vitesse de chauffage différentielle en fonction de la température et le graphique inférieur le  $C_p$  partiel de la protéine selon l'équation

$$\Delta C_p = \text{flux de chaleur} / \text{vitesse de chauffage}$$

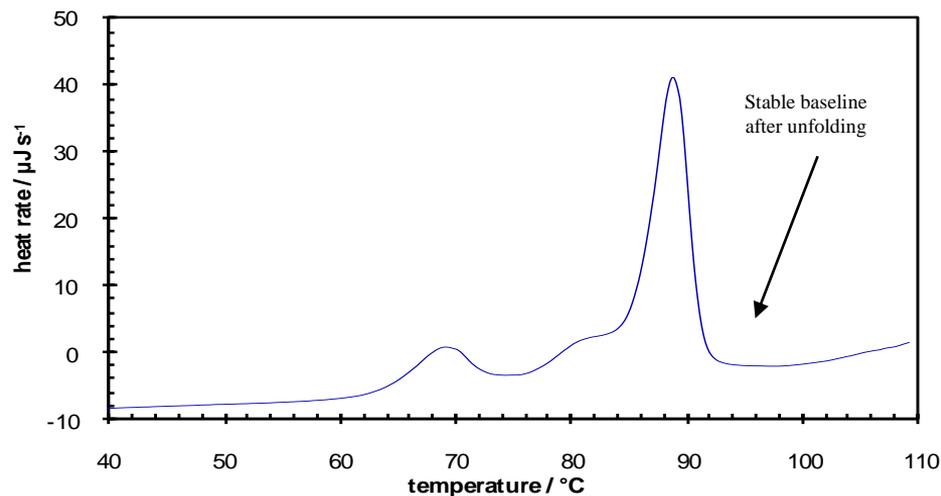
- Le point médian de la transition est défini comme la «température de transition»  $T_m$ , qui correspond au point auquel les molécules restent la moitié de leur temps dans leur état replié et la moitié du temps dans leur état déplié
- L'aire sous le pic correspond à la variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) de la transition souvent appelé variation d'enthalpie calorimétrique
- Les lignes pointillées représentent le  $C_p$  de l'état natif (b) et de l'état déplié (a). Le changement de capacité calorifique,  $\Delta C_p$ , dû à la transition est obtenu comme la différence de capacité calorifique à  $T_m$ .
- L'aire sous le pic correspond à l'enthalpie consommée pour la transition



A DSC trace of 42  $\mu\text{g}$  Lysozyme (conc. 0.14 mg/ml) in glycine buffer at pH 4. The horizontal dotted lines represent the heat capacity functions of the unfolded state (a) and native state (b).

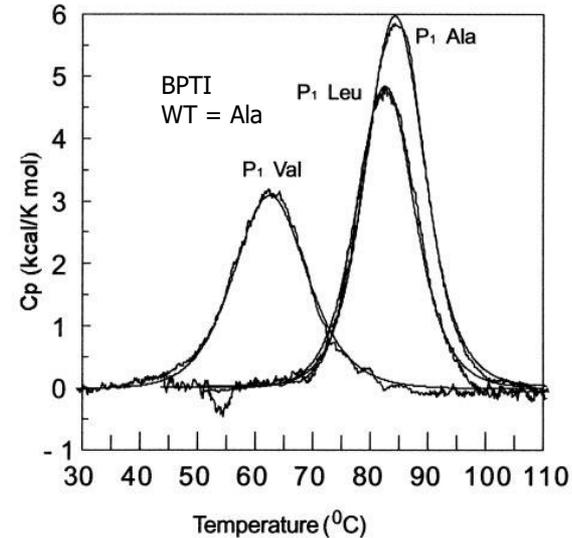
# Avantages de la Cellule Capillaire

Résultat obtenu avec une Nano DSC  
Cellule Capillaire continue



Anticorps monoclonal humain IgG1 purifiée en tampon physiologique; 0.5 mg/ml

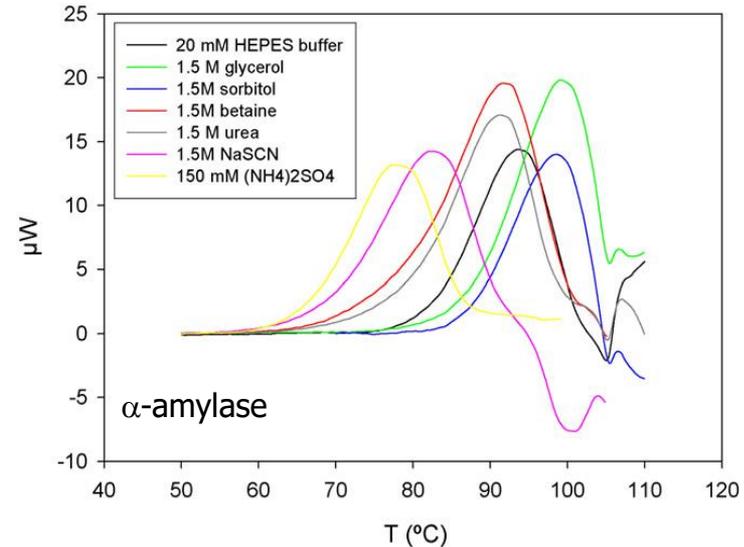
- Faire muter une protéine peut la rendre plus stable, plus spécifique, lui donner de nouvelles propriétés, etc.
- Constituer une base de données de protéines caractérisées thermodynamiquement peut permettre de prédire le résultat d'une éventuelle mutation.
- Les interactions peuvent être complexes. Des variations enthalpiques (modifications d'interactions hydrophobes ou électrostatiques, liaisons hydrogène), peuvent être compensées par des changements entropiques (modifications de l'état d'hydratation, de liberté conformationnelle).



Grzesiak *et al.*, *J. Mol. Bio.* **301**, 205-217, 2000

- Comme  $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ , la transition se produit quand  $T \Delta S$  augmente suffisamment (par absorption de chaleur) pour surmonter les interactions enthalpiques stabilisatrices.
- La transition de dénaturation est endothermique.

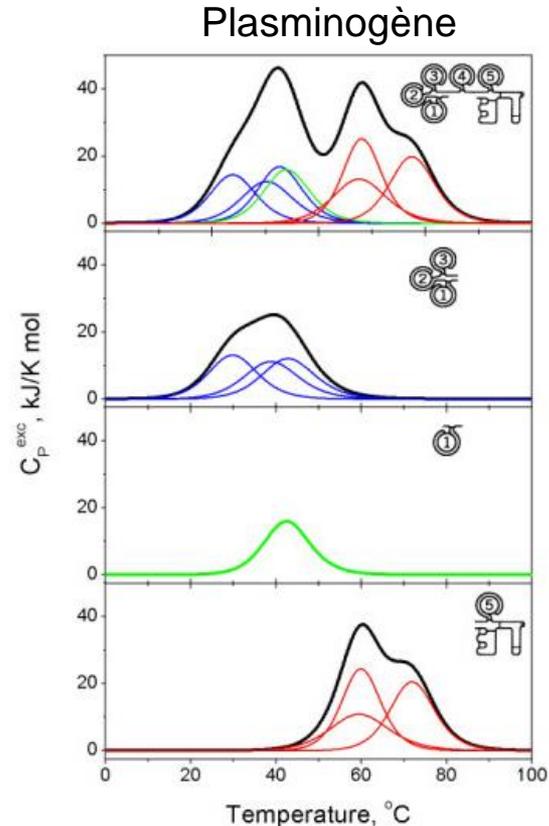
- Les protéines étudiées en développement pharmaceutiques ou en applications industrielles doivent être stabilisées vis-à-vis des dégradations physico chimiques.
- Le choix d'un additif ou d'une formulation est parfois empirique.
- La DSC est une technologie rapide pour évaluer l'influence des additifs sur le  $T_m$ , et la réversibilité.



Olsen et al., *Thermochimica Acta*, **484**, (2009), 32-37

# Structure et Domaines

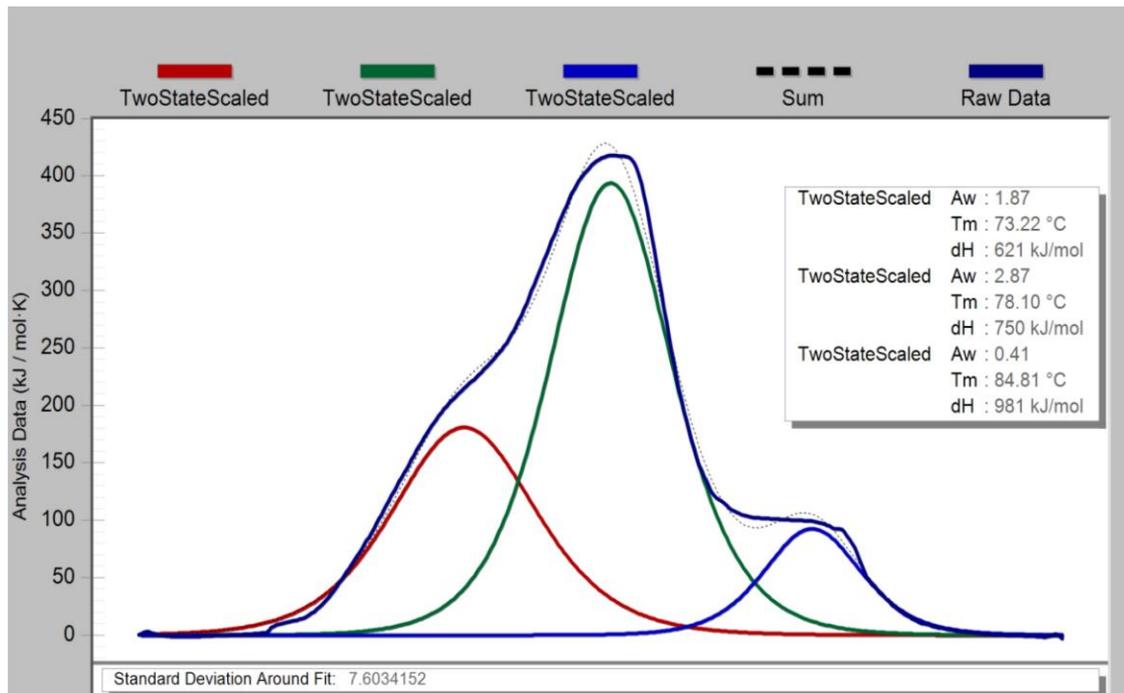
- La structure du plasminogène (PM=83,000 Da) est organisée en 7 domaines coopératifs qui se dénaturent indépendamment sur différentes plages de température
- Déconvolution des profils de dépliement avec le modèle Two State scaled
- L'enthalpie et la température sont les paramètres thermodynamiques spécifiques de chaque domaine, et de la dépendance de leur fonctionnalités respectives



\* Peter L. Privalov and Anatoly I. Dragan, 2006

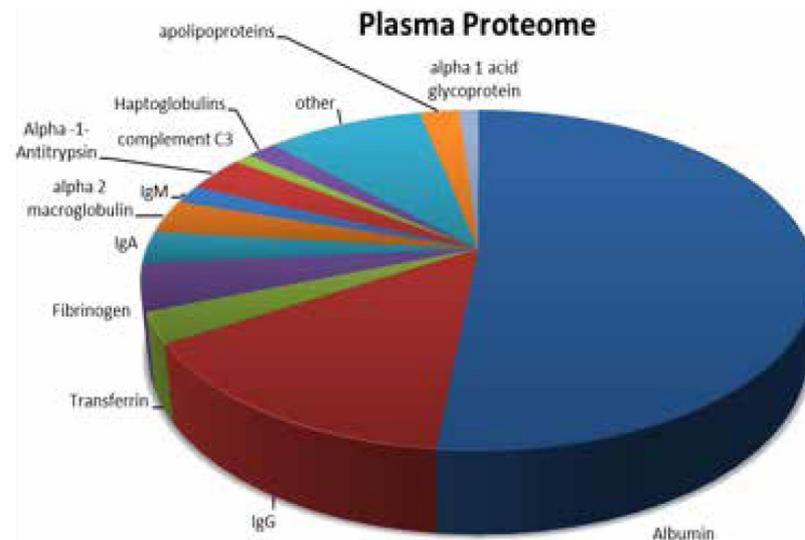
## Exemple 1 : Etude d'un anticorps IgG par DSC

- En bleu foncé nous avons le thermogramme brut
- Pour déconvoluer proprement le signal il a fallu additionner les modèles (on en a déduit trois domaines différents)
  - En rouge : CH2
  - En vert : le Fab (fragment antigen binding)
  - En bleu : CH3
- Pour comparer les contributions il faut les normer par le calcul suivant :  $\text{Contribution} = A_w \times \Delta H$ 
  - 58% de l'énergie provient du déploiement de la partie Fab



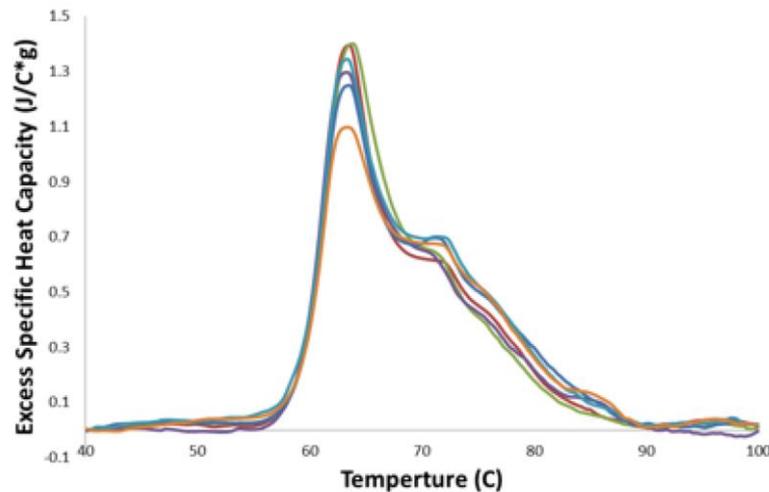
## Exemple 2 : Etude d'échantillons biologiques complexes

- Le plasma est composé d'environ 3000 protéines
- 90% d'entre elles correspondent à 12 catégories
- Voici une répartition moyenne des protéines du protéome plasmatique
- Si la proportion de l'une d'entre elles est trop forte, cela peut être le marqueur d'une maladie (taux d'albumine trop élevé par exemple)
- Certains peptides ou protéines peuvent contenir de nombreux biomarqueurs



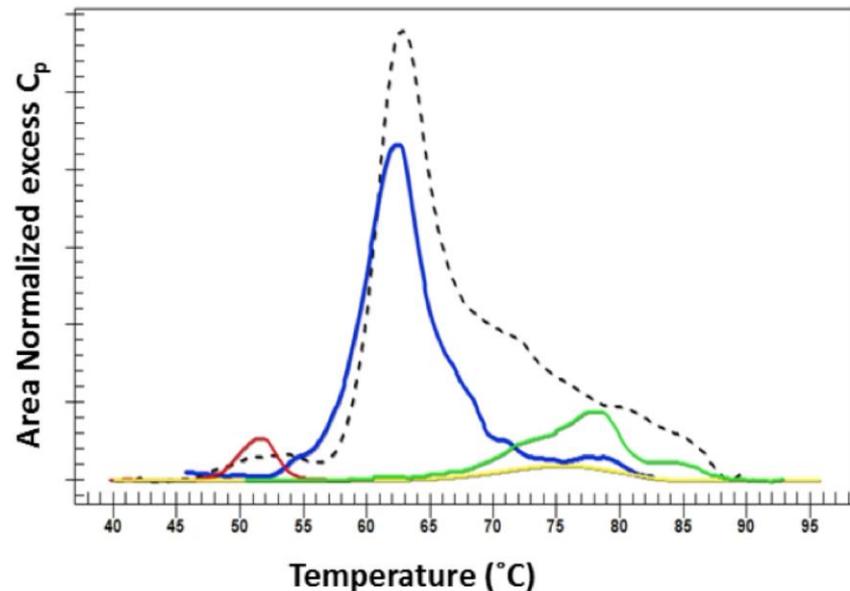
## Exemple 2 : Etude d'échantillons biologiques complexes

- Contrairement à l'étude d'une protéine simple, l'étude d'un serum complexe donne des thermogrammes complexes à déconvoluer
- Chaque thermogramme d'un serum, plasma ou autre formule complexes est la somme des thermogrammes des composants de ce milieu
- La hauteur de chaque pic correspond à l'abondance du composant
- Chaque liaison entre les composants va également affecter le thermogramme final
- En général on établit le profil thermique d'un plasma ou d'un serum sain auquel on va comparer d'autres échantillons
- Dans la courbe à droite, il y a les thermogrammes des serums de 6 patients sains (3 hommes et 3 femmes)



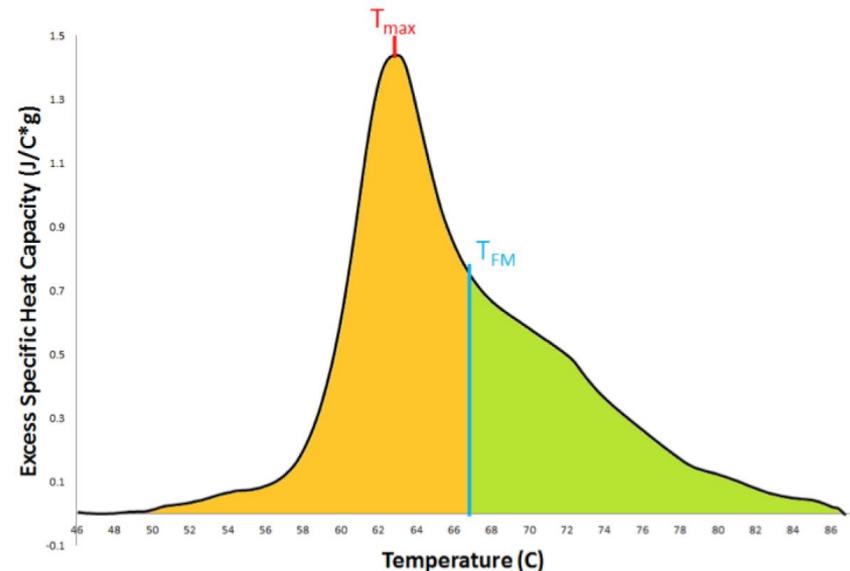
## Exemple 2 : Etude d'échantillons biologiques complexes

- En pointillés nous observons le thermogramme complet
- On essaye ensuite de le déconvoluer grâce aux thermogrammes des protéines les plus abondantes, nous pouvons retrouver
  - Rouge : Fibrinogène
  - Bleu : Albumine
  - Vert : Immunoglobuline IgG
  - Jaune : Immunoglobuline IgA
- Cela nous permet d'identifier les pics majeurs du thermogramme complet



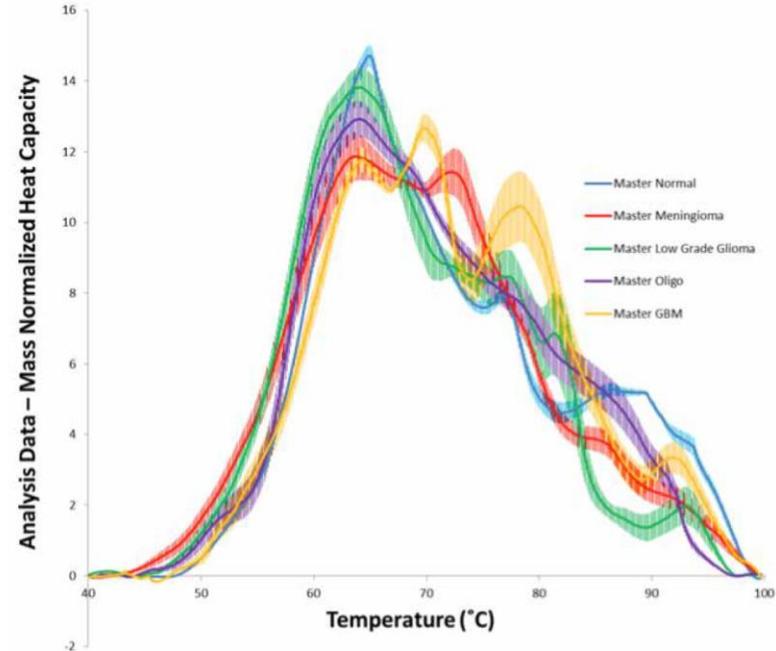
## Exemple 2 : Etude d'échantillons biologiques complexes

- Chez les patients malades nous observons des différences avec le thermogramme d'un serum de patient sain
- Nous observons principalement chez les patients malades une augmentation de l'aire du thermogramme aux températures plus élevées (aire verte)
- Pour bien expliquer cela et le mettre en évidence nous relevons la température  $T_{fm}$  qui correspond à la température de moitié de l'aire totale
- La partie en jaune représente la première moitié de l'aire totale et la verte la seconde moitié
- Le thermogramme présenté est celui d'un serum de patient sain. Si l'on avait un thermogramme de serum de patient malade,  $T_{max}$  serait moins élevée en amplitude et  $T_{fm}$  se décalerait vers une température plus haute (ex: taux d'albumine qui diminue et les immunoglobulines augmentent)



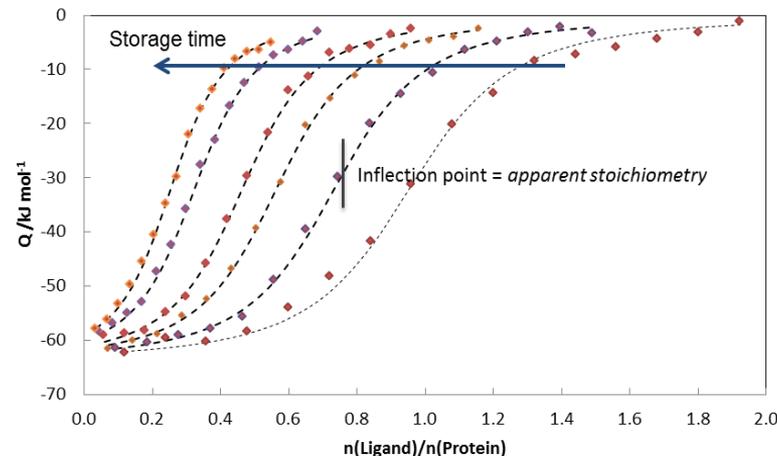
## Exemple 2 : Etude d'échantillons biologiques complexes

- Ici nous étudions les thermogrammes de fluide cérébro-spinal de patients atteints d'une tumeur au cerveau
- La DSC a été utilisée pour séparer les cas néoplasiques et non-néoplasiques et dans les cas néoplasiques les carcinomatoses méningées provenant des cellules neurales et non neurales et les glioblastomes multiformes (GBM)
- Les thermogrammes obtenus ont été corrélés avec une classification des tumeurs
- Ainsi en étudiant les 4 pics avec leurs valeurs respectives  $T_m$ , enthalpie ( $\Delta H$ ) et leur proportions ( $A_w$ ) il est possible d'identifier le type de tumeur à l'aide du thermogramme



*Thermogrammes moyens de tissus du cerveau cancéreux et tissus normaux*

- Les protéines ont généralement des durées de vie relativement courtes car elles ont tendance à être piégées de manière irréversible dans un état inactif en raison de l'agrégation, de la protéolyse, etc.
- Lorsqu'une protéine perd son activité, elle perd normalement également sa capacité à se lier sélectivement à un ligand. Ceci fournit la base pour l'utilisation de l'ITC pour évaluer la dégradation des protéines.
- La stœchiométrie apparente ou le point d'inflexion de la courbe de titrage se déplace vers des valeurs plus basses avec le temps à mesure que la protéine se dégrade.



ITC protein-ligand binding curves at different storage times. The inflection point correspond to the apparent stoichiometry (n) which is proportional to the amount of active protein.

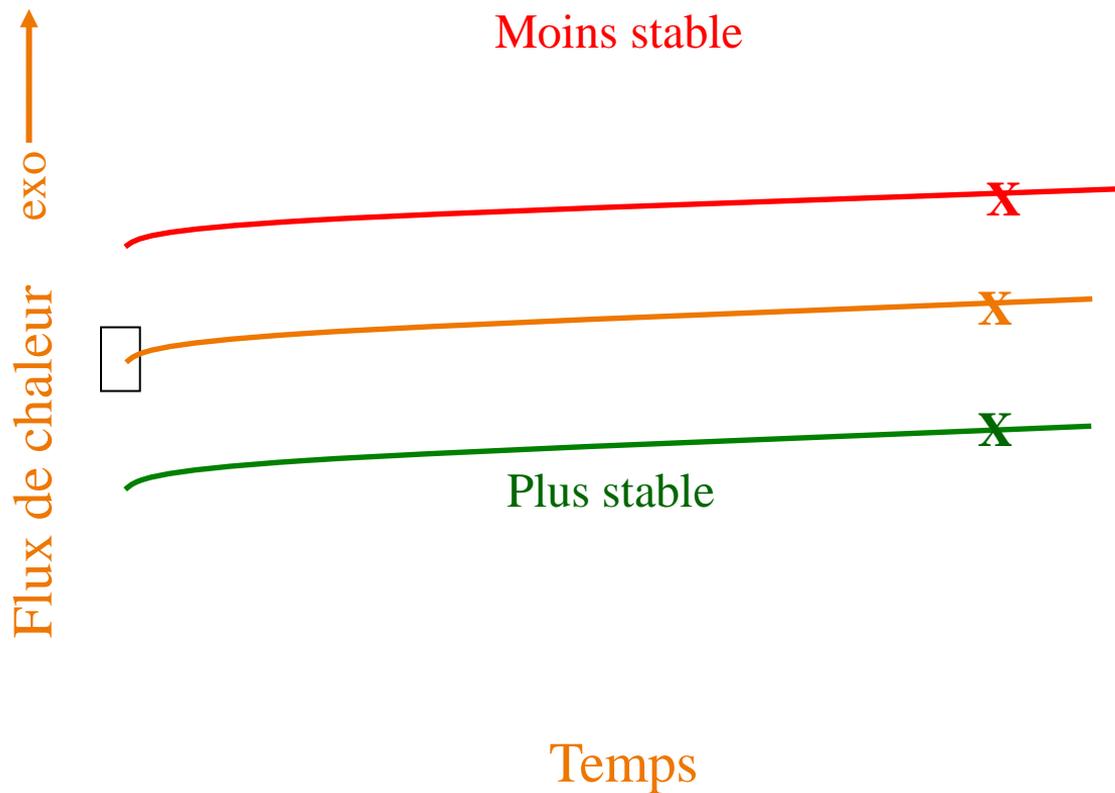
## Applications – Stabilité et compatibilité des solides

**TA Instruments France, une division de WATERS SAS**

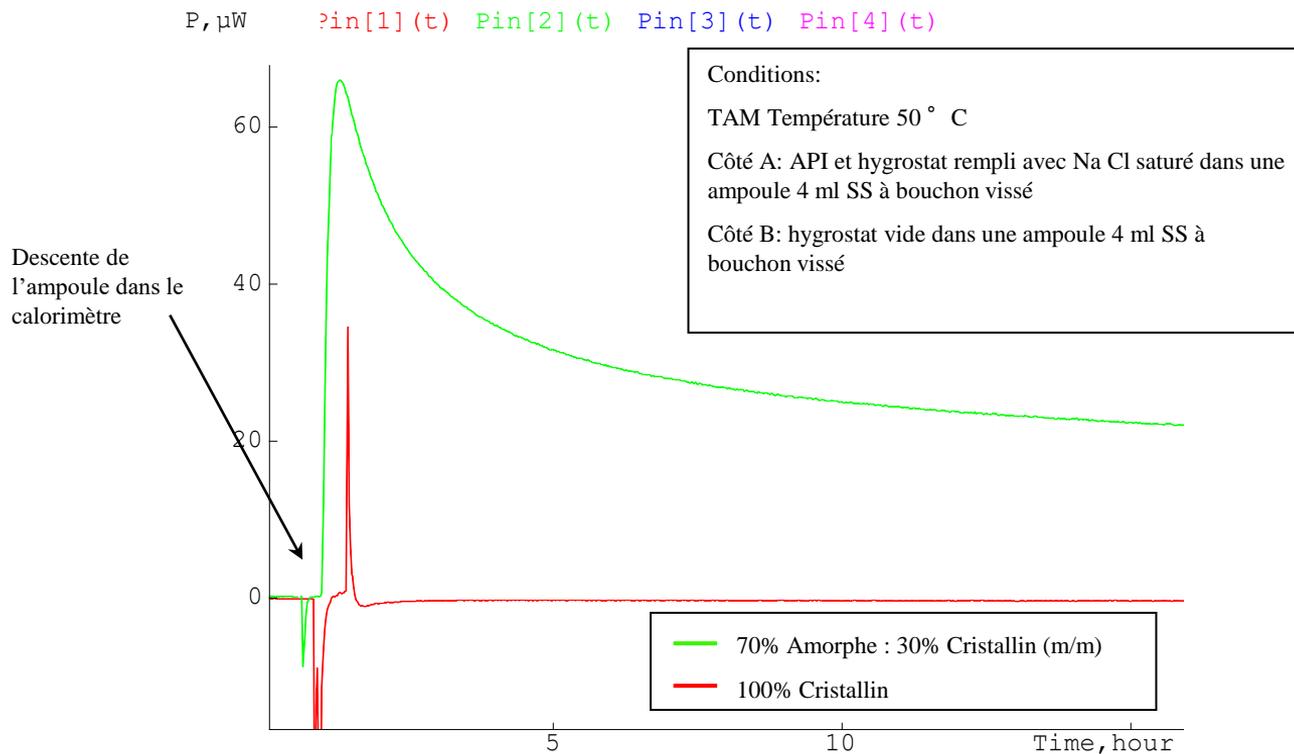
Jacques Loubens : [jloubens@tainstruments.com](mailto:jloubens@tainstruments.com)  
Frédéric Hoppenot : [fhoppenot@tainstruments.com](mailto:fhoppenot@tainstruments.com)

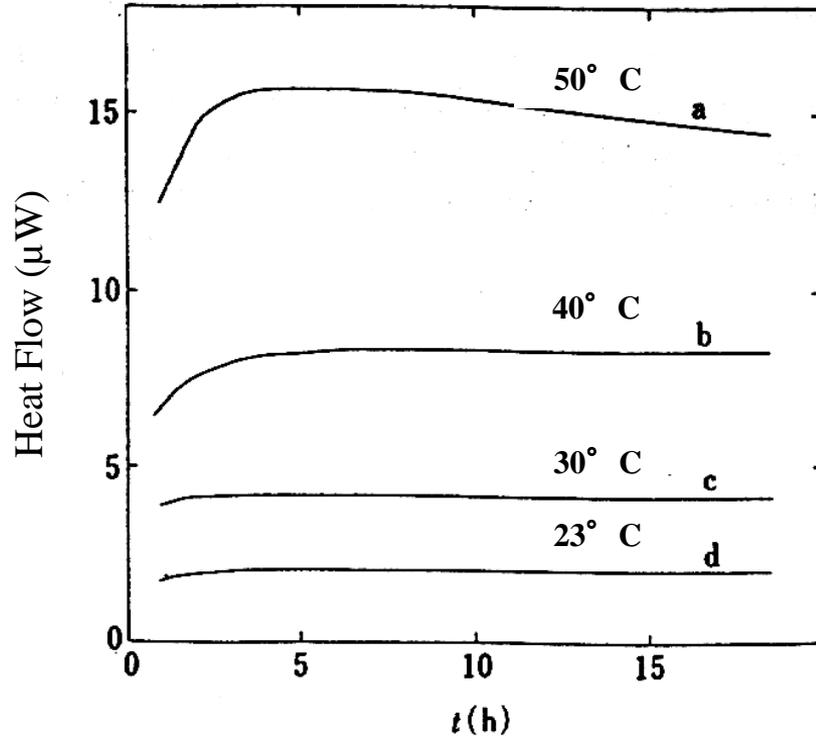


# TAM : Test de Stabilité (test général)



# Stabilité Principe Actif Pharmaceutique (~75% Humidité Relative) Waters™





Tomoko Otsuka, Sumie  
Yoshioka, Yukio Aso and  
Tadao Terao, National  
Institute of Hygienic  
Sciences,  
Tokyo, Japan, Chem.  
Pharm. Bull. 42(1) 1994

# Evaluation de la compatibilité

Echantillon simple  
Mélange de 2 composants



**A**

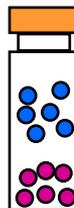


**B**



**Mélange simple**

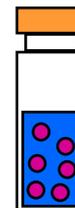
Mélange spécifiques



**Interaction en  
Phase gazeuse**



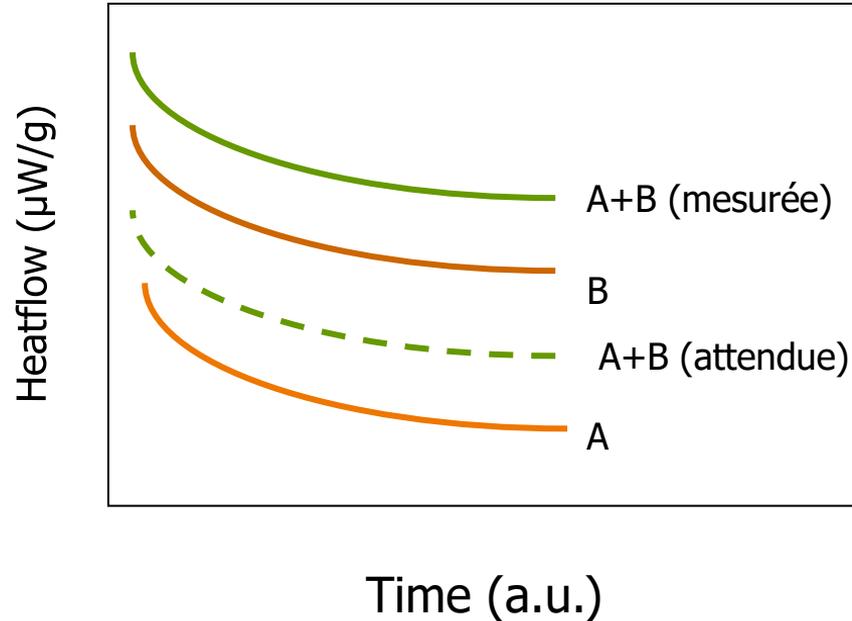
**Zone d'interaction**



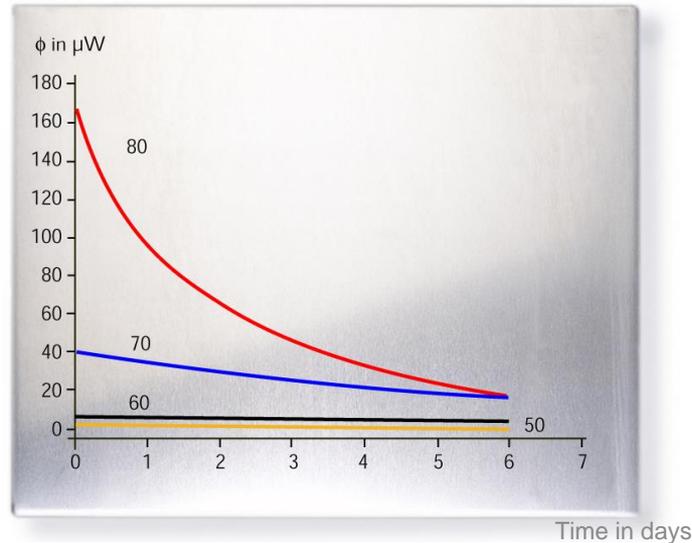
**Exposition plus  
forte**

*By Lars-Gunnar Svensson, Celsius  
Materials CMK, Karlskoga, Sweden*

A+B: mélange 50:50 des composants A et B

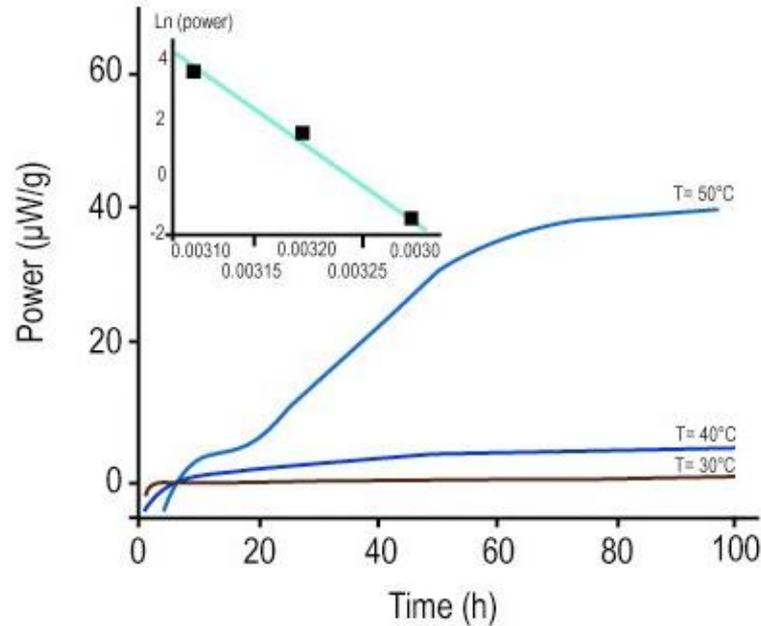


Si la courbe expérimentale de flux de chaleur **A+B (mesurée)** diffère de **A+B (attendue)**, c'est alors une indication que les matériaux interagissent entre eux (et sont incompatibles)



Une autre approche pour les test de compatibilité est de compresser (faire un comprimé) les ingrédients à mélanger. Ce graphe de plusieurs prélèvements du même mélange exposé à différentes températures montre que la vitesse de réaction augmente avec la température.

Selzer, Radau & Kreuter, *Int. J. Pharm.*, 171, 227-241, (1998).



Une approche pour l'étude de compatibilité avec les excipients est d'ajouter de l'eau au mélange en poudre. Le graphe présente la réponse d'une interaction amine-lactose à différentes températures avec des ajouts de 20% d'eau

Schmitt, Peck, Sun & Geoffroy, *Thermochim. Acta*, 380, 175-183, (2001).

A complex network of interconnected nodes and lines in various shades of blue, creating a mesh-like structure that spans the entire background. The nodes are represented by small circles of different sizes and colors (light blue, dark blue, grey), connected by thin lines. The overall effect is a sense of connectivity and data flow.

Waters™



**Merci pour votre attention**