

UNIVERSITE DE LIMOGES
Ecole Doctorale Science-Technologie-Santé
Faculté de Pharmacie
Laboratoire de pharmacie galénique – SPCTS CNRS UMR 6638

Thèse N°

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Matériaux céramiques et traitements de surface

présentée et soutenue par

Emilie CHEVALIER

le 5 décembre 2008

**SPHEROIDES PHOSPHOCALCIQUES POREUX
POUR IMPLANTATION OSSEUSE
ET LIBERATION D'IBUPROFENE**

Intérêt de la granulation humide à haut cisaillement

JURY :

Monsieur le Professeur Didier BERNACHE-ASSOLLANT

Examineur

Monsieur le Professeur Jean-Michel BOULER

Rapporteur

Madame le Professeur Dominique CHULIA

Directeur de thèse

Madame le Professeur Brigitte EVRARD

Rapporteur

Madame Marylène VIANA

Co-directeur de thèse

« C'est en s'opposant qu'on arrive à se constituer »

Laurent Cantet

A mes parents

A mon frère et mes sœurs

A Fabrice

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Madame le Professeur Dominique Chulia, mon directeur de thèse, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de pharmacie galénique et de m'avoir, une nouvelle fois, fait bénéficier de son savoir.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Marylène Viana, co-directeur de ma thèse, qui a activement participé à ce travail et m'a apporté ses nombreuses connaissances.

Je tiens à remercier Madame Brigitte Evrard et Monsieur Jean-Michel Bouler de m'avoir fait l'honneur d'accepter être rapporteur de ce travail. Qu'ils soient assurés de mon profond respect.

Je souhaite remercier Monsieur Didier Bernache d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

Merci à Monsieur Eric Champion du SPCTS pour ses discussions enrichissantes sur le thème des biomatériaux.

Je souhaite remercier Monsieur Guillaume Berthout de la société CSM Instruments pour les mesures de forces de rupture.

Merci à Mesdames Lisa Makein et Janie Dubois de la société Malvern pour les mesures de spectrométrie infrarouge et leur aide précieuse dans l'interprétation des résultats.

Je remercie Monsieur Gilles Devidts et Madame Lisette Chomette d'avoir bien voulu me confier leur dispositif Bio-Dis pour la réalisation de mes essais de dissolution.

Je souhaite remercier Monsieur Samir Haddouchi et Monsieur Aymeric Artaud de la société SPS Pharma de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire à Clermont-Ferrand.

Je tiens à remercier Madame Sophie Cazalbou du CNRS CIRIMAT de Toulouse pour son aide précieuse concernant les mesures de porosité.

Merci à Messieurs Jean Battini et Stephan Sigrist de la société Micromeritics d'avoir réalisé les dernières mesures de porosité.

Merci à Mickaël Palard du SPCTS pour son aide précieuse concernant d'une part les essais de calcination et d'autre part la réalisation et l'interprétation des diffractogrammes des rayons X.

Merci à Monsieur Miguel Viana de l'ENSCI de Limoges pour son aide en microscopie électronique.

Un grand merci à Christelle qui a toujours suivi l'avancée de mes travaux, même à distance et qui a supporté pendant trois ans les bons comme les moments plus difficiles.

Merci à Florence, Nathalie et Amélie de m'avoir soutenu et remonté le moral à chaque fois que j'en avais besoin. Merci les filles de votre présence et de votre joie de vivre au quotidien qui m'ont permis d'avancer.

Un grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire : Monsieur le Professeur Claude Brossard et Karine, pour leur présence et leur sympathie.

RESUME

Les substituts osseux synthétiques, notamment les céramiques à base de phosphate de calcium, sont très utilisés en chirurgie pour le comblement de défauts osseux. En effet, ces matériaux biocompatibles en raison d'une composition chimique proche de celle de la phase minérale de l'os, peuvent se lier à ce dernier et agir comme un support à la repousse osseuse. De plus, ils peuvent être utilisés comme systèmes de délivrance d'une molécule active, afin de cibler la zone de relargage, de limiter les effets secondaires systémiques et d'optimiser la biodisponibilité. Parmi les différentes formes disponibles, les sphéroïdes présentent l'avantage d'assurer le comblement de cavités à géométrie complexe tout en garantissant une macroporosité, dont la taille est gérée par le diamètre des agglomérats, et qui est favorable à la repousse osseuse. Dans ce travail, des grains phosphocalciques sont produits par granulation humide à faible et à haut cisaillement en présence d'un liant organique (polyvinylpyrrolidone ou amidon pré-gélatinisé), éliminé par traitement thermique ultérieur pour créer la microporosité favorable au chargement en molécule active et nécessaire aux échanges liquidiens. Le travail expérimental a permis de sélectionner l'amidon à la concentration de 10 % pour l'obtention en granulateur Mi-Pro de sphéroïdes répondant aux spécifications fixées dans le cadre de cette étude. Les grains préparés par granulation à faible cisaillement sont plus poreux que les sphéroïdes obtenus par granulation à haut cisaillement, mais sont plus friables et moins sphériques. Les grains sont ensuite chargés en ibuprofène par imprégnation sous vide d'une solution éthanolique du principe actif. La caractérisation approfondie des sphéroïdes fonctionnalisés a mis en évidence le comblement progressif de la porosité conjointement au dépôt en surface de l'ibuprofène. De plus, pour les fortes teneurs en principe actif, il a été montré que la quantité d'ibuprofène déposé à la surface des sphéroïdes Mi-Pro est plus importante que celle présente sur les grains Kenwood. Cette localisation semble s'expliquer par la plus faible porosité des grains Mi-Pro et par leur morphologie favorable à un dépôt de surface régulier. L'étude des cinétiques de libération de la molécule active, à l'aide de trois dispositifs normalisés, n'a pas démontré d'influence significative du procédé de fabrication. En revanche, le dispositif à flux continu, et particulièrement la cellule en T, ont montré leur intérêt pour l'étude des cinétiques de dissolution de molécules actives à partir de substrats implantables en site osseux en raison des volumes de milieu et des conditions hydrodynamiques mis en jeu.

Mots-clé : phosphate de calcium, sphéroïdes, granulation humide, ibuprofène, système de délivrance, biocéramiques, biomatériaux, matériaux de comblement, porosité, fonctionnalisation thérapeutique

ABSTRACT

Bone substitutes, especially calcium phosphate based ceramics are widely used in surgery for bone defect filling. In fact, due to their chemical composition close to bone mineral phase, they are biocompatible, bioactive and osteoconductive. Simultaneously, they can be used as drug delivery systems allowing drug substance targeting, limiting systemic side effects and increasing the bioavailability. Among all physical presentations, pellets present several interests. They allow filling of complex-shaped cavities while keeping a regular macroporosity, depending on the granule median diameter, necessary for bone ingrowth. In this work, phosphocalcic granules are produced by low or high shear wet granulation with an organic binder (polyvinylpyrrolidone or pregelatinized starch), further removed by heat treatment in order to create microporosity favourable to the drug loading and necessary for liquid exchanges. Pellets, produced with 10 % starch in Mi-Pro high shear mixer granulator, are consistent with the specifications established in this work for their use as bone implants. Granules obtained by low shear granulation are more porous but more friable and less spherical than Mi-Pro pellets. The two types of granules are then loaded with ibuprofen by a solvent evaporation method from an ethanolic ibuprofen solution. Characterizations of loaded granules, show the progressive pore filling and the simultaneous surface deposition of ibuprofen, as the drug content increases. Moreover, the quantity of ibuprofen deposited on the surface is higher in the case of Mi-Pro pellets, probably due to their lower porosity and their higher sphericity, favourable to regular coating. Ibuprofen release kinetics, studied with three standard dissolution apparatuses, do not seem to be affected by the granulation process. The flow through cell, especially the T cell, is interesting for drug release study of drug substance carriers intended for bone defect filling.

Keywords: calcium phosphate, pellets, wet granulation, ibuprofen, drug delivery system, bioceramics, biomaterials, bone defect filler, porosity

TABLE DES MATIERES

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	11
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	19
I.1. GENERATION DE POROSITE DANS LES CERAMIQUES	21
Publication : <i>Fabrication of porous substrates: a review of processes using pore forming agents in the biomaterial field</i>	
<i>Abstract</i>	22
<i>Introduction</i>	22
<i>Elimination of pore former by heating</i>	24
Solid manufacturing processes.....	24
Compaction techniques	24
Extrusion method	29
Casting manufacturing processes.....	30
Dispersing processes	33
Foaming processes	33
<i>Elimination of pore former by dissolution</i>	34
Solid manufacturing processes.....	36
Casting manufacturing processes.....	36
<i>Conclusion</i>	37
<i>References</i>	37
I.2. ELABORATION D'AGGLOMERATS PAR GRANULATION HUMIDE	42
<i>I.2.1. Mécanismes généraux de croissance des grains</i>	43
I.2.1.1. Mouillage et nucléation.....	44
I.2.1.2. Croissance et consolidation des grains.....	45
I.2.1.2.1. Les différents états de saturation en liquide de mouillage des grains	46
I.2.1.2.2. Les forces intervenant au cours de la croissance	47
I.2.1.2.3. Les régimes de croissance	48

I.2.1.3. Fracture et attrition.....	49
I.2.2. <i>Les étapes du procédé de granulation humide</i>	50
I.2.2.1. Mélange-granulation.....	50
I.2.2.1.1. Granulation en mélangeur à faible cisaillement	50
I.2.2.1.2. Granulation en mélangeur-granulateur à haut cisaillement	51
I.2.2.2. Séchage.....	53
II. ETUDE EXPERIMENTALE	58
II.1. INFLUENCE DU POROGENE ET DE SA CONCENTRATION	66
Publication : <i>From porous pellet fabrication to drug loading and release: the case of calcium phosphate matrix loaded with ibuprofen</i>	
<i>Abstract</i>	69
<i>Introduction</i>	70
<i>Materials and methods</i>	72
Raw materials.....	72
Granulation process and heat treatment.....	73
Drug loading.....	76
Characterization methods.....	76
Physical characterization of unloaded pellets	76
Characterization of drug loaded pellets	78
<i>Results and discussion</i>	80
Preliminary raw material characterization.....	80
Pellet physical characterization.....	81
Size and shape	81
Porosity considerations	84
Drug content and release kinetics	87
<i>Conclusion</i>	90
<i>Acknowledgments</i>	91
<i>References</i>	91
II.2. INFLUENCE DU PROCEDE DE GRANULATION	97
II.2.1. <i>Granulation à faible et à haut cisaillement : étude comparée des procédés</i>	99

Publication : *Comparison of low shear and high shear granulation processes: effect on implantable calcium phosphate granule properties*

Abstract.....	102
Introduction.....	103
Materials and methods.....	104
Granule fabrication process	105
Physicochemical characterization of unloaded granules	107
Characterization of drug loaded granules	109
Results and discussion.....	110
Effect of granulation process on granule physicochemical properties	110
Effect of granulation process on ibuprofen loading and release	115
Conclusion.....	116
Acknowledgments.....	117
References.....	117
<i>II.2.2. Validation du procédé d'élaboration des sphéroïdes</i>	123

Publication : *Validation of a fabrication process of pellets for bone filling and drug delivery*

Abstract.....	126
Introduction.....	127
Materials and methods.....	128
Materials	128
Methods	128
<i>Pellet fabrication process</i>	128
<i>Raw material and unloaded pellet physicochemical characterizations</i>	131
Particle size.....	131
Pycnometric density.....	131
Specific surface area.....	131
Morphology.....	131
Porosity.....	132
<i>Dissolution kinetics</i>	133

Results and discussion.....	135
II.1. Raw material characterization	135
II.2. Unloaded pellet characteristics	135
II.3. Release kinetics	140
Conclusion.....	144
Acknowledgments.....	145
References.....	146
II.3. CARACTERISATION APPROFONDIE DES AGGLOMERATS FONCTIONNALISES	148
<i>II.3.1. Localisation de l'ibuprofène : effet sur les propriétés mécaniques et texturales</i>	150
Publication : <i>Ibuprofen loaded calcium phosphate granules: combination of innovative characterization methods to rely mechanical strength to drug localization</i>	
Abstract.....	153
Introduction.....	154
Materials and methods.....	156
Materials	156
Methods	156
<i>Morphological evaluation</i>	156
<i>Specific surface area measurement</i>	156
<i>Density measurements</i>	157
<i>Porosity investigation</i>	157
<i>Mechanical properties</i>	158
Friability measurement.....	158
Granule crush test.....	158
<i>Near infrared chemical imaging</i>	158
Results and discussion.....	160
Granulation influence on granule properties	160
Ibuprofen loading effect on granule properties	161
Conclusion.....	168
Acknowledgments.....	169
References.....	169

II.3.2. Cinétiques de dissolution : comparaison appareil à palette/appareil à pistons/cellule à flux continu.....	173
Publication : <i>Comparison of three dissolution apparatuses for testing implantable calcium phosphate pellets used as ibuprofen delivery systems</i>	
Abstract.....	177
Introduction.....	178
Materials and methods.....	180
Materials	180
<i>In vitro</i> release of ibuprofen	180
Dissolution data treatment	182
Results and discussion.....	184
Conclusion.....	193
Acknowledgments.....	194
References.....	194
II.3.3. Intérêt méthodologique de la cellule en T.....	199
Publication : <i>A novel application of the T cell for the flow through dissolution: the case of bioceramics used as ibuprofen carrier</i>	
Abstract.....	202
Introduction.....	203
Materials and methods.....	204
Materials	204
Dissolution test	205
Dissolution data treatment	207
Results and discussion.....	208
Acknowledgments.....	211
References.....	211
CONCLUSION	214
BIBLIOGRAPHIE	218

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

AUC	Aire sous la courbe
BCP	Phosphate de calcium biphasique
β TCP	Phosphate tricalcique β
CaP	Phosphate de calcium
CPC	Ciment phosphocalcique
CV	Coefficient de variation
$d_{0.1}$	Diamètre des particules correspondant à 10 % de la distribution cumulée (μm)
$d_{0.9}$	Diamètre des particules correspondant à 90 % de la distribution cumulée (μm)
$d_{0.5}$	Diamètre médian des particules (μm)
d_{bulk}	Masse volumique apparente vrac ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)
DC	Teneur en principe actif (%)
D_g	Dispersion granulométrique
DLE	Efficacité du chargement en principe actif (%)
d_{pycno}	Masse volumique pycnométrique ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)
$d_{\text{pycno theo}}$	Masse volumique pycnométrique calculée ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)
d_{packed}	Masse volumique apparente tassée ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)
f1	Facteur de différence
f2	Facteur de similarité
F	Friabilité (%)
HA	Hydroxyapatite
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HPMC	Hydroxypropyl méthylcellulose
$m_{355 < x < 1600}$	Masse sélectionnée par tamisage (g)
m_{initial}	Masse initiale (g)
NIR-CI	Spectroscopie infrarouge couplée à une analyse d'image
PAA	Acide polyacrylique
PMMA	Polyméthylmétacrylate
PVA	Alcool polyvinylique
PVAC	Acétate de polyvinyle
PVB	Butyrate de polyvinyle
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SEM	Microscopie électronique à balayage
S_{spe}	Surface spécifique ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)
ST 200	Amidon pré-gélatinisé
TW 50 %	Temps nécessaire pour dissoudre 50 % du principe actif (min)
TW 80 %	Temps nécessaire pour dissoudre 80 % du principe actif (min)
$V_{0.5}$	Volume occupé par le lit de sphéroïdes sous une pression de 0.5 MPa
V_{inter}	Volume poreux intergranulaire ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)
V_{intra}	Volume poreux intragranulaire ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)
V_{packed}	Volume apparent tassé ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)
V_{pellet}	Volume des sphéroïdes ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)
V_{solid}	Volume solide des grains ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)

INTRODUCTION

Les déficits et traumatismes osseux, qu'ils soient d'origine pathologique, accidentelle ou liés à l'allongement de la durée de vie, requièrent une prise en charge croissante. Il est de plus en plus fréquent de devoir recourir à des implantations osseuses pour réparer des fractures ou combler des cavités endommagées. Le corps humain étant un organisme très sensible à l'origine et à la nature des implants, les greffes autologues constituent théoriquement le moyen le plus sûr et le plus efficace. En effet, dans ce cas, le greffon, prélevé au niveau de la crête iliaque de l'os, provient d'un individu ayant successivement le rôle de donneur puis de receveur. Cette greffe, issue d'un donneur vivant, présente ainsi des propriétés d'ostéoconduction (support à la croissance osseuse), d'ostéoinduction (aide à la néoformation osseuse) et d'ostéogenèse (croissance de l'os à partir de cellules vivantes). De plus, elle évite tout risque de transmission de maladie ou de rejet [1-2]. Malheureusement, cette méthode présente également des inconvénients et notamment une morbidité du site de prélèvement ainsi qu'une augmentation de la durée de l'acte chirurgical pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient [3-5]. Une alternative est donc l'utilisation d'allogreffes, tissus osseux d'origine humaine, prélevés sur des donneurs différents des receveurs [1]. Ces greffes présentent l'avantage d'être ostéoconductives, mais peuvent entraîner l'apparition d'une réponse immunitaire nécessitant la mise en place de traitements lourds par immunosuppresseurs. De plus, ce type de greffe pose également le problème du risque de transmission de maladies graves comme le virus du sida ou des hépatites [4]. C'est pourquoi, les substituts osseux synthétiques et notamment les céramiques à base de phosphate de calcium et d'hydroxyapatite sont de plus en plus utilisés en chirurgie orthopédique et en odontologie. En effet, ces matériaux biocompatibles en raison d'une composition chimique proche de celle de la phase minérale de l'os, peuvent se lier chimiquement à l'os (bioactivité) et agir comme un substrat pour la croissance osseuse. Ils sont donc ostéoconducteurs même s'ils ne possèdent pas de propriétés ostéogéniques [1].

Pour pouvoir être utilisées en tant que substituts osseux, ces céramiques doivent cependant présenter une porosité favorable à l'invasion de l'implant par les cellules osseuses et les liquides biologiques. En effet, des travaux ont mis en évidence l'influence de la taille des pores, de leur nombre et de leur forme sur les processus de recolonisation osseuse. Ainsi, Hulbert *et al.* [6] ont montré que les pores doivent présenter un diamètre supérieur à 100 μm pour pouvoir accueillir les cellules osseuses et un diamètre supérieur à 200 μm pour être ostéoconducteurs. De plus, certains auteurs suggèrent que cette macroporosité doit être interconnectée [7-8].

Parmi les différentes présentations d'objets poreux rencontrées dans le domaine des biomatériaux, les blocs sont largement décrits mais leur emploi n'est pas satisfaisant pour le remplissage des cavités osseuses de formes complexes [9-10]. A l'inverse, les ciments se révèlent parfaitement adaptés au comblement d'espaces irréguliers mais perdent leur supériorité par rapport aux blocs lorsqu'une macroporosité est recherchée [11-13]. En effet, dans ce cas, le procédé de fabrication nécessite l'ajout d'un agent porogène qui doit être éliminé *in situ* pour créer une porosité nécessaire à l'envahissement cellulaire. Afin de garantir une ostéoconduction optimale ainsi qu'un comblement adéquat, il apparaît alors intéressant d'envisager la fabrication de sphéroïdes pour lesquels la macroporosité serait formée par les espaces inter-granulaires créés par l'empilement des objets et qui permettraient un contact intime avec les berges osseuses de la cavité à combler.

La fabrication de granules est peu décrite dans le domaine des biomatériaux, elle fait essentiellement appel à des méthodes :

- de compaction à l'aide de poinçons hémisphériques [14] ;
- de coulage d'une suspension dans des moules hémisphériques [15-16] ;
- d'encapsulation, basée sur le principe d'immiscibilité des liquides, d'une dispersion céramique/gélatine dans une huile. La gélatine est ensuite éliminée par chauffage pour créer la porosité [17-19]. La création de mousses à partir de surfactants, permet d'augmenter la porosité des sphères [20].

La granulation humide est une méthode de fabrication très largement utilisée en pharmacie pour gérer, par les propriétés physico-chimiques, les qualités d'usage telles que les caractéristiques rhéologiques, texturales, la comprimabilité, la résistance mécanique ou la lyodisponibilité [21-22]. Néanmoins, à l'heure actuelle, cette méthode n'est pas appliquée aux biocéramiques. L'originalité de cette étude réside donc dans l'utilisation de la granulation humide dans le cadre du développement de sphéroïdes implantables ; sa facilité de mise en œuvre, ses performances et l'expérience acquise dans ce domaine par l'équipe GEFSOD à travers la réalisation de nombreux travaux de recherche justifient d'y faire appel.

La granulation humide consiste à agglomérer des particules élémentaires par pulvérisation d'une solution liante sur un mélange pulvérulent en agitation [23-25]. Le liant peut également être incorporé dans le mélange à sec, le mouillage est alors effectué par le

solvant seul. Dans tous les cas, les étapes successives concourent à la qualité finale des grains :

- le mélange à sec assure l'homogénéité ;
- le mouillage induit la nucléation et garantit la croissance des grains ;
- le séchage, suivi de la finition, fige la morphologie et la granulométrie.

Le séchage peut être précédé d'une étape de sphéronisation, consistant à maintenir l'agitation après mouillage, afin d'améliorer la sphéricité des grains.

Plusieurs types de mélangeurs-granulateurs peuvent être utilisés et ce travail de thèse a considéré les mélangeurs à faible cisaillement qui créent des grains relativement poreux et les mélangeurs-granulateurs à haut cisaillement qui produisent des agglomérats plus denses et plus sphériques quand intervient une étape de sphéronisation. Des agglomérats de phosphate de calcium ont été réalisés, à l'échelle du laboratoire, à l'aide de liants organiques dans un mélangeur à faible cisaillement de type planétaire Kenwood (Kenwood Ltd, Angleterre) et dans un mélangeur-granulateur à haut cisaillement Mi-Pro (Pro-C-epT, Zelate, Belgique).

Les céramiques élaborées sont destinées à la reconstruction osseuse mais l'objectif est également de les utiliser comme systèmes de délivrance d'une molécule active, afin de pouvoir cibler la zone de relargage et de maîtriser les cinétiques de libération [26-28]. Dans cette perspective, la porosité intra-granulaire doit être augmentée par calcination du liant, faisant également fonction de porogène, et une procédure de chargement sous vide doit permettre de remplacer le porogène par le principe actif.

Plusieurs familles thérapeutiques telles que facteurs de croissance, antibiotiques et anti-inflammatoires, ont été associées aux substituts osseux [29-37]. Les anti-inflammatoires, tels l'indométacine, le flurbiprofène, l'ibuprofène, ont en effet prouvé leur intérêt dans le cas de la destruction du tissu osseux au cours des maladies du périoste. De plus, l'apparition de phénomènes inflammatoires locaux au niveau du site d'implantation des biomatériaux dus à l'activation du système immunitaire a été mise en évidence [33,35,38]. Le chargement des implants osseux en agent anti-inflammatoire permet la délivrance de fortes concentrations locales de principe actif tout en limitant son passage systémique et donc les effets secondaires associés [35,38-39]. Le principe actif utilisé dans le cadre de ce travail est l'ibuprofène, anti-inflammatoire de référence, disponible de façon industrielle et présentant des tailles de particules adaptées à l'inclusion.

Ce travail de thèse, initié au sein du Groupe d'Etude sur la Fonctionnalisation des Solides Divisés (GEFSOD EA 2631, Limoges) et soutenu financièrement sous la forme d'une bourse d'étude par la Région Limousin, concerne donc l'élaboration de sphéroïdes poreux à base de phosphate de calcium destinés à l'implantation osseuse et à la libération contrôlée de l'ibuprofène. Cette étude correspond aux orientations de l'équipe de recherche qui conjugue désormais, au sein du laboratoire Science des Procédés Céramiques et de Traitements de Surface (SPCTS UMR CNRS 6638), les compétences développées dans le domaine de la mise au point des médicaments par le groupe GEFSOD et dans celui des matériaux et procédés céramiques. Ce travail s'inscrit plus spécifiquement dans la thématique biocéramiques, applications thérapeutiques et ingénierie tissulaire.

Le présent document est organisé en deux parties.

La première partie bibliographique présente successivement les méthodes de création de pores au sein de céramiques et les principes généraux de la granulation humide développée en pharmacie. Le croisement des différentes méthodes servira de base pour l'élaboration de sphéroïdes poreux destinés à l'implantation osseuse.

La seconde partie, dite « partie expérimentale » est organisée en trois chapitres :

- le premier met en évidence l'effet de la nature du porogène et de sa concentration sur l'élaboration de substituts osseux ;
- le deuxième s'intéresse à l'influence du procédé de granulation sur les propriétés physico-chimiques des grains obtenus ;
- le dernier chapitre approfondit la caractérisation des agglomérats fonctionnalisés en étudiant l'effet de la localisation de l'ibuprofène, d'une part sur les propriétés mécaniques et texturales et d'autre part, sur les cinétiques de dissolution.

La majeure partie de ce travail est présentée sous forme de publications précédées d'une synthèse de leur contenu, rédigée en français.

Références

- [1] Colombier ML, Lesclous P, Tulasne JF 2005. La cicatrisation des greffes osseuses. Rev Stomatol Chir Maxillofac 106:157-165.
- [2] Lohmann H, Grass G, Rangger C, Mathiak G 2007. Economic impact of cancellous bone grafting in trauma surgery. Arch Orthop Trauma Surg 127:345-348.
- [3] Marsh JL 2003. Principles of bone grafting: non-union, delayed union. Surgery 24:207-210.
- [4] Detsch R, Mayr H, Ziegler G 2008. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. Acta Biomater 4:139-148.
- [5] Shears E, Dehne K, Murata H, Adubu A, Grimer RJ, Tillman RM, Carter SR 2008. Healing of ungrafted bone defects of the talus after benign tumor removal. Foot Ankle Surg 14:161-165.
- [6] Hulbert SF, Morrison SJ, Klawitter JJ 1971. Compatibility of porous ceramics with soft tissue; application to tracheal prostheses. J Biomed Mater Res 5:269-279.
- [7] Lu JX, Flautre B, Anselme K, Hardouin P, Gallur A, Deschamps M, Thierry B 1999. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization *in vitro* and *in vivo*. J Mater Sci Mater Med 10:111-120.
- [8] Collin I 2006. Contribution à l'optimisation de céramiques phosphocalciques macroporeuses biphasées pour le comblement de défauts osseux : élaboration et caractérisation mécanique et architecturale ; étude de la fonctionnalité *in vivo*. PhD Thesis, Université de Nantes, Nantes, 249 p.
- [9] Van Blitterswijk CA, Grote JJ, Kuijpers W, Daems WT, De Groot K 1986. Macropore tissue ingrowth: a quantitative and qualitative study on hydroxyapatite ceramic. Biomaterials 7:137-143.
- [10] Flautre B, Deschamps M, Delecourt C, Blary MC, Hardouin P 2001. Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections – experimental study in the rabbit. J Mater Sci Mater Med 12:679-682.
- [11] Barralet JE, Grover L, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR 2002. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold. Biomaterials 23:3063-3072.
- [12] Del Real RP, Wolke JGC, Vallet-Regi M, Jansen JA 2002. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. Biomaterials 23:3673-3680.
- [13] Xu HHK, Weir MD, Burguera EF, Fraser AM 2006. Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffolds. Biomaterials 27:4279-4287.

- [14] Sunder M, Babu NR, Victor SP, Kumar KR, Sampath Kumar TS 2005. Biphasic calcium phosphates for antibiotic release. *Trends Biomater Artif Organs* 18 (2):213-218.
- [15] Liu DM 1996. Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite granules. *Biomaterials* 17:1955-1957.
- [16] Rivera-Muñoz E, Diaz JR, Rogelio Rodriguez J, Brostow W, Castaño VM 2001. Hydroxyapatite spheres with controlled porosity for eye ball prosthesis: processing and characterization. *J Mater Sci Mater Med* 12:305-311.
- [17] Paul W, Sharma CP 1999. Development of porous spherical hydroxyapatite granules: application towards protein delivery. *J Mater Sci Mater Med* 10:383-388.
- [18] Komlev VS, Barinov SM, Koplík EV 2002. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. *Biomaterials* 23:3449-3454.
- [19] Ioku K, Kawachi G, Sasaki S, Fujimori H, Goto S 2006. Hydrothermal preparation of tailored hydroxyapatite. *J Mater Sci* 41:1341-1344.
- [20] Lee JS, Park JK 2003. Processing of porous ceramic spheres by pseudo-double-emulsion method. *Ceram Int* 29:271-278.
- [21] Iveson SM, Wauters PAL, Forrest S, Litster JD, Meesters GMH, Scarlett B 2001. Growth regime map for liquid bound-granules: development and experimental validation. *Powder Technol* 117:83-97.
- [22] Plank R, Diehl B, Grinstead H, Zega J 2003. Quantifying liquid coverage and powder flux in high-shear granulators. *Powder Technol* 134:223-234.
- [23] Hapgood KP, Litster JD, Smith R 2003. Nucleation regime map for liquid bound granules. *AIChE Journal* 49:350-361.
- [24] Badawy SIF, Hussain MA 2004. Effect of starting material particle size on its agglomeration behaviour in high shear wet granulation. *AAPS PharmSciTech* 5:1-7.
- [25] Benali M, Gerbaud V, Hemati M 2008. Effect of operating conditions and physico-chemical properties on the wet granulation kinetics in high shear mixer. *Powder Technol*, in press.
- [26] Arcos D, Ragel CV, Vallet-Regi M 2001. Bioactivity in glass/PMMA composites used as drug delivery system. *Biomaterials* 22:701-708.
- [27] Ginebra MP, Traykova T, Planell JA 2006. Calcium phosphate cements as drug delivery systems: a review. *J Control Release* 113:102-110.

- [28] Balcik C, Tokdemir T, Senköylü A, Koc N, Timucin M, Akin S, Korkusuz P, Korkusuz F 2007. Early weight bearing of porous HA/TCP (60/40) ceramics *in vivo*: a longitudinal study in a segmental bone defect model of rabbit. *Acta Biomater* 3:985-996.
- [29] Urist MR, Lietze A, Dawson E 1984. Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 187:277-280.
- [30] Castelli C, Marone P, Monzillo V, Segu K 1995. Antistaphylococcal activity of antibiotic impregnated bone cement. *The knee* 2:219-222.
- [31] Ramsey ML, Fenlin JM 1996. Use of an antibiotic-impregnated bone cement block in the revision of an infected shoulder arthroplasty. *J Shoulder Elbow Surg* 5:479-482.
- [32] Goodwin CJ, Braden M, Downes S, Marshall NJ 1997. Investigation into the release of bioactive recombinant human growth hormone from normal and low-viscosity poly(methylmetacrylate) bone cements. *J Biomed Mater Res* 34:47-55.
- [33] Corry D, Moran J 1998. Assessment of acrylic bone cement as a local delivery vehicle for the application of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biomaterials* 19:1295-1301.
- [34] Charnay C, Begu S, Tourne-Peteilh C, Nicole L, Lerner DA, Devoiselle JM 2004. Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property. *Eur J Pharm Biopharm* 57:533-540.
- [35] Mendez JA, Fernandez M, Gonzalez-Corchon A, Salvado M, Collia F, De Pedro JA, Levenfeld BL, Lopez-Bravo A, Vazquez B, San Roman J 2004. Injectable self-curing bioactive acrylic-glass composites charged with specific anti-inflammatory/analgesic agent. *Biomaterials* 25:2381-2392.
- [36] Sasaki T, Ishibashi Y, Katano H, Nagumo A, Toh S 2005. *In vitro* elution of vancomycin from calcium phosphate cement. *J Arth* 20:1055-1059.
- [37] Silverman LD, Lukashova L, Herman OT, Lane JM, Boskey AL 2007. Release of gentamicin from a tricalcium phosphate bone implant. *J Orthop Res* 25:23-29.
- [38] Gonzalez-Corchon MA, Salvado M, De la Torre BJ, Collia F, De Pedro JA, Vazquez B, San Roman J 2006. Injectable and self-curing composites of acrylic/bioactive glass and drug systems. A histomorphometric analysis of the behaviour in rabbits. *Biomaterials* 27:1778-1787.
- [39] Borovac T, Pelage JP, Kasselouri A, Prognon P, Guiffant G, Laurent A 2006. Release of ibuprofen from beads for embolization: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Control Release* 115:266-274.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'objectif de ce travail de thèse est de fabriquer des sphéroïdes phosphocalciques poreux pour une utilisation en tant que substituts osseux et systèmes de délivrance de molécules actives combinant les techniques utilisées dans le domaine des biomatériaux et de la pharmacie. La partie bibliographique de ce document est constituée de deux chapitres.

Le premier chapitre est une revue des procédés les plus fréquemment utilisés dans le domaine des biomatériaux pour générer de la porosité au sein de céramiques. Ces méthodes sont basées sur l'élimination d'un composé organique, le porogène, par chauffage ou par dissolution. Cette revue bibliographique distingue les procédés de fabrication en voie solide et par moulage (Tableau 1). Les méthodes par voie solide (compaction, extrusion) conduisent à des objets de formes géométriques simples telles que les blocs ou les granules. Les techniques par moulage regroupent d'une part, les procédés nécessitant la formation d'une suspension qui est ensuite coulée dans des moules, afin d'obtenir une gamme d'objets allant des géométries simples à des formes très complexes, et d'autre part, les méthodes basées sur le principe d'immiscibilité des liquides permettant la préparation d'objets sphériques. Ce chapitre a fait l'objet d'une publication intitulée:

Fabrication of porous substrates: a review of processes using pore forming agents in the biomaterial field

TYPE DE PROCEDE	Procédés par moulage <i>Ciment</i> <i>Suspension</i>	Procédés voie solide <i>Compaction</i> <i>Extrusion</i>
METHODE	Directe <i>Sans frittage (ciment)</i>	Indirecte <i>Avec frittage</i>
NATURE DU POROGENE	Gaz	Liquide Solide <i>Poudre dispersée</i> <i>Squelette 3D</i>
ELIMINATION DU POROGENE	Chauffage <i>Sublimation</i> <i>Evaporation</i> <i>Fusion</i> <i>Calcination</i>	Dissolution <i>En cours de procédé</i> <i>In situ</i>

Tableau 1 : Procédés de génération de porosité au sein de céramiques

Le deuxième chapitre aborde les principes généraux de la granulation humide et apporte les éléments documentaires utiles à la partie expérimentale du travail. Après présentation des mécanismes de croissance des grains, les granulations à faible et haut cisaillement seront décrites pour l'obtention de grains pour implantation osseuse.

I.1. GENERATION DE POROSITE DANS LES CERAMIQUES

Chevalier E, Chulia D, Pouget C, Viana M.

Fabrication of porous substrates: a review of processes using pore forming agents in the biomaterial field

Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 97:1135-1154.

I.2. ELABORATION D'AGGLOMERATS PAR GRANULATION HUMIDE

La granulation humide est un procédé d'agglomération utilisé dans de nombreux secteurs industriels notamment la pharmacie mais aussi l'agroalimentaire, la détergence [1-3]. Elle consiste, sous l'effet d'un liquide de mouillage, à assembler des particules primaires sous forme d'agglomérats dans le but [4] :

- d'augmenter la masse volumique apparente ;
- d'assurer l'homogénéité des mélanges pulvérulents ;
- d'améliorer les propriétés d'écoulement ;
- de garantir la manipulation des produits formés ;
- de réduire la production de fines ;
- d'améliorer les propriétés mécaniques ;
- d'ajuster les cinétiques de dissolution des principes actifs ;
- de faciliter la mise en forme ultérieure ;
- d'augmenter l'aptitude à la compression des grains.

La formation des grains est provoquée par l'addition de liants qui peuvent être soit incorporés à l'état solide au mélange de poudres qui est ensuite mouillé par le solvant de granulation, soit pulvérisés sous forme de solution liante sur le mélange pulvérulent. L'agglomération est rendue possible grâce à la création de forces physiques ou chimiques inter-particulaires, induites par le liant mais aussi par le procédé de granulation et assurant, après séchage, la cohésion des particules au sein des agglomérats.

I.2.1. Mécanismes généraux de croissance des grains

La granulation est traditionnellement décrite comme la combinaison de trois étapes (Figure 1) : mouillage et nucléation, croissance et consolidation, attrition et rupture [1,5-8].

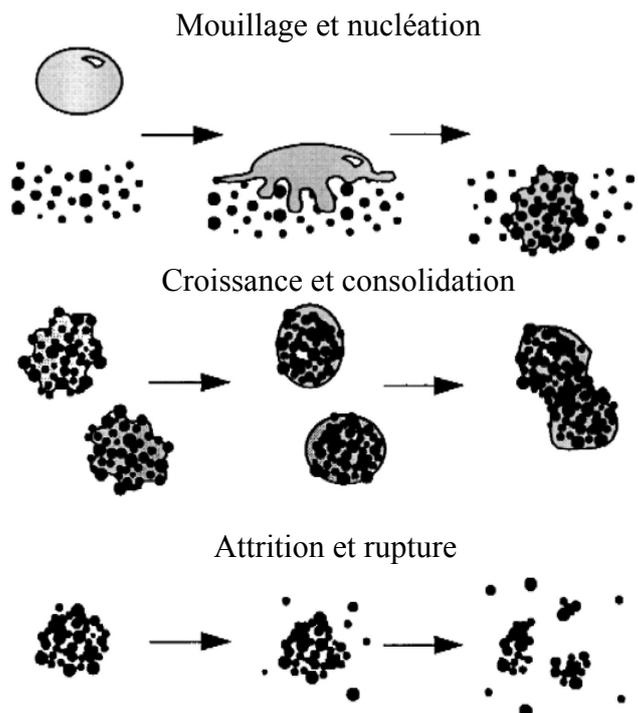


Figure 1 : Représentation schématique des différents stades de la granulation
(d'après Iveson et *al.* [1])

I.2.1.1. Mouillage et nucléation

Cette première étape de la formation des grains, déterminante pour l'ensemble du processus de granulation, est générée par l'addition du liquide de mouillage au matériau sec et sa distribution [6-7]. La qualité du mouillage dépend de la répartition du liant solide dans le mélange de poudre ou de la dispersion de la solution liante, dépendant elles-mêmes des caractéristiques physicochimiques des matières premières, des propriétés rhéologiques de la solution liante et des modalités d'incorporation du liant. Si la dispersion du liant est satisfaisante et le mouillage uniforme, la nucléation est contrôlée [1]. Mort et Tardos [7] ont mis en évidence que le degré de dispersion influence la distribution de taille des grains. Le processus de granulation débute par la phase de nucléation : le liant commence à mouiller la poudre et forme l'agglomérat initial. Ce mécanisme est fortement influencé par la taille relative des gouttelettes de liant par rapport à la taille des particules primaires. Les travaux de Schaefer et Mathieson [9] sur l'agglomération par voie fondue, repris par Scott et *al.* [10] pour rendre compte du procédé de granulation, proposent deux mécanismes différents selon la taille des gouttelettes. Ainsi, si la dimension de la goutte de solution liante est importante par rapport à la taille des particules, la nucléation a lieu par immersion des petites particules à

l'intérieur des grosses gouttes (Figure 2a), il y a alors production de nucléi à pores saturés. Si au contraire, les gouttelettes ont une taille inférieure aux particules primaires, la nucléation est produite par la distribution des gouttelettes à la surface des particules (Figure 2b). Les nucléi ainsi formés peuvent emprisonner de petites quantités d'air augmentant la tension superficielle et l'angle de contact.

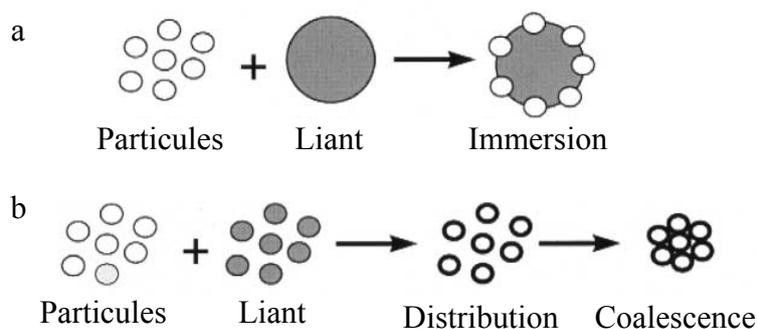


Figure 2 : Schématisation des mécanismes de coalescence et d'immersion
(d'après Iveson et al. [1])

Il faut noter qu'il existe parfois un régime unique de nucléation lorsque la quantité de liquide de mouillage est insuffisante pour promouvoir la croissance des grains [11-12], qui constitue la deuxième étape de la granulation.

I.2.1.2. Croissance et consolidation des grains

La croissance des grains débute lorsque les nucléi, sous l'effet des collisions, s'assemblent. Si le phénomène concerne deux agglomérats primaires de taille comparable, le processus de croissance est appelé coalescence. Si en revanche, il consiste en un dépôt de fines particules à la surface de particules plus larges, préexistantes, le processus est nommé *layering* ou *snow-balling*. Cependant, cette distinction reste théorique et dépend du rapport de taille défini entre fines et grosses. La croissance peut débiter de façon concomitante à la nucléation, dès que le liant est additionné à la masse pulvérulente en agitation. Si tous les agglomérats contiennent une quantité identique de liant, leurs propriétés physiques sont identiques et la distribution granulométrique est étroite. En revanche, si le liant est dispersé de façon aléatoire au sein du mélange de poudres, certains nucléi sont plus saturés que d'autres et leur croissance devient préférentielle [11,13]. Cette étape de croissance peut se prolonger après l'arrêt de l'ajout du liant.

La probabilité d'une collision entre deux particules primaires et l'entretien du phénomène de coalescence dépend d'un grand nombre de facteurs tels que les propriétés mécaniques des grains, la capacité du liant à se déposer à la surface des grains, l'hydrodynamique du système et la densification. Sous l'effet de l'agitation, les grains se consolident progressivement entraînant une augmentation de la saturation des pores en liquide et une évolution des propriétés mécaniques [1].

I.2.1.2.1. Les différents états de saturation en liquide de mouillage des grains

Newitt et Conway-Jones [14] ont été les premiers auteurs à décrire les états de saturation des grains : pendulaire, funiculaire, capillaire, gouttelette et pseudo-gouttelette (Figure 3).

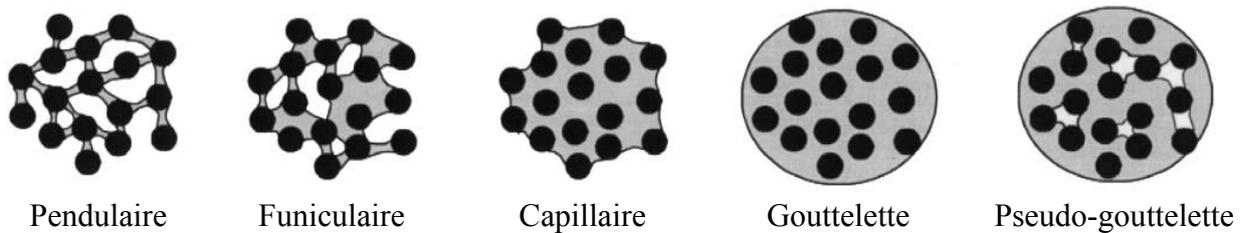


Figure 3 : Les cinq états de saturation des grains en liquide de mouillage
(d'après Newitt and Conway-Jones [14])

Dans l'état pendulaire, les particules sont maintenues entre elles par des ponts liquides formés au niveau de leurs points de contact. L'état capillaire apparaît lorsque les grains se saturent, c'est-à-dire que les pores se remplissent de liquide de liaison sous l'effet de forces capillaires. L'état funiculaire, dans lequel les vides ne sont pas encore totalement saturés en liant, est un stade de transition entre les états pendulaire et capillaire. L'état gouttelette est atteint lorsque la sursaturation enferme les particules au sein des gouttelettes. Il est parfois possible d'observer un état pseudo-gouttelette dans lequel des espaces vides de liant restent emprisonnés [14]. Ce phénomène apparaît fréquemment lorsque les systèmes sont mouillés de façon hétérogène [15]. Au cours de la granulation, le mouillage est arrêté lorsque l'état funiculaire est atteint et que les agglomérats sont formés [16].

I.2.1.2.2. Les forces intervenant au cours de la croissance

L'agglomération des particules solides résulte de modifications chimiques ou physiques du solide, induites par le liant chimi- ou physi-sorbé à la surface des particules solides et par le procédé, responsables des ponts interparticulaires [17-18].

La nature et l'intensité des forces pouvant induire l'adhésion de deux particules sont récapitulées dans les Figures 4 et 5.

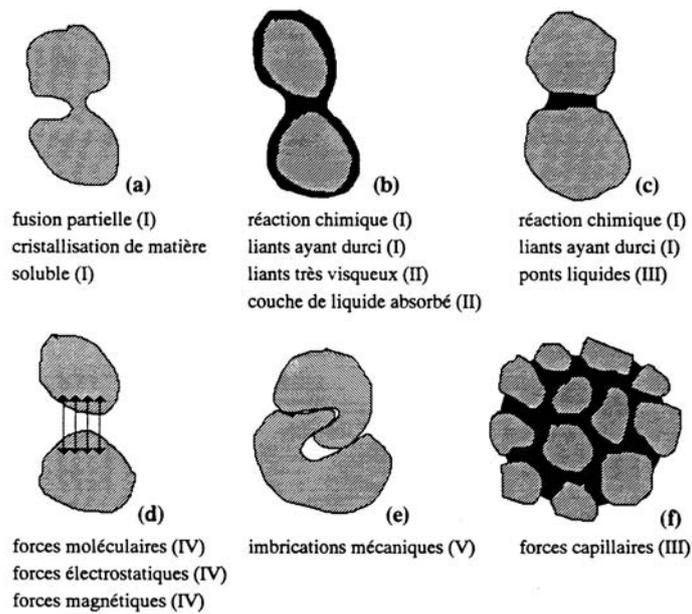


Figure 4 : Mécanismes d'agglomération (d'après Rumpf [17])

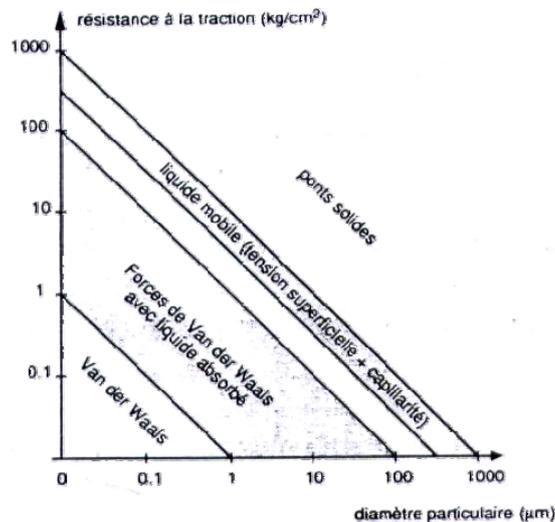


Figure 5 : Intensité des forces interparticulaires (d'après Rumpf [17])

Selon Rumpf [17], les principales forces cohésives intervenant au cours de la granulation résultent des ponts liquides formés entre les particules solides.

I.2.1.2.3. Les régimes de croissance

Iveson et Litster [19] décrivent l'existence de plusieurs comportements lors de la croissance des grains : la croissance stable (*steady growth*) et la croissance par induction (*induction growth*).

Pendant la phase de croissance stable, la taille moyenne des grains augmente de façon continue avec le temps. Ce phénomène est observé lorsque les grains humides sont facilement déformables. L'ajout d'une quantité supplémentaire de liant augmente le taux de croissance mais n'améliore pas la qualité des grains formés.

L'induction est une phase au cours de laquelle il existe une longue période de faible croissance voire d'absence de croissance. Cette période d'induction, aussi appelée région de nucléi [20] ou étape de compaction [21], est suivie d'une phase de croissance rapide. L'augmentation de la teneur en liant diminue généralement la durée de la période d'induction. Cet état est rencontré avec des systèmes relativement résistants se consolidant lentement. Les grains ne se déforment pas suffisamment pour pouvoir induire une coalescence sous l'effet des collisions mais se consolident lentement avec le temps, puis lorsque le liant se dépose à leur surface, la coalescence des grains est rapide assurant le début de leur croissance [13].

Il existe d'autres comportements comme :

- le *crumb behaviour* lorsque la formulation est trop humide pour former des grains solides : il se forme en revanche des structures molles et friables qui protègent quelques grains plus gros qui sont constamment détruits puis reformés [22] ;
- le surmouillage qui apparaît lorsqu'une quantité trop importante de liquide de mouillage est additionnée à la masse à granuler ; le système forme alors une masse sursaturée [23].

I.2.1.3. Fracture et attrition

La granulation est le résultat de la compétition entre la croissance des agglomérats et leur rupture sous l'effet des conditions mécaniques. Lorsque les grains se cassent, il existe plusieurs phénomènes distincts :

- cassure des grains humides dans le granulateur. Cette situation, lorsqu'elle est maîtrisée, peut être un moyen de contrôler la granulométrie des grains, notamment dans le cas des granulateurs à haut cisaillement ;
- attrition et fracture des grains secs dans le granulateur, dans le dispositif de séchage ou au cours de la « finition » ultérieure. Ce phénomène, qui peut se propager selon deux modalités, est générateur de fines et doit être évité. Ainsi, lorsque les agglomérats ont une zone de fissure petite en regard de leur taille, ils se fragmentent : c'est le mécanisme de fracture ou fragmentation (Figure 6a). Ce phénomène apparaît lorsque les grains peuvent concentrer assez d'énergie élastique pour propager la fracture au cours de la collision. Au contraire, quand les dimensions de la zone de fissure sont comparables à celles de l'agglomérat, ceux-ci sont détruits par érosion ou attrition (Figure 6b) due à la propagation de microfissures générant des fines plutôt que des petits fragments [1].

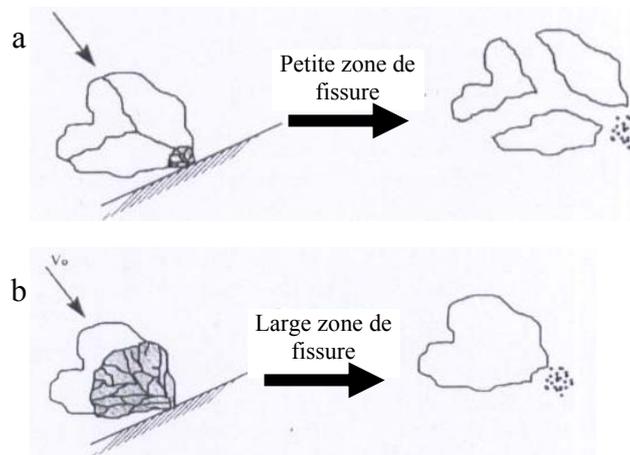


Figure 6 : Schéma de rupture des grains a) par fracture et b) par attrition
(d'après Iveson [1])

I.2.2. Les étapes du procédé de granulation humide

I.2.2.1. Mélange-granulation

La granulation humide peut être réalisée selon des procédés multiphasiques, pour lesquels mélange, granulation et séchage sont effectués dans des appareils différents [24-28], ou monophasiques (*single pot*) combinant toutes les étapes dans un même appareil [29-33].

La granulation peut être mise en oeuvre :

- dans des mélangeurs à faible taux de cisaillement de type mélangeurs planétaires, à vis hélicoïdale ou à socs ;
- dans des mélangeurs-granulateurs à haut cisaillement dans lesquels l'agitation est réalisée à des vitesses plus importantes que dans les mélangeurs précédents [16] ;
- en lit fluidisé, réduisant généralement la quantité de liquide de mouillage, le temps de manipulation mais aussi la cohésion [34-35].

Seuls les deux premiers principes ont été retenus dans la partie expérimentale de ce travail et sont décrits ci-après.

I.2.2.1.1. Granulation en mélangeur à faible cisaillement

Les mélangeurs à faible taux de cisaillement sont définis par le mouvement de la pale qui successivement désaère la poudre puis provoque sa chute par gravité [4]. Ces appareils peuvent être utilisés pour les mélanges à sec de matériaux pulvérulents ou les mélanges solide-liquide [36]. Les principaux types de mélangeurs utilisés dans l'industrie pharmaceutique sont :

- les mélangeurs de type pétrin et les mélangeurs coniques à vis pour lesquels la pale, portée par un axe horizontal, projette la masse pulvérulente sur les parois et la disperse sur les côtés, permettant l'obtention de grains denses [37].
- les mélangeurs planétaires dont l'axe de rotation est vertical. Ils sont responsables d'un allongement du temps de mélange et d'une densification assez limitée [4] mais permettent le traitement de plus faibles quantités de produit et une grande souplesse d'utilisation [38].

Les mélangeurs à faible cisaillement conduisent à l'obtention de grains présentant des densités apparentes variables en fonction du dispositif utilisé, à l'origine d'une porosité relativement plus importante que dans le cas des mélangeurs à haut cisaillement. En revanche, lors de la granulation de poudres fines, il existe un risque de répartition hétérogène du liquide de mouillage [4].

Afin d'améliorer cette densification, il est nécessaire d'avoir recours à une granulation proprement dite au moyen de granulateurs dont le rôle est de forcer la masse humide à travers une surface perforée. Il existe deux types de granulateurs :

- les granulateurs rotatifs pour lesquels une vis sans fin ou un rotor à pales force la masse à travers une paroi cylindrique ou une paroi plane à l'extrémité d'un cylindre ;
- les granulateurs oscillants constitués de barres parallèles animées d'un mouvement de va-et-vient qui oblige le mélange humide à passer à travers une grille semi-cylindrique. Les grains obtenus sont plus poreux que ceux produits par les granulateurs rotatifs [39].

I.2.2.1.2. Granulation en mélangeur-granulateur à haut cisaillement

Dans les mélangeurs à haut cisaillement, la pale tourne à grande vitesse augmentant la probabilité de collision des grains entre eux et avec les parois de la cuve. Les lames de la pale peuvent être en position horizontale ou verticale. La pale est généralement associée à un émotteur destiné à détruire les gros agglomérats pouvant se former en cours de granulation [4]. Ces mélangeurs permettent une réduction du temps de granulation et une bonne densification des grains [16]. Les agglomérats formés sont donc plus résistants et plus sphériques que ceux obtenus en mélangeur à faible cisaillement [4]. De plus, ces dispositifs peuvent être instrumentés : il est possible de mesurer directement le couple de torsion ou la puissance consommée par le moteur du mélangeur et ainsi de suivre l'évolution rhéologique et la consistance du mélange poudre-liant de l'état initial à l'état capillaire [40-41]. Ainsi, sur la représentation graphique (Figure 7), cinq phases peuvent être identifiées selon Leuenberger [42] :

- phase I : le liquide de mouillage est adsorbé par le mélange de poudres sans qu'il y ait agglomération des particules. La puissance consommée est constante ;

- phase II : la valeur de la puissance augmente fortement et des grains commencent à se former. Il y a formation des ponts liquides et la fin de cette phase correspond à l'état pendulaire pour lequel tous les ponts sont formés ;
- phase III : le couple reste constant, cette phase de plateau correspond à la densification et à la croissance des agglomérats par remplissage progressif des espaces interparticulaires en liquide de mouillage (état funiculaire) ;
- phase IV : la puissance consommée augmente à nouveau et présente des fluctuations importantes jusqu'à atteindre sa valeur maximale. Le mélange passe alors à l'état capillaire ;
- phase V : la puissance consommée décroît fortement indiquant le passage à l'état de suspension.

L'exploitation judicieuse de ce profil permet de rationaliser l'opération de granulation.

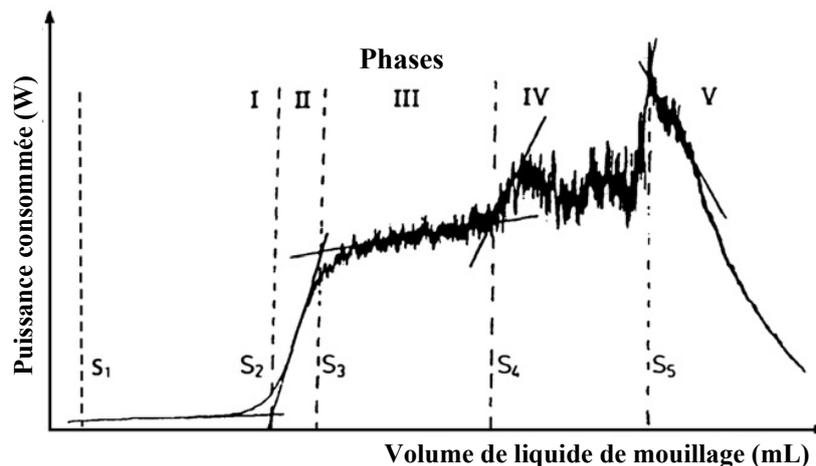


Figure 7 : Courbe typique de puissance consommée (d'après Leuenberger [42])

Le procédé à haut cisaillement présente l'avantage de produire des grains denses *in situ*, évitant l'étape de granulation ultérieure nécessaire dans le cas des appareils à faible cisaillement. De plus, elle peut être suivie d'une sphéronisation qui consiste à maintenir l'agitation après l'ajout complet du liquide de mouillage. La déformation des grains leur confère une forme sphérique.

I.2.2.2. Séchage

Après granulation, le séchage conduit à l'évaporation du liquide de mouillage jusqu'à une teneur en humidité résiduelle assurant la stabilité des grains et permettant les différentes opérations de mise en forme et manipulations ultérieures. La maîtrise de cette étape permet le contrôle des propriétés physico-technologiques des grains [43-45].

Le séchage est un processus combinant un transfert de matière et de chaleur. L'énergie permettant le passage du solvant de l'état liquide à l'état gazeux est fournie par convection d'un fluide gazeux, par conduction au contact d'une surface chauffée ou par rayonnement infrarouge ou hyperfréquence. Le séchage peut être divisé en trois phases [46-47] (Figure 8) :

- phase I de montée en température du produit ;
- phase II d'évaporation constante au cours de laquelle la température reste stable avec un équilibre entre les phénomènes d'évaporation et de migration, le solvant migrant à la surface du produit par des forces capillaires ;
- phase III d'évaporation à vitesse décroissante au cours de laquelle la température augmente car la quantité d'énergie fournie est supérieure à celle nécessaire à l'évaporation du solvant résiduel.

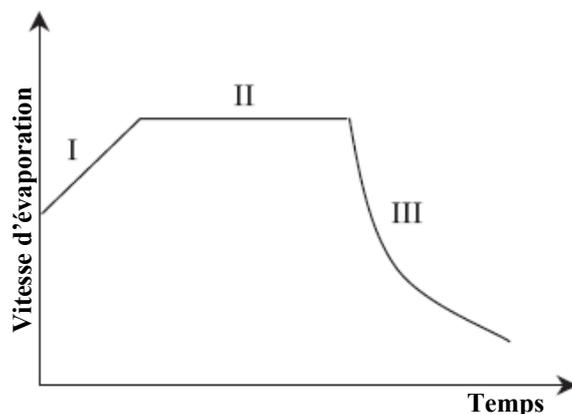


Figure 8 : Phases du cycle de séchage (d'après Rosetto [48])

Lorsque le séchage est une étape d'un procédé multiphasique, il peut être réalisé dans [16] :

- une étuve, méthode conventionnelle de l'industrie pharmaceutique. Les grains humides sont étalés sur de grands plateaux et placés dans une étuve à circulation d'air

où la température est contrôlée. Cependant, il s'agit d'un procédé long et difficilement contrôlable [49] ;

- un sécheur à lit fluidisé dans lequel les particules sont mises en suspension dans un flux d'air.

Le processus d'évaporation peut être accéléré par augmentation de la température de l'air entrant [50], mais il est nécessaire de s'assurer que cette augmentation de température ne dégrade pas le produit [16].

Le séchage en lit fluidisé permet de réduire le temps de séchage, par rapport à un procédé en étuve, par une meilleure circulation de l'air. En revanche, ce procédé peut générer des fines, par phénomènes d'attrition, modifiant la distribution de taille des particules [51]. L'énergie consommée avec ce dispositif est élevée [52].

Un criblage mécanique réalisé après le séchage, permet si nécessaire d'ajuster la granulométrie finale et de séparer les grains collés entre eux, pour conduire au matériau final dont les propriétés physico-chimiques et les qualités d'usage auront été globalement gérées par le procédé et la formulation. A ce stade, les grains sont généralement calibrés par passage sur une grille d'ouverture de maille plus petite que celle utilisée pour la granulation.

Références

- [1] Iveson SM, Litster JD, Hapgood K, Ennis BJ 2001. Nucleation, growth and breakage phenomena in agitated wet granulation processes: a review. *Powder Technol* 11:3-39.
- [2] Hapgood KP, Litster JD, Smith R 2003. Nucleation regime map for liquid bound granules. *AIChE Journal* 49:350-361.
- [3] Laurent BFC 2005. Structure of powder flow in a planetary mixer during wet-mass granulation. *Chem Eng Sci* 60:3805-3816.
- [4] Knight PC 2001. Structuring agglomerated products for improved performance. *Powder Technol* 119:14-25.
- [5] Chulia D 1990. Compactage et granulation, JEP, Paris.
- [6] Ennis BJ, Litster JD 1997. Particle size enlargement. In Perry R, Green D (Eds), *Perry's Chemical Engineers Handbook*, 7th ed, MacGraw-Hill, New-York, USA.
- [7] Mort PR, Tardos G 1999. Scale-up of agglomeration processes using transformations. *Kona* 17:64-75.

- [8] Wauters PAL, Rutger BJ, Litster JD, Meesters GMH, Scarlett B 2002. Liquid distribution as a means to describing the granule growth mechanism. *Powder Technol* 123:166-177.
- [9] Schaefer T, Mathiesen C 1996. Melt pelletization in a high shear mixer: IX. Effects of binder particle size. *Int J Pharm* 139:139-148.
- [10] Scott AC, Hounslow MJ, Instone T 2000. Direct evidence of heterogeneity during high-shear granulation. *Powder Technol* 113:205-213.
- [11] Butensky M, Hyman D 1971. Rotary drum granulation. An experimental study of the factors affecting granule size. *Ind Eng Chem Fundam* 10:212-219.
- [12] Sherrington PJ 1968. The granulation of sand as an aid to understanding fertilizer granulation. *Chem Eng July/August*:201-215.
- [13] Nienow AW 1995. Fluidised bed granulation and coating: applications to materials, agriculture and biotechnology. *Chem Eng Commun* 139:233-253.
- [14] Newitt DM, Conway-Jones JM 1958. A contribution to the theory and practice of granulation. *Trans I Chem Eng* 36:422-441.
- [15] York P, Rowe RC 1994. Monitoring granulation size enlargement process using mixer torque rheometry. 1st Int Particle Technol Forum, Denver, USA.
- [16] Giry K, Genty M, Viana M, Wutrich P, Chulia D 2006. Multiphase versus single pot granulation process: influence of process and formulation parameters on granules properties. *Drug Dev Ind Pharm* 32:509-530.
- [17] Rumpf H 1962. The strength of granules and agglomerates. In Knepper W (Ed), *Agglomeration*. AIME, Interscience, New York, USA, 379-418.
- [18] Deleuil M 1990. Les mécanismes de croissance en granulation. *STP Pharm Sci* 6:310-315.
- [19] Iveson SM, Litster JD 1998. Growth regime map for liquid-bound granules. *AIChEJ* 44:1510-1518.
- [20] Kapur PC 1978. Balling and granulation. *Adv Chem Eng* 10:55-123.
- [21] Hoornaert F, Wauters PAL, Meesters GMH, Pratsinis SE, Scarlett B 1998. Agglomeration behaviour of powders in a Lödige mixer granulator. *Powder Technol* 96:16-128.
- [22] Capes CE, Danckwerts PV 1965. Granule formation by the agglomeration of damp powders, Part I: the mechanism of granule growth. *Trans Inst Chem Eng* 43:116-124.
- [23] Iveson SM, Wauters PAL, Forrest S, Litster JD, Meesters GMH, Scarlett B 2001. Growth regime map for liquid bound-granules: development and experimental validation. *Powder Technol* 117:83-97.

- [24] Schaefer T, Bak HH, Jaegerskou A, Kristensen A, Svensson JR, Holm P, Kristensen HG 1986. Granulation in different types of high speed mixers. Part 1: Effects of process variables and up-scaling. *Pharm Ind* 48:1083-1089.
- [25] Faure A, Grimsey IM, Rowe RC, York P, Cliff MJ 1999. Applicability of scale-up methodology for wet granulation process in Collette Gral high shear mixer-granulators. *Eur J Pharm Sci* 8:85-93.
- [26] Bock TK, Kraas U 2001. Experience with the Diosna mini-granulator and assessment of process scalability. *Eur J Pharm Biopharm* 52:297-303.
- [27] Ameye D, Keleb E, Vervaet C, Remon JP, Adams E, Massart DL 2002. Scaling-up of a lactose wet granulation process in Mi-Pro high shear mixers. *Eur J Pharm Sci* 17:247–251.
- [28] Litster J, Ennis B, Lian L 2004. In *The science and engineering of granulation processes*. Litster J and Ennis B (Eds), Kluwer academic publishers, Inc London, UK.
- [29] Duschler G, Carius W, Bauer KH 1995. Single-step granulation with microwaves preliminary studies and pilot scale results. *Drug Dev Ind Pharm* 21:1599–1610.
- [30] Stahl H 2000. Single-pot systems for drying pharmaceutical granules. *Pharm Technol Eur* 12:23–34.
- [31] Cavallari C, Albertini B, Gonzalez-Rodriguez ML, Rodriguez L 2002. Improved dissolution behavior of steam-granulated piroxicam. *Eur J Pharm Biopharm* 54:65–73.
- [32] Turchiuli C, Eloualia Z, El Mansouri N, Dumoulin E 2005. Fluidised bed agglomeration: agglomerates shape and end-use properties. *Powder Technol* 157:168-175.
- [33] Giry K, Viana M, Genty M, Louvet F, Wüthrich P, Chulia D 2008. Comparison of single pot and multiphase granulation. Part 1: Effect of the high shear granulator on granule properties according to the drug substance and its concentration. *Pharm Dev Technol*, in press.
- [34] Holm P 1997. High shear mixer granulators. In Parikh DM (Ed), *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*, Marcel Dekker Inc, New York, USA, 81:151-204.
- [35] Hausman DS 2004. Comparison of low shear, high shear and fluid bed granulation during low doses tablet process development. *Drug Dev Ind Pharm* 30:259-266.
- [36] Hiseman MJP, Laurent BFC, Bridgwater J, Wilson DI, Parker DJ, North N, Merrifield DR 2002. Granular flow in a planetary mixer. *Trans IChemE* 80:432-440.
- [37] Busignies V, Chulia D, Choisnard L, De Challemaison R, Gèze A, Stainmesse S, Siepmann J, Tchoreloff P, Viana M, Wehrlé P, Wouessidjewe D 2007. Poudres, granulés et comprimés. In Maloine (Ed), *Pharmacie galénique formulation et technologie pharmaceutique*, Paris, France.

- [38] Lustig-Gustafsson C, Kaur Johal H, Podczeck F, Newton JM 1999. The influence of water content and drug solubility on the formulation of pellets by extrusion and spheronization. *Eur J Pharm Sci* 8:147-152.
- [39] Le Hir A 1997. In Masson (Ed), *Abrégé de pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments*, 7^{ème} ed, Paris, France.
- [40] Parker MD, Rowe RC, Upjohn NG 1990. Mixer torque rheometry – A method for quantifying the consistency of wet granulations. *Pharm Tech Int* 9:52-64.
- [41] Gomez F, Saleh K, Guigon P 2001. Etude de la granulation humide en mélangeur à taux de cisaillement élevé par rhéométrie par couple de rotation. *Récents Progrès en Génie des Procédés* 15:317-322.
- [42] Leuenberger H 1982. Granulation, new techniques. *Pharm Acta Helv* 57:72-82.
- [43] Berggren J, Alderborn G 2001. Drying behaviour of two sets of microcrystalline cellulose pellets. *Int J Pharm* 219:113-126.
- [44] Airaksinen S, Karjalainen M, Räsänen E, Rantanen J, Yliruusi J 2004. Comparison of the effects of two drying methods on polymorphism of theophylline. *Int J Pharm* 276:129-141.
- [45] Giry K, Viana M, Genty M, Louvet F, Wüthrich P, Chulia D 2008. Comparison of single pot and multiphase equipment. Part 2: Effect of the drying process on granules manufactured in a single pot granulator and dried either in situ or in a fluid bed dryer. *Pharm Dev Technol*, in press.
- [46] Cooper J, Swartz CJ, Suydam Jr W 1961. Drying of tablet granulations. *J Pharm Sci* 50:67-75.
- [47] Terrier de la Chaise B, Le Perdriel F 1972. The drying of granules. *Pharm Int* 6:16-22.
- [48] Rosetto Y 1998. In Rosetto Y (Ed), *φ 41 Pharmacotechnie Industrielle*. IMT Inc, France.
- [49] Carstensen JT, Zoglio MA 1982. Tray drying of pharmaceutical wet granulations. *J Pharm Sci* 71:35-39.
- [50] Gao JZ, Gray DB, Motheram R, Hussain MA 2000. Importance of inlet air velocity in fluid bed drying of a granulation prepared in a high shear granulator. *AAPS PharmSciTech* 1:1-3.
- [51] Kristensen HG, Schaefer T 1987. Granulation, a review on pharmaceutical wet granulation. *Drug Dev Ind Pharm* 13:803-873.
- [52] Hunter B 1992. A critical review on current options in granulation techniques. *Interphex* 82:2-5.

ETUDE EXPERIMENTALE

La partie bibliographique de cette étude a justifié la mise en œuvre de la granulation humide pour la fabrication de sphéroïdes phosphocalciques pour implantation osseuse. Deux principes, faible et haut cisaillements, ont été retenus pour le travail expérimental. L'élimination du liant (amidon pré-gélatinisé ou polyvinylpyrrolidone) par traitement thermique, basée sur la température de décomposition du liant, est utilisée pour augmenter la porosité des agglomérats. Le liant de granulation fait alors fonction d'agent porogène. Les grains poreux sont ensuite chargés en ibuprofène par imprégnation sous vide.

L'objectif de cette étude est d'obtenir des grains conformes aux spécifications fixées dans le cadre de ce travail en vue de leur future utilisation en tant que biomatériaux pour implantation osseuse. Ces spécifications, basées sur les critères précédemment décrits dans l'introduction générale de ce document, sont précisées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Spécifications des sphéroïdes phosphocalciques pour implantation en site osseux

	Propriétés		Spécifications
SUBSTITUTS OSSEUX	<i>Nature</i>	Biocompatibilité Bioactivité Ostéoconduction Biorésorbabilité	Phosphate tricalcique > 95 %
	SUPPORT POREUX	<i>Morphologie</i>	Granulométrie
Sphéricité			Coefficient circularité > 0,78
<i>Texture</i>		Macroporosité formée par les espaces intergranulaires	$V_{\text{inter}} \approx 35 \%$ Taille des pores > 100 μm
		Microporosité créée par la calcination, favorable au chargement en actif	$V_{\text{intra}} \approx 35 \%$ Taille des pores = 0,2 à 10 μm
<i>Tenue mécanique</i>	Résistance à l'usure	Friabilité < 15 %	
SYSTEME DE DELIVRANCE	<i>Chargement en actif</i>	Dose thérapeutique d'ibuprofène	Teneur = 36 % (200 mg pour 550 mg de grains) Coefficient d'efficacité du chargement : maximale
	<i>Libération d'actif</i>	Aptitude à la dissolution	Quantité libérée = 100 % TW 100 % > 150 min TW 80 % > 60min
		Mécanisme de dissolution	Diffusion majoritaire

Le phosphate de calcium utilisé pour la fabrication des grains poreux est un composé biphasique, transformé majoritairement en phosphate β -tricalcique (β -TCP) par traitement thermique à 900 °C, comme indiqué par l'analyse par diffraction des rayons X (Figure 9). Le produit final est constitué de plus de 95 % de phosphate β -tricalcique et d'une faible quantité d'hydroxyapatite et peut donc être considéré comme un composé monophasique [1]. Le phosphate β -tricalcique présente l'avantage d'être biocompatible, ostéoconducteur et biorésorbable dans l'organisme [2-3].

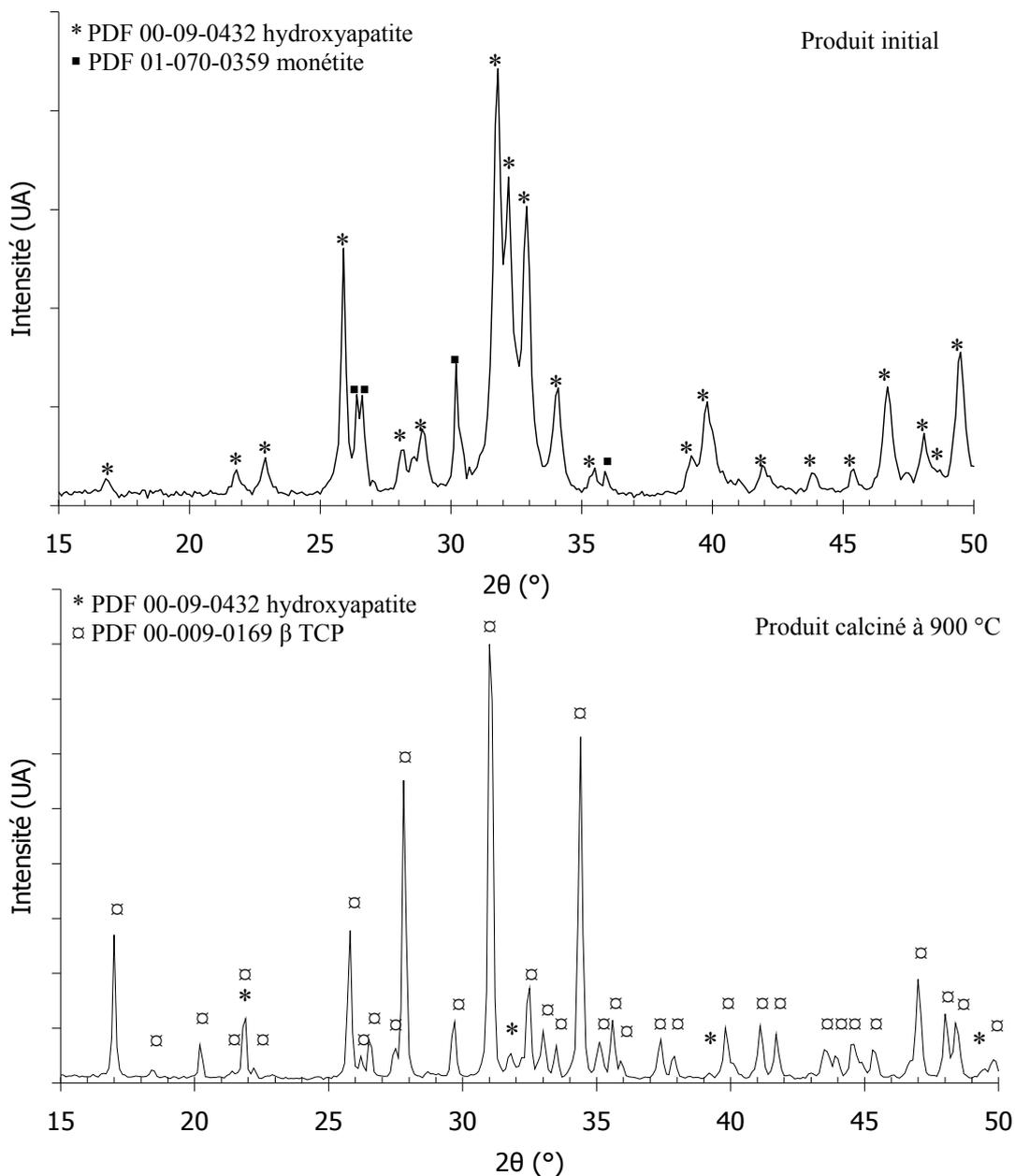


Figure 9 : Diffractogramme du phosphate de calcium initial et après calcination à 900 °C

La granulation à faible cisaillement (Figure 10) est réalisée dans un mélangeur planétaire Kenwood Chef (Kenwood Ltd, Angleterre). Le mélange pulvérulent phosphate de calcium/liant, préalablement homogénéisé dans un mélangeur à retournement (Turbula T2C, Bâle, Suisse), est transféré dans la cuve du malaxeur Kenwood pour le mouillage à l'eau distillée. La granulation proprement dite est réalisée par passage forcé de la masse humide à travers la grille d'ouverture de maille 2000 μm d'un granulateur oscillant (Erweka AR 400 type FGS, Erweka Apparatebau GmbH, Heusenstamm, Allemagne) pour former des grains.



Figure 10 : Mélangeur planétaire Kenwood Chef et granulateur oscillant Erweka

La granulation à haut cisaillement (Figure 11) est réalisée dans un mélangeur-granulateur Mi-Pro (Pro-C-epT, Zelzate, Belgique). Les conditions suivantes sont appliquées [4] :

- mélange à sec pendant 180 s à une vitesse de pale et d'émoteur de 500 rpm ;
- granulation avec une vitesse de pale et d'émoteur de 1000 rpm et un débit d'addition du liquide de mouillage de 35 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;
- sphéronisation pendant 60 s à une vitesse de 500 rpm pour la pale et l'émoteur.

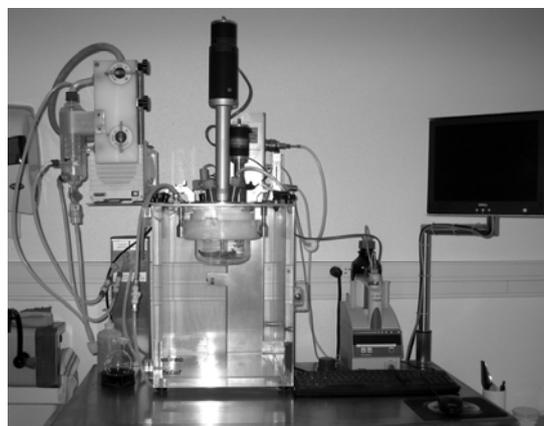


Figure 11 : Mélangeur-granulateur Mi-Pro

Les deux types de grains obtenus sont séchés en lit fluidisé (Glatt, Haltigen-Binzen/Baden, Allemagne) pendant 20 min à 60 °C (Figure 12), avant d’être calibrés sur un tamis d’ouverture de maille 1600 µm.



Figure 12 : Sécheur à lit fluidisé Glatt

La fraction granulométrique [710-1000 µm], sélectionnée après l’étape de séchage, est soumise à un traitement thermique. Ce protocole, ayant pour but d’éliminer le liant faisant alors fonction d’agent porogène afin de créer la porosité intra-granulaire, est divisé en deux phases (Figure 13) :

- montée en température jusqu’à un premier plateau (270 ou 400 °C) correspondant à la température de décomposition du liant ;
- montée en température jusqu’au deuxième plateau (700 ou 900 °C) correspondant à la température de transformation du phosphate de calcium biphasique en composé monophasique.

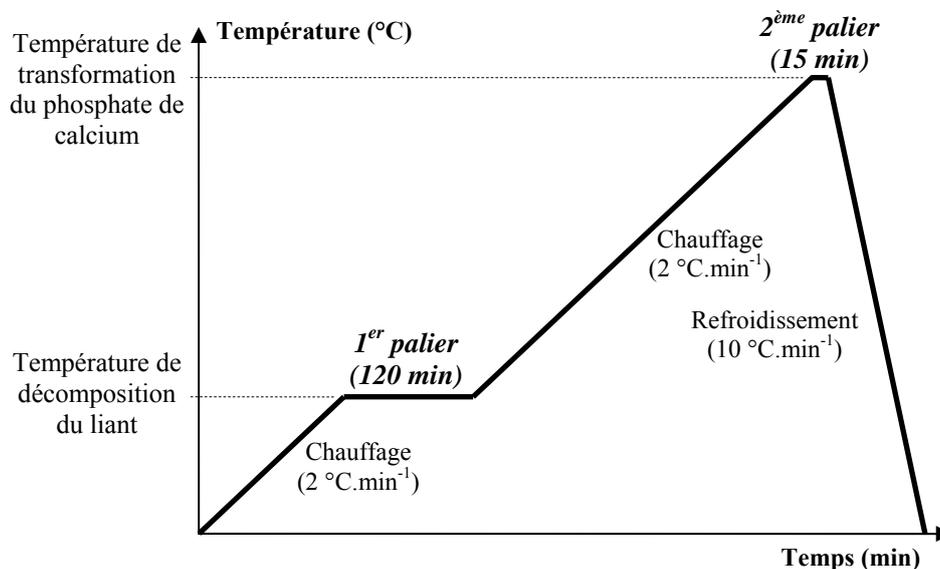


Figure 13 : Schéma du protocole de calcination

Les grains calcinés sont ensuite chargés en actif par imprégnation sous vide à partir d'une solution éthanolique d'ibuprofène dans un évaporateur rotatif (Rotavapor, Büchi, Suisse) (Figure 14) avant d'être séchés, sous vide, à température ambiante.



Figure 14 : Evaporateur rotatif Rotavapor

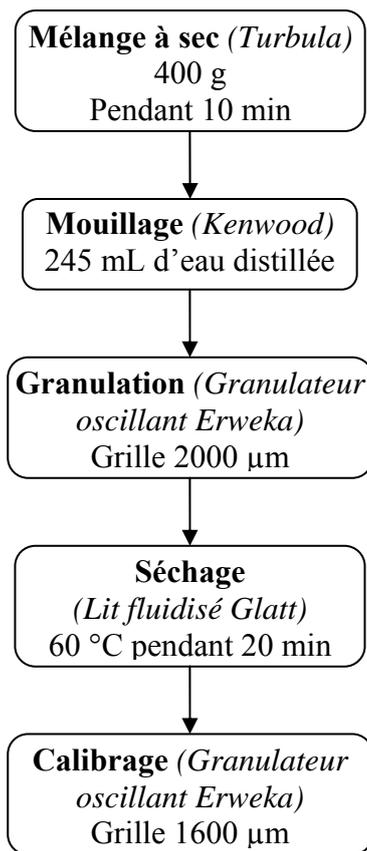
La Figure 15 récapitule les différentes étapes des procédés de fabrication des sphéroïdes poreux phosphocalciques chargés en ibuprofène.

Références

- [1] ASTM F 1088-04 Standard specification for beta-tricalcium phosphate for surgical implantation, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, United States.
- [2] LeGeros RZ 1988. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv Dent Res* 2:164-180.
- [3] Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B 1989. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mat Res* 23:883-894.
- [4] Chevalier E, Viana M, Pouget C, Chulia D 2007. Influence of process parameters on pellets elaborated in a Mi-Pro high-shear granulator. *Pharm Dev Technol* 12:133-144.

F
A
I
B
L
E

G
R
A
N
U
L
A
T
I
O
N
L
E
M
E
N
T



H
A
U
T

G
R
A
N
U
L
A
T
I
O
N
L
E
M
E
N
T

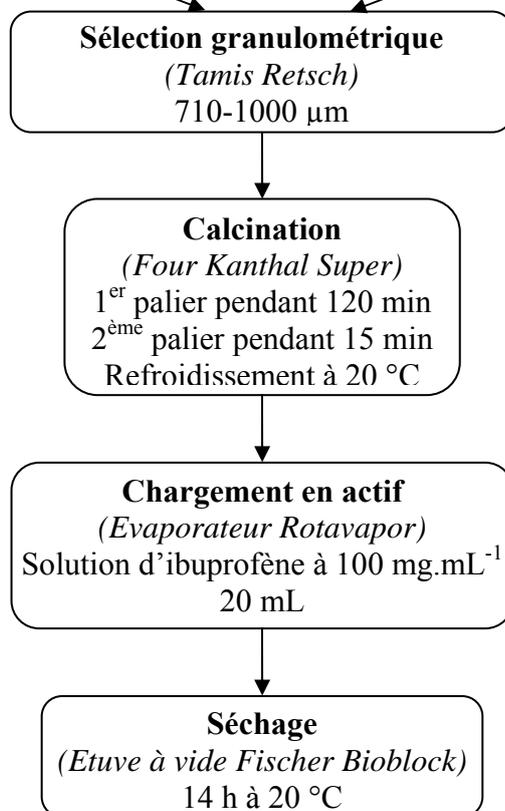
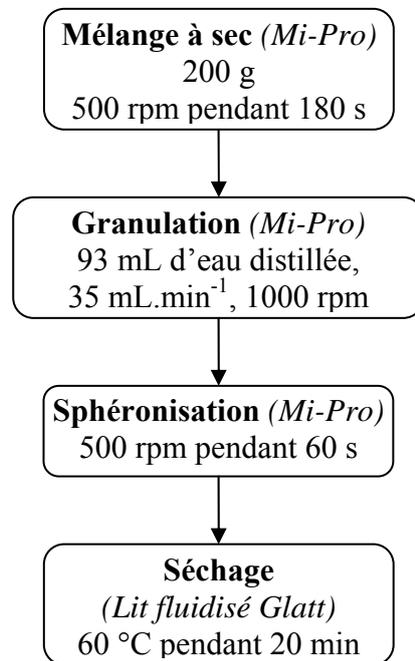


Figure 15 : Etapes des procédés de fabrication des grains

L'étude expérimentale est organisée en trois chapitres.

Le premier décrit le choix du liant de granulation et de sa concentration pour obtenir des grains conformes aux spécifications. Il définit également les conditions opératoires du traitement thermique. Il a fait l'objet d'une publication:

From porous pellet fabrication to drug loading and release: the case of calcium phosphate matrix loaded with ibuprofen.

Le deuxième chapitre compare les deux méthodes de granulation, faible et haut cisaillement. Le procédé permettant de répondre aux spécifications est ensuite validé. Deux publications ont été rédigées.

- *Comparison of low shear and high shear granulation processes: effect on implantable calcium phosphate granule properties.*

- *Validation of a fabrication process of pellets for bone filling and drug delivery*

Le dernier chapitre approfondit la caractérisation des grains destinés à l'implantation. Il tente d'expliquer par la localisation de l'ibuprofène les propriétés physico-chimiques des deux types de grains. Il évalue ensuite la capacité de trois appareils de dissolution à rendre compte de la libération *in vitro* du principe actif et met en évidence l'intérêt d'un nouveau dispositif, la cellule en T, mieux adapté à la prise en compte des conditions d'élution en milieu osseux. Il regroupe trois publications:

- *Ibuprofen loaded calcium phosphate granules: combination of innovative characterization methods to rely mechanical strength to drug location*

- *Comparison of three dissolution apparatuses for testing implantable calcium phosphate pellets used as ibuprofen delivery systems*

- *A novel application of the T cell for the flow through dissolution: the case of bioceramics used as ibuprofen carrier*

II.1. INFLUENCE DU POROGENE ET DE SA CONCENTRATION

Chevalier E, Viana M, Cazalbou S, Champion E, Chulia D.

From porous pellet fabrication to drug loading and release: the case of calcium phosphate matrix loaded with ibuprofen

Bioceramics: Properties, Preparation and Applications, Nova Sciences Publishers, in press

L'objectif de ce premier chapitre expérimental est de déterminer la formulation assurant la fabrication de grains conformes aux spécifications. Dans un premier temps, l'aptitude du procédé à haut cisaillement à granuler le phosphate de calcium est évaluée. L'influence de la nature et de la proportion de liant/porogène et de la température de calcination sur les propriétés physicochimiques des grains formés est ensuite étudiée.

L'amidon pré-gélatinisé (Sepistab ST 200, Seppic, France) et la polyvinylpyrrolidone (PVP, Kollidon 90 F, BASF, Ludwigshafen, Allemagne) sont utilisés comme liants de granulation, respectivement aux concentrations de 5 et 10 % et de 2,5 et 5 %. Les grains, préparés avec 10 % d'amidon en présence de 43,5 % v/m d'eau distillée et calcinés à 900 °C sont conformes aux spécifications et ces conditions sont donc retenues pour la suite des travaux (Tableau 2). En effet, les grains préparés avec la concentration la plus faible de chacun des liants sont moins sphériques et ceux préparés avec 5 % de PVP ne sont pas suffisamment poreux.

Les mesures de porosité par intrusion de mercure ont mis en évidence, après calcination, l'augmentation d'environ 10 % de la microporosité, correspondant à la quantité de liant initialement introduite dans le mélange de granulation. La porosité totale estimée pour un empilement de ces grains dans une cavité osseuse serait de 74 % et composée de :

- 39 % de macroporosité formée par les espaces inter-granulaires et correspondant à des pores de diamètres supérieurs à 110 μm , favorables à la colonisation par les cellules osseuses ;
- 35 % de microporosité créée par élimination du liant, correspondant à des pores de [0,2-10 μm], capables d'accueillir les molécules d'ibuprofène.

Le coefficient d'efficacité du chargement indique que la méthode d'imprégnation sous vide permet de déposer la totalité de la quantité d'ibuprofène souhaitée (364 mg par gramme de grains). La cinétique de dissolution de l'ibuprofène à partir des grains calcinés montre que la totalité de l'ibuprofène chargé dans les grains est libérée. Afin de comprendre les phénomènes mis en jeu au cours du relargage, les profils de dissolution de l'ibuprofène à partir d'un mélange physique phosphate de calcium/ibuprofène et de grains non calcinés sont également étudiés. La comparaison met en évidence l'intérêt de la granulation et de la calcination des grains pour freiner la libération de l'ibuprofène. En effet, lorsque les grains de phosphate de calcium non calcinés sont imprégnés d'ibuprofène, la libération est ralentie

(mélange physique *versus* grains non calcinés) mais s'effectue néanmoins sur un temps plus court que pour les grains calcinés (grains non calcinés *versus* grains calcinés), en raison vraisemblablement d'une moindre intrusion d'ibuprofène dans les grains et de la présence de l'amidon qui gonfle en milieu aqueux entraînant la désagrégation des grains. Dans le cas des grains calcinés, la dissolution est majoritairement contrôlée par un mécanisme de diffusion.

Tableau 2 : Récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques et lyopharmaceutiques des sphéroïdes préparés en présence de 10 % d'amidon pré-gélatinisé et calcinés à 900 °C

Propriétés	Caractéristiques des grains	Spécifications	Conformité
<i>Nature</i>	Phosphate tricalcique	Phosphate tricalcique > 95 %	Oui
<i>Granulométrie</i>	791 µm	$d_{0,5} \approx 800 \mu\text{m}$	Oui
<i>Sphéricité</i>	0,83	Coefficient circularité > 0,78	Oui
<i>Macroporosité</i>	40 %	$V_{\text{inter}} \approx 35 \%$	Oui
	> 100 µm	Taille des pores > 100 µm	Oui
<i>Microporosité</i>	35 %	$V_{\text{intra}} \approx 35 \%$	Oui
	[0,09-0,4 µm] [0,4-5 µm]	Taille des pores = 0,2 à 10 µm	Oui
<i>Chargement en ibuprofène</i>	36,5 %	Teneur = 36 %	Oui
	101,5 %	Coefficient d'efficacité du chargement : maximal	Oui
<i>Aptitude à la dissolution</i>	100 %	Quantité libérée = 100 %	Oui
	210 min	TW 100 % > 150 min	Oui
	103 min	TW 80 % > 60min	Oui
<i>Mécanisme de dissolution</i>	Diffusion	Diffusion majoritaire	Oui

II.2. INFLUENCE DU PROCEDE DE GRANULATION

II.2.1. Granulation à faible et à haut cisaillement : étude comparée des procédés

Chevalier E, Viana M, Cazalbou S, Chulia D.

Comparison of low shear and high shear granulation processes: effect on implantable calcium phosphate granule properties

Drug Development and Industrial Pharmacy, soumise

II.2.2. Validation du procédé d'élaboration des sphéroïdes

Chevalier E, Viana M, Cazalbou S, Chulia D.

Validation of a fabrication process of pellets for bone filling and drug delivery

Journal of Drug Delivery Science and Technology, acceptée le 2 septembre 2008

Le chapitre II.1. a montré l'aptitude de la granulation à haut cisaillement, suivie d'un traitement thermique, à élaborer des sphéroïdes poreux à base de phosphate de calcium et a permis de préciser la formule et les conditions de calcination permettant l'obtention de grains conformes aux spécifications : 10 % m/m d'amidon prégélatinisé, 43,5 % v/m d'eau distillée, température de calcination 900 °C.

L'objectif étant d'augmenter la porosité des agglomérats tout en conservant une bonne tenue mécanique, le chapitre II.2. étudie, à formule constante, l'effet du procédé. La première section compare la granulation à haut cisaillement, définie précédemment, à la granulation à faible cisaillement, réalisée à l'aide du mélangeur planétaire Kenwood Chef (Kenwood Ltd, Angleterre) et du granulateur oscillant (Erweka Apparatebau, Allemagne). Cette section a fait l'objet d'une publication :

Comparison of low shear and high shear granulation processes: effect on implantable calcium phosphate granule properties.

La deuxième section s'attache à valider le procédé de fabrication le plus approprié. Cette étude a fait l'objet d'une publication :

Validation of a fabrication process of pellets for bone filling and drug delivery.

II.2.1. Granulation à faible et à haut cisaillement : étude comparée des procédés

Chevalier E, Viana M, Cazalbou S, Chulia D.

Comparison of low shear and high shear granulation processes: effect on implantable calcium phosphate granule properties

Drug Development and Industrial Pharmacy, soumise

Cette section compare les propriétés physicochimiques de grains obtenus respectivement par granulation à faible et à haut cisaillements. La transposition en mélangeur à faible cisaillement de la formule 10 % d'amidon-90 % de phosphate de calcium, mise au point en mélangeur Mi-Pro (43,5 % v/m d'eau) dans le chapitre II.1., a nécessité un ajustement du volume de liquide de mouillage (61,3 % v/m d'eau) pour obtenir des grains Kenwood de granulométrie similaire à celle des sphéroïdes obtenus dans le Mi-Pro. L'incidence du procédé de granulation sur l'ensemble des caractéristiques physico-chimiques et sur les cinétiques de libération de l'ibuprofène est évaluée.

Les résultats expérimentaux indiquent que la granulation à faible cisaillement conduit à la formation d'agglomérats présentant un diamètre médian d'environ 800 μm . Cependant, ils sont moins sphériques et plus irréguliers que ceux obtenus par granulation à haut cisaillement, comme l'indiquent les faibles coefficients de circularité et les valeurs de surface spécifique plus élevées. La masse volumique vrac des sphéroïdes Mi-Pro est logiquement augmentée, en raison d'une densification plus importante sous l'effet du fort cisaillement de la pale dans le mélangeur-granulateur. Ainsi, les grains Mi-Pro présentent un meilleur réarrangement initial. Toutefois, après tassement, les deux types de grains présentent la même masse volumique, indiquant une compacité similaire sous faible contrainte. La résistance mécanique des grains est également affectée par la méthode de granulation. En effet, la moindre densification des agglomérats en mélangeur Kenwood et granulateur oscillant leur confère une friabilité trois fois plus élevée que celle des sphéroïdes Mi-Pro. Considérant les paramètres de forme, la maniabilité et la tenue mécanique, les grains Mi-Pro semblent donc plus favorables à une utilisation en tant qu'implants osseux. Les deux procédés de granulation conduisent à l'élaboration d'agglomérats poreux présentant des plages de tailles de pores voisines, respectivement [90-400 nm]-[400-10000 nm] pour les grains Kenwood et [90-300 nm]-[300-10000 nm] pour les sphéroïdes Mi-Pro. En revanche, le taux de microporosité est plus important dans le cas des grains Kenwood (41,30 % *versus* 34,90 %), en relation avec leur faible masse volumique vrac et leur friabilité élevée. La comparaison des volumes poreux avant et après calcination indique une augmentation de l'ordre de 10 % pour les deux types de grains, en accord avec la teneur initiale en amidon pré-gélatinisé.

L'étude des porogrammes après chargement de l'actif montre, pour les deux voies d'élaboration, le comblement de la porosité intra-granulaire par l'ibuprofène.

Le coefficient d'efficacité du chargement confirme que la totalité de la quantité d'ibuprofène visée (364 mg par gramme de grains soit 36 %) peut être déposée sur les deux types d'agglomérats. Néanmoins, les grains Kenwood et Mi-Pro présentant des textures poreuses légèrement différentes, la répartition de l'ibuprofène au cœur et à la surface des grains est susceptible d'être affectée. Une étude approfondie de la localisation de l'ibuprofène fera l'objet du chapitre II.3. de ce document. Pour la teneur de 36 % en ibuprofène, les cinétiques de dissolution *in vitro* mettent en évidence une libération légèrement plus rapide dans le cas des grains Kenwood. Toutefois, la comparaison statistique des profils de dissolution des deux types de grains ne permet pas de conclure à une différence significative. Enfin, le procédé de granulation n'affecte pas le mécanisme de dissolution qui est, dans les deux cas, majoritairement contrôlé par la diffusion.

Le Tableau 3 récapitule les caractéristiques des deux types de grains et confirme que les sphéroïdes Mi-Pro sont conformes aux spécifications retenues pour cette application en tant que biomatériau chargé en actif.

Tableau 3 : Caractéristiques et spécifications des grains Kenwood et des sphéroïdes Mi-Pro

Propriétés	Kenwood	Mi-Pro	Spécifications
<i>Nature</i>	Phosphate tricalcique	Phosphate tricalcique	Phosphate tricalcique > 95 %
<i>Granulométrie</i>	858 µm	791 µm	$d_{0,5} \approx 800 \mu\text{m}$ $d_g \leq 1,40$
<i>Sphéricité</i>	0,76	0,83	Coefficient circularité > 0,78
<i>Macroporosité</i>	33 %	40 %	$V_{\text{inter}} \approx 35 \%$
	> 100 µm	> 100 µm	Taille des pores > 100 µm
<i>Microporosité</i>	41 %	35 %	$V_{\text{intra}} \approx 35 \%$
	[0,09-5 µm]	[0,09-0,4 µm] [0,4-5 µm]	Taille des pores = 0,2 à 10 µm
<i>Résistance à l'usure</i>	21,3 %	12,1 %	Friabilité < 15 %
<i>Chargement en ibuprofène</i>	36,8 %	36,5 %	Teneur = 36 %
	102,3 %	101,5 %	Coefficient d'efficacité du chargement : maximal
<i>Aptitude à la dissolution</i>	100 %	100 %	Quantité libérée = 100 %
	135 min	210 min	TW 100 % > 150 min
	53 min	66 min	TW 80 % > 60min
<i>Mécanisme de dissolution</i>	Diffusion	Diffusion	Diffusion majoritaire

Les cases grisées correspondent aux résultats non conformes

II.2.2. Validation du procédé de fabrication des sphéroïdes

Chevalier E, Viana M, Cazalbou S, Chulia D.

Validation of a fabrication process of pellets for bone filling and drug delivery

Journal of Drug Delivery Science and Technology, acceptée le 2 septembre 2008

Les sphéroïdes, préparés par granulation humide à haut cisaillement puis calcination et fonctionnalisation, sont conformes aux spécifications définies pour leur emploi en tant que biomatériaux et systèmes de délivrance du principe actif. Ils sont plus sphériques et plus résistants que les grains préparés par granulation à faible cisaillement. Leur aptitude à être fonctionnalisés par chargement d'ibuprofène a également été démontrée, ainsi que leur capacité à prolonger la mise à disposition du principe actif.

L'objectif de cette deuxième section est de valider l'ensemble du procédé de fabrication, incluant les étapes successives de granulation, calcination et chargement, sur la base des caractéristiques des grains obtenus qui définissent leur qualité d'usage.

Quatre lots de grains sont produits (lots 1 à 4) (Figure 16) et la comparaison de leurs propriétés physico-chimiques (masse volumique pycnométrique, surface spécifique, coefficient de circularité, porosité) permet de conclure à la reproductibilité du procédé de granulation à haut cisaillement (coefficient de variation : $CV < 3\%$). Après calcination, les faibles CV ($< 2,5\%$) de ces mêmes caractéristiques attestent de la reproductibilité des effets induits par le traitement thermique.

La reproductibilité du procédé de fabrication des grains chargés est ensuite évaluée par la comparaison de trois fractions (A, B, C) issues de chacun des lots, ayant fait respectivement l'objet d'une procédure d'imprégnation.

Les profils de dissolution de trois échantillons (1, 2, 3) de chacune de ces fractions sont comparés (1^{er} niveau) sur la base de la quantité d'ibuprofène libérée (Q, %) pour chaque temps de prélèvement et des aires sous la courbe (AUC, %.min) (Figure 16). Les valeurs des CV (5 % et 6 %) démontrent respectivement l'homogénéité de la teneur en ibuprofène de chaque fraction et la reproductibilité de la méthode de dissolution.

La reproductibilité du protocole de chargement est mise en évidence par le CV ($< 4,5\%$) de l'AUC des neuf cinétiques de dissolution obtenues pour chaque lot (2^{ème} niveau).

Enfin, le coefficient de variation des 36 AUC des profils de dissolution ainsi que l'analyse de variance des quantités maximales d'ibuprofène dissous valident la

reproductibilité de l'ensemble du procédé de fabrication des grains fonctionnalisés (3^{ème} niveau).

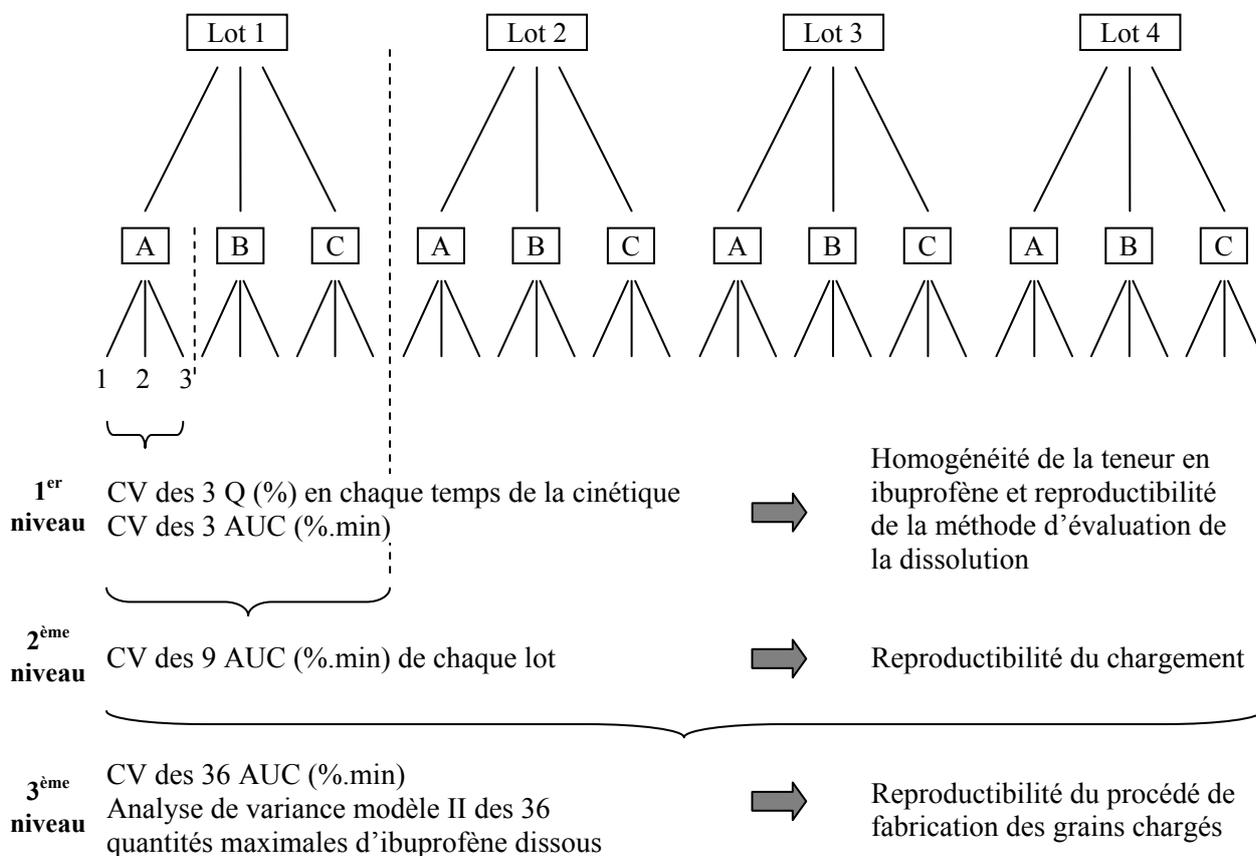


Figure 16 : Schéma des étapes de validation du procédé de fabrication des sphéroïdes poreux chargés en ibuprofène

Chaque étape du protocole de fabrication, granulation, traitement thermique, chargement de l'ibuprofène, est reproductible, autorisant ainsi le tracé d'un profil de dissolution unique (moyenne des 36 cinétiques) pour lequel la modélisation indique une libération majoritairement contrôlée par un mécanisme de diffusion.

II.3. CARACTERISATION APPROFONDIE DES AGGLOMERATS FONCTIONNALISES

II.3.1. Localisation de l'ibuprofène : effet sur les propriétés mécaniques et texturales

Chevalier E, Viana M, Cazalbou S, Makein L, Dubois J, Chulia D.

Ibuprofen loaded calcium phosphate granules: combination of innovative characterization methods to rely mechanical strength to drug location

Acta Biomaterialia, soumise

II.3.2. Cinétiques de dissolution : comparaison appareil à palette/appareil à pistons/cellule à flux continu

Chevalier E, Viana M, Artaud A, Chomette L, Haddouchi S, Devidts G, Chulia D.

Comparison of three dissolution apparatuses for testing implantable calcium phosphate pellets used as ibuprofen delivery systems

AAPS PharmSciTech, soumise

II.3.3. Intérêt méthodologique de la cellule en T

Chevalier E, Viana M, Artaud A, Haddouchi S, Chulia D.

A novel application of the T cell for the flow through dissolution: the case of bioceramics used as ibuprofen carrier

Talanta, acceptée le 21 septembre 2008

L'étude des procédés de fabrication des agglomérats implantables conduite dans le chapitre II.2. a mis évidence, dans les conditions expérimentales retenues, la supériorité de la granulation à haut cisaillement à produire des grains conformes aux spécifications.

Afin de parfaire la compréhension des différences induites par le procédé, le troisième chapitre approfondit, par la mise en œuvre de méthodes originales, l'évaluation des caractéristiques pharmaco-techniques de grains fonctionnalisés par des teneurs en actif variant de 1,75 à 46 %. Il tente d'expliquer les propriétés observées par la localisation de l'ibuprofène au cœur et en surface des grains. L'incidence de la distribution de la molécule active sur sa mise à disposition est évaluée par la réalisation d'essais de dissolution *in vitro*.

Seront abordés successivement :

- l'impact de la localisation de l'ibuprofène sur les propriétés physico-chimiques et mécaniques des grains, dans la publication :

Ibuprofen loaded calcium phosphate granules: combination of innovative characterization methods to rely mechanical strength to drug location;

- l'étude des cinétiques de libération de l'actif, à partir des grains fonctionnalisés, grâce à trois appareils de dissolution standardisés. Une publication rapporte ces investigations :

Comparison of three dissolution apparatuses for testing implantable calcium phosphate pellets used as ibuprofen delivery systems;

- l'intérêt de la cellule en T pour l'étude des cinétiques de libération de l'ibuprofène à partir des substituts osseux, sensibles aux conditions hydrodynamiques. Cette section a fait l'objet d'une publication :

A novel application of the T cell for the flow through dissolution: the case of bioceramics used as ibuprofen carrier.

II.3.1. Localisation de l'ibuprofène : effet sur les propriétés mécaniques et texturales

Chevalier E, Viana M, Cazalbou S, Makein L, Dubois J, Chulia D.

Ibuprofen loaded calcium phosphate granules: combination of innovative characterization methods to rely mechanical strength to drug location

Acta Biomaterialia, soumise

Ainsi qu'il a été vu dans les chapitres précédents, les sphéroïdes Mi-Pro, à la fois avant fonctionnalisation et après chargement avec 36 % d'ibuprofène, satisfont mieux aux spécifications que les grains Kenwood. Cette section tente de progresser dans la compréhension de ces différences en approfondissant les caractéristiques des grains chargés, en particulier en précisant la localisation de l'ibuprofène. L'objectif est de relier les propriétés finales des grains chargés aux caractéristiques initiales. Pour cela, des investigations originales sont menées sur des grains Kenwood et Mi-Pro imprégnés avec différentes teneurs en ibuprofène (1,75 ; 3,5 ; 7 ; 12,5 ; 36 et 46 %).

La mise en œuvre de la microindentation permet de compléter la caractérisation mécanique des grains avant chargement. En effet, il a été montré précédemment que la morphologie et l'état de surface des grains Mi-Pro favorisent leur faible friabilité. Les mesures de résistance à la rupture prouvent que la meilleure tenue mécanique est également reliée à la cohésion deux fois plus élevée des sphéroïdes.

Le chargement en ibuprofène améliore la résistance mécanique des deux types de grains et maintient la supériorité des sphéroïdes Mi-Pro sur toute la gamme de concentrations. Par ailleurs, la résistance augmente, dans les deux cas, de manière plus importante à partir de 22 % d'ibuprofène. Deux hypothèses sur la localisation de l'actif sont suggérées pour expliquer ces deux régimes :

- les pores se remplissent progressivement jusqu'à une valeur seuil au-delà de laquelle la totalité du volume poreux est occupé et l'addition d'ibuprofène supplémentaire ne peut avoir lieu qu'en surface des grains ;
- la surface des grains est initialement recouverte d'ibuprofène et les pores sont progressivement comblés par augmentation de la quantité déposée.

Entre ces deux situations limites, un cas intermédiaire correspondrait à la coexistence des deux phénomènes dont la contribution respective varierait avec la concentration en ibuprofène.

L'analyse de surface par spectrométrie infrarouge révèle la présence externe d'ibuprofène dès les premières concentrations, pour les deux types de grains. L'intensité du signal augmente avec la teneur en actif de manière similaire, pour les deux procédés, jusqu'à 22 %. Au-delà, le dépôt de surface est plus important, en particulier pour les sphéroïdes Mi-Pro pour lesquels il est également plus régulier.

Simultanément le chargement en ibuprofène conduit à une réduction du volume poreux. Pour les grains Kenwood, la porosité diminue linéairement sur toute la gamme de concentration en actif, pour les deux plages de pores identifiées après calcination. Dans le cas des sphéroïdes Mi-Pro, le comblement des pores les plus grands suit la même évolution que dans le cas des grains Kenwood alors que le volume des petits pores, pratiquement comblé pour une teneur en ibuprofène de 22 %, n'évolue plus au-delà.

Le croisement des résultats précédents démontre que le dépôt d'ibuprofène s'effectue simultanément en surface et au cœur des pores, dès les plus faibles teneurs en actif. Lorsque le volume poreux est pratiquement comblé, le dépôt en surface devient prédominant. Ce phénomène est noté dès 22 % d'actif et de manière plus marquée pour les sphéroïdes Mi-Pro, en raison de leur moindre porosité intra-granulaire. La résistance à la rupture augmente de façon concomitante et est d'autant plus élevée que le dépôt de surface est important, expliquant ainsi la meilleure tenue mécanique des grains Mi-Pro. Cependant, un dépôt de surface excessif, dû à une concentration trop élevée d'ibuprofène ($\geq 46\%$), compromet la résistance mécanique des grains.

II.3.2. Cinétiques de dissolution : comparaison appareil à palette/appareil à pistons/cellule à flux continu

Chevalier E, Viana M, Artaud A, Chomette L, Haddouchi S, Devidts G, Chulia D.
Comparison of three dissolution apparatuses for testing implantable calcium phosphate pellets used as ibuprofen delivery systems
AAPS PharmSciTech, soumise

L'analyse de composition de surface et le suivi de la porosité des deux types de grains en fonction de la quantité d'actif chargé, a montré que l'ibuprofène se dépose à la fois dans les pores et à la surface des grains. Lorsque la porosité est comblée, le dépôt en surface devient majoritaire. Dans la mesure où les grains Mi-Pro présentent un volume poreux légèrement plus faible, il a été mis en évidence un dépôt surfacique plus important sur ces grains. Cette différence de répartition cœur/surface de l'ibuprofène étant susceptible de modifier la mise à disposition de la molécule active à partir des deux types de grains, une étude comparative des cinétiques de dissolution est réalisée.

L'objectif de cette section est d'étudier l'influence de la localisation de l'ibuprofène sur les cinétiques de libération de la molécule active. Pour cela, des essais de dissolution *in vitro* sont conduits sur des grains chargés avec des concentrations croissantes en ibuprofène, caractéristiques de l'évolution de la localisation (dépôt simultané cœur/surface, comblement de la porosité, dépôt en surface). Les essais de dissolution d'actif à partir de substituts osseux n'étant pas normalisés à l'heure actuelle, trois appareils de dissolution, décrits à la Pharmacopée Européenne pour l'étude des formes pharmaceutiques sont utilisés : l'appareil à palette, l'appareil à pistons et la cellule à flux continu (Figure 17).

Les profils de dissolution de l'ibuprofène obtenus pour chaque appareil et chaque type de grains mettent en évidence l'aptitude des deux types de grains à libérer la totalité de l'ibuprofène présent. En revanche, seule la cellule à flux continu permet l'analyse de l'ensemble des teneurs. En effet, dans le cas des appareils à palette ou à pistons, en raison des configurations utilisées (taille des bols, volume du milieu de dissolution), les concentrations en ibuprofène dissous dans le milieu, pour les grains les moins chargés, sont trop faibles pour permettre un dosage précis. Afin de limiter ces inconvénients, deux types d'ajustement pourraient être mis en œuvre :

- une réduction du volume de milieu de dissolution, qui nécessite l'utilisation d'accessoires plus petits ;
- une augmentation de la taille de l'échantillon soumis à l'essai, qui est parfois difficile à obtenir dans les phases précoces de développement.

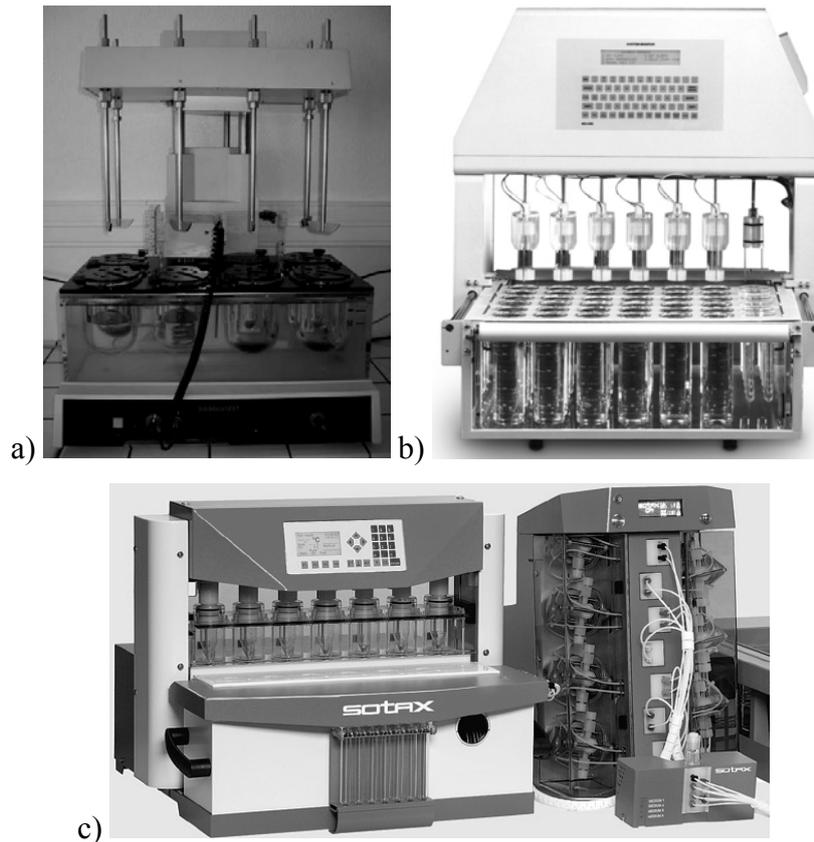


Figure 17 : Appareils de dissolution a) appareil à palette (Dissolution Tester, Prolabo), b) appareil à pistons (Bio-Dis, Varian) et c) cellule à flux continu (CE 7smart, Sotax)

La libération d'ibuprofène semble plus rapide dans l'appareil à pistons, toutefois cette différence n'est statistiquement significative que pour les grains chargés avec 36 % d'ibuprofène. Les valeurs de TW 80 %, correspondant au temps nécessaire pour dissoudre 80 % du principe actif, augmentent avec l'augmentation de teneur en actif. Ce phénomène est cependant moins marqué dans l'appareil à pistons en raison du mouvement, basé sur le principe de l'appareil de désagrégation des comprimés, qui sollicite fortement les grains, entraînant leur dégradation partielle. Par conséquent, l'appareil à pistons ne semble pas générer des conditions hydrodynamiques adaptées à la caractérisation de systèmes de délivrance prolongée d'actif.

L'étude de la vitesse initiale de dissolution montre que les sphéroïdes Mi-Pro libèrent plus lentement l'ibuprofène que les grains Kenwood. Dans le cas des tests réalisés en appareil à pistons, les conditions mentionnées précédemment, masquent cette différence, limitant le pouvoir discriminant de la méthode. De plus, cette vitesse diminue de l'appareil à palette à l'appareil à pistons et à la cellule à flux continu.

Bien que les trois appareillages soient basés sur des modalités d'échanges échantillon/milieu de dissolution différents, ils mettent tous en évidence une dissolution principalement diffusionnelle. Toutefois, la prévalence de cette diffusion sur le mécanisme d'érosion est plus nette dans le cas de la cellule à flux continu.

Les valeurs de TW 80 %, déterminées à partir des cinétiques de libération pour les sphéroïdes Mi-Pro, sont supérieures à celles obtenues pour les grains Kenwood, avec chaque dispositif de dissolution. Ces valeurs sont probablement liées à un dépôt d'ibuprofène en surface plus régulier sur les sphéroïdes et à leur plus faible porosité qui limite l'invasion par le milieu de dissolution et retarde donc la libération de l'actif. Ainsi, les grains Kenwood, plus poreux, présentent un dépôt en surface plus limité que les grains Mi-Pro, favorisant l'accessibilité du milieu de dissolution à l'ibuprofène contenu dans les pores. Néanmoins, la comparaison des profils ne met pas en évidence de différence significative entre les deux types de grains.

Contrairement aux résultats de spectrométrie infrarouge et de porosimétrie, l'évolution du TW 80 % et de la vitesse initiale de dissolution en fonction de la teneur en ibuprofène est régulière sur toute la plage de concentrations étudiées. L'évolution de la localisation de l'actif précédemment décrite (Section II.3.1) ne semble donc pas avoir d'incidence sur la mise à disposition de l'ibuprofène. Ceci peut être lié à une proportion d'ibuprofène en surface très largement majoritaire par rapport à la fraction incluse dans les pores, pour toutes les concentrations étudiées, masquant ainsi les variations de répartition. D'autres conditions expérimentales plus discriminantes mériteraient, par ailleurs, d'être explorées afin d'évaluer plus précisément l'impact de la localisation de l'ibuprofène.

La dégradation des grains induite par l'appareil à pistons d'une part et d'autre part la dilution trop importante dans le cas de l'appareil à palette, incitent à retenir la cellule à flux pour l'évaluation de la libération de l'ibuprofène à partir de grains phosphocalciques. Toutefois, quelle que soit la méthode de dissolution, les cinétiques de libération de l'ibuprofène sont relativement courtes (5 h) et les conditions expérimentales peu appropriées à l'application visée en tant que biomatériaux implantables. Il sera donc nécessaire d'envisager la mise en œuvre de conditions hydrodynamiques (mouvement et volume du milieu de dissolution) plus proches de celles rencontrées dans le tissu osseux.

II.3.3. Intérêt méthodologique de la cellule en T

Chevalier E, Viana M, Artaud A, Haddouchi S, Chulia D.

A novel application of the T cell for the flow through dissolution: the case of bioceramics used as ibuprofen carrier

Talanta, acceptée le 21 septembre 2008

Les appareils normalisés de la Pharmacopée Européenne (appareil à palette, appareil à pistons, cellule à flux continu) ont permis l'étude des cinétiques de libération *in vitro* de l'ibuprofène. Cependant, une meilleure adéquation des conditions expérimentales aux conditions hydrodynamiques des fluides irrigant le tissu osseux permettrait une analyse plus pertinente de la mise à disposition *in situ* de la molécule active.

Cette section présente l'utilisation d'un prototype de cellule de dissolution, développé à partir de l'appareillage à flux continu, pour l'évaluation de la libération de molécules actives à partir de dispositifs médicaux implantables. Ce module, remplaçant la cellule classique par une cellule en T (Figure 18), a été initialement conçu pour l'étude de microsphères chargées pour embolisation puis appliqué aux stents [1-2]. En effet, ces systèmes sont soumis, pendant des temps longs, à une élution diffusionnelle par les fluides biologiques, mieux simulée par la cellule en T. Les substituts phosphocalciques fonctionnalisés étant destinés à être confinés dans des cavités osseuses faiblement irriguées, la libération de leur actif se fait dans un flux non turbulent, sur de longues périodes. La similitude des conditions physiologiques de libération justifie l'utilisation de la cellule en T : les grains Kenwood et Mi-Pro chargés avec 22 et 36 % d'ibuprofène sont soumis à l'étude.

L'utilisation de la cellule en T prolonge la libération de l'ibuprofène à partir de chaque type de grains, pour les deux teneurs en principe actif. En effet, les valeurs de TW 80 % sont dix fois plus élevées que celles obtenues avec la cellule classique. Cependant, malgré une libération en apparence plus rapide à partir des grains Kenwood, la différence entre les profils de dissolution n'est pas significative et la cellule en T ne crée pas de conditions plus discriminantes que la cellule classique.

Les mécanismes de contrôle de la libération sont à la fois la diffusion et l'érosion, l'effet de l'érosion étant plus marqué dans le cas de la cellule en T, probablement en raison de la durée de l'essai (45 h versus 5 h avec la cellule classique). Toutefois, malgré ce phénomène d'érosion, l'intégrité apparente des deux types de grains est maintenue jusqu'à la fin de l'essai en raison des conditions hydrodynamiques induites par la conception de la cellule, démontrant la tenue des grains en milieu liquide et le maintien de leur potentiel ostéoconducteur après relargage de l'actif.

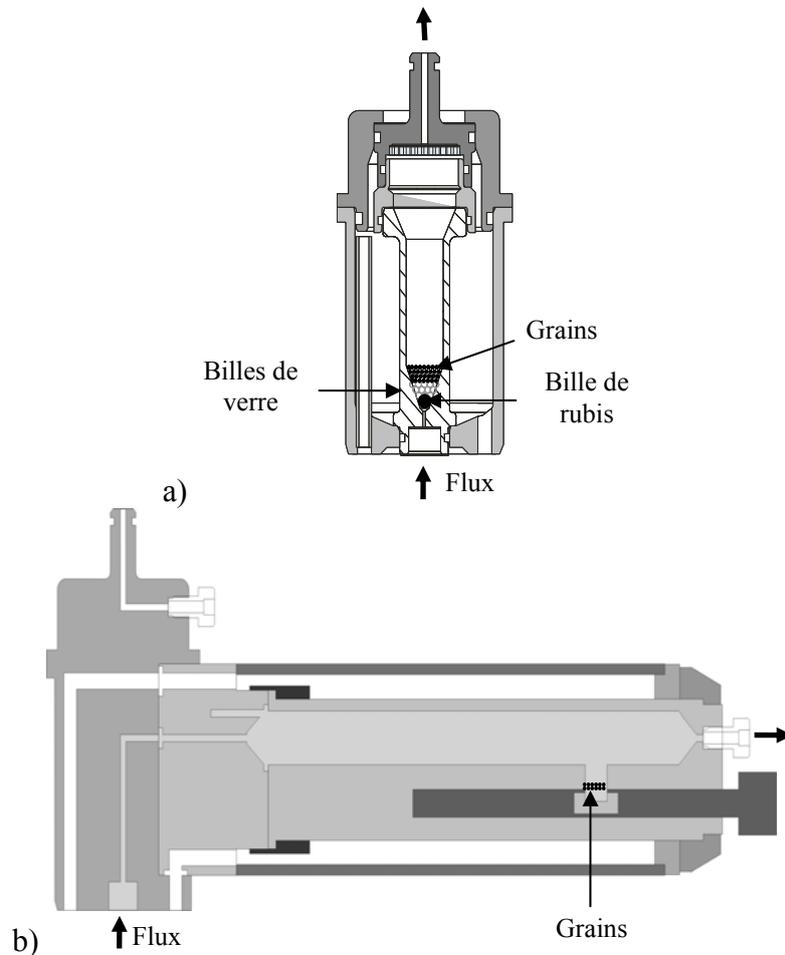


Figure 15 : Représentation schématique des cellules à flux continu

a) cellule classique et b) cellule en T

L'utilisation de la cellule en T semble ainsi plus adaptée à l'étude des cinétiques de libération de l'ibuprofène chargé dans les grains phosphocalciques destinés à l'implantation osseuse. De plus, les volumes de dissolution et les conditions hydrodynamiques mis en jeu sécuriseront les corrélations *in vitro/in vivo*.

Références

[1] Amyot F, Boudy V, Jurski K, Counord JL, Guiffant G, Dufaux J, Chaumeil JC 2002. A new experimental method for the evaluation of the release profiles of drug-loaded microbeads designed for embolisation. *ITBM-RBM* 23:285-289.

[2] Borovac T, Pelage JP, Kasselouri A, Prognon P, Guiffant G, Laurent A 2006. Release of ibuprofen from beads for embolization: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Control Release* 115:266-274.

CONCLUSION

Une problématique majeure de ces dernières décennies est la demande croissante de la chirurgie orthopédique en substituts osseux. Parmi les biomatériaux synthétiques, les biocéramiques phosphocalciques sont aujourd'hui largement développées en raison de leur composition chimique proche de celle de la phase minérale de l'os. Elles présentent également l'intérêt de pouvoir être fonctionnalisées par ajout de molécules thérapeutiques, ce qui leur confère la propriété supplémentaire de libération localisée d'un principe actif. Ces substituts peuvent se présenter sous différentes formes. Dans le cas de lacunes osseuses de formes complexes, le contact intime biomatériaux/berges osseuses et le maintien d'une porosité nécessaires à l'ostéoconduction sont difficiles à obtenir. En effet, les ciments phosphocalciques s'adaptent parfaitement à la cavité à combler mais ne présentent généralement pas une porosité suffisante. A l'inverse, les blocs peuvent présenter un volume poreux très favorable mais leur usage est limité à des zones de géométrie régulière. L'objectif de ce travail a donc été d'élaborer des sphéroïdes poreux à base de phosphate de calcium chargés en principe actif, l'ibuprofène, et présentant à la fois l'aptitude à combler des lacunes complexes et à libérer *in situ* cette molécule anti-inflammatoire. Cette étude a combiné un procédé de fabrication bien connu en pharmacie, la granulation humide, et une technique utilisée dans le domaine des biomatériaux pour créer de la porosité, l'élimination d'un porogène par calcination.

Les travaux exposés dans le premier chapitre de la partie expérimentale ont permis le choix du liant (nature et concentration) le plus apte à la granulation humide du phosphate de calcium et des paramètres opératoires assurant la fabrication, par granulation à haut cisaillement puis calcination, de sphéroïdes poreux conformes aux spécifications fixées dans le cadre de leur application en tant qu'implants osseux. La sélection de l'amidon pré-gélatinisé à une concentration de 10 % comme liant de granulation a permis la fabrication de grains présentant un diamètre médian d'environ 800 μm , assurant la création d'espaces intergranulaires, d'environ 150 μm , favorables à la recolonisation osseuse. L'élimination par calcination de l'amidon pré-gélatinisé, faisant également fonction d'agent porogène, a permis d'augmenter d'environ 10 % la porosité intra-granulaire ; porosité favorable aux échanges liquidiens *in situ* et à l'inclusion d'actif. La porosité totale estimée pour un empilement de ces grains dans une cavité osseuse serait ainsi de 74 %.

Sur la base de cette formulation, deux procédés de granulation, à faible et à haut cisaillement, ont été comparés dans le deuxième chapitre. Bien que légèrement moins poreux,

les sphéroïdes Mi-Pro, obtenus par granulation humide à haut cisaillement, sont plus sphériques et moins friables que ceux élaborés par granulation à faible cisaillement (grains Kenwood) ; en outre, ils permettent de prolonger la libération de l'ibuprofène. Ils sont en tous points conformes aux spécifications et sont donc, dans les conditions mises en œuvre, de meilleurs candidats que les grains Kenwood pour l'application visée.

Dans le dernier chapitre, des méthodes de caractérisation originales ont été mises en œuvre pour l'évaluation des propriétés physico-technologiques des deux types de grains chargés avec des teneurs variables en ibuprofène. Ainsi, une augmentation de la résistance mécanique des grains, en fonction du chargement en ibuprofène, a été mise en évidence. L'apport combiné de la spectrométrie infrarouge et de la porosimétrie au mercure a permis d'élucider les séquences de dépôt de l'ibuprofène selon la texture des grains. Ainsi, dès les faibles concentrations, l'ibuprofène se dépose simultanément en surface et au cœur des grains puis lorsque la porosité est pratiquement comblée, l'ajout supplémentaire d'actif s'effectue essentiellement par enrobage des grains. Ce dépôt de surface est plus important et plus régulier dans le cas des sphéroïdes Mi-Pro, qui s'avèrent être plus sphériques mais légèrement moins poreux que les grains Kenwood. Cette répartition de l'ibuprofène ralentit sa libération dans le cas des sphéroïdes Mi-Pro, en raison d'une moindre accessibilité du milieu de dissolution à l'ibuprofène présent dans les pores. La cellule en T, prototype développé pour l'étude de la libération d'actif à partir de systèmes implantables pour embolisation, a permis d'étudier la dissolution de l'ibuprofène dans des conditions d'élution et de durée plus en adéquation avec les conditions physiologiques du milieu osseux. L'intégrité des substrats poreux au terme de la dissolution de la molécule active, laisse préjuger du maintien de leur potentiel ostéoconducteur, paramètre essentiel à leur utilisation en tant qu'implants osseux.

Dans le but de gérer les capacités d'inclusion et les cinétiques de dissolution du principe actif, tout en préservant les propriétés mécaniques, d'autres pistes peuvent être suggérées :

- ajustement de la porosité (volume, distribution, interconnexion des pores) par le choix qualitatif et quantitatif d'autres porogènes, utilisés seuls ou en association ;
- fonctionnalisation chimique préalable du support destinée à améliorer les liaisons substrat/molécule active ;
- dépôt d'un enrobage barrière sur les grains chargés en actif.

Afin de valider le concept développé, des investigations complémentaires (immersion en milieu sursaturé en ions calcium et phosphate, culture cellulaire) devront être mises en œuvre pour s'assurer que la présence de l'ibuprofène ne compromet ni la biocompatibilité ni la bioactivité des sphéroïdes fonctionnalisés. Des essais d'implantation en site osseux permettraient de confirmer la biocompatibilité, d'évaluer les cinétiques de résorption/substitution et d'établir les cinétiques de libération *in vivo* de la molécule active.

Le développement des matériaux proposés devrait également faire l'objet d'une optimisation des procédés de fabrication et d'inclusion ainsi que d'un travail de transposition d'échelle.

Au-delà des conclusions établies sur la contribution respective de la formulation et du procédé à la qualité des grains, un bilan méthodologique peut être établi au terme de ce travail. D'une part, le croisement de méthodes telles que la microindentation, l'exploration des surfaces par spectrométrie infrarouge couplée à l'analyse d'image et la porosimétrie au mercure, a permis de progresser dans la compréhension des phénomènes de granulation, de calcination, d'inclusion d'actif et donc dans le développement de ces systèmes de délivrance. Toutefois, elles ne sont pas envisageables en routine, alors que la mise en œuvre de méthodes de caractérisations, telles que les essais de friabilité et les tests de dissolution *in vitro*, normalisés dans d'autres domaines a démontré son intérêt dans le contrôle de la qualité de ces substituts osseux.

Enfin, le statut particulier de ces matériaux multifonctionnels, à la fois substituts osseux et systèmes de délivrance d'actif, et donc à l'interface des médicaments et des dispositifs médicaux, soulève des problématiques d'ordre déontologique et réglementaire qu'il conviendra de considérer dans une démarche pluridisciplinaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Aiache** Aiache JM 1990. French and/or European perspectives on biopharmaceutical characterization of drug dosage forms. *J Pharm Biomed Anal* 8:499-506.
- Aiache JM, Islasse M, Beyssac E, Aiache S, Renoux R, Kantelip JP 1987. Kinetics of indomethacin release from suppositories. *In vitro-in vivo* correlation. *Int J Pharm* 39:235-242.
- Airaksinen** Airaksinen S, Karjalainen M, Räsänen E, Rantanen J, Yliruusi J 2004. Comparison of the effects of two drying methods on polymorphism of theophylline. *Int J Pharm* 276:129-141.
- Albertini** Albertini B, Cavallari C, Passerini N, González-Rodríguez ML, Rodríguez L 2003. Evaluation of β -lactose, PVP K12 and PVP K90 as excipients to prepare piroxicam granules using two wet granulation techniques. *Eur J Pharm Biopharm* 56:479-487.
- Almirall** Almirall A, Larrecq G, Delgado JA, Martinez S, Planell JA, Ginebra MP 2004. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials* 25:3671-3680.
- Ameye** Ameye D, Keleb E, Vervaet C, Remon JP, Adams E, Massart DL 2002. Scaling-up of a lactose wet granulation process in Mi-Pro high shear mixers. *Eur J Pharm Sci* 17:247-251.
- Amyot** Amyot F, Boudy V, Jurski K, Counord JL, Guiffant G, Dufaux J, Chaumeil JC 2002. A new experimental method for the evaluation of the release profiles of drug-loaded microbeads designed for embolisation. *ITBM-RBM* 23:285-289.
- Arcos** Arcos D, Ragel CV, Vallet-Regi M 2001. Bioactivity in glass/PMMA composites used as drug delivery system. *Biomaterials* 22:701-708.
- Ayers** Ayers RA, Wolford LM, Bateman TA, Ferguson VL, Simske SJ 1999. Quantification of bone ingrowth into porous block hydroxyapatite in humans. *J Biomed Mater Res* 47:54-59.
- Badawy** Badawy SIF, Hussain MA 2004. Effect of starting material particle size on its agglomeration behaviour in high shear wet granulation. *AAPS PharmSciTech* 5:1-7.

- Bae** Bae CJ, Kim HW, Koh YH, Kim HE 2006. Hydroxyapatite bone scaffolds with controlled macrochannel pores. *J Mater Sci Mater Med* 17:517-521.
- Balcik** Balcik C, Tokdemir T, Senköylü A, Koc N, Timucin M, Akin S, Korkusuz P, Korkusuz F 2007. Early weight bearing of porous HA/TCP (60/40) ceramics *in vivo*: a longitudinal study in a segmental bone defect model of rabbit. *Acta Biomater* 3:985-996.
- Barralet** Barralet JE, Grover L, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR 2002. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold. *Biomaterials* 23:3063-3072.
- Benali** Benali M, Gerbaud V, Hemati M 2008. Effect of operating conditions and physico-chemical properties on the wet granulation kinetics in high shear mixer. *Powder Technol*, in press.
- Berggren** Berggren J, Alderborn G 2001. Drying behaviour of two sets of microcrystalline cellulose pellets. *Int J Pharm* 219:113-126.
- Beruto** Beruto DT, Botter R, Fini M 2002. The effect of water in inorganic microsponges of calcium phosphates on the porosity and permeability of composites made with polymethyl metacrylate. *Biomaterials* 23:2509-2517.
- Beysac** Beysac E, Lavigne J 2005. Dissolution study of active pharmaceutical ingredients using the flow through apparatus USP 4. *Dissolution Technologies* 12:23-25.
- Bock** Bock TK, Kraas U 2001. Experience with the Diosna mini-granulator and assessment of process scalability. *Eur J Pharm Biopharm* 52:297-303.
- Bohner** Bohner M, Lemaître J, Merkle HP, Gander B 2000. Control of gentamicin release from a calcium phosphate cement by admixed poly(acrylic acid). *J Pharm Sci* 89:1262-1270.
- Bohner M, Lemaître J, Van Landuyt P, Zambelli PY, Merkle HP, Gander B 1997. Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. *J Pharm Sci* 86:565-572.
- Bohner M, Van Lenthe GH, Grünenfelder S, Hirsiger W, Evison R, Müller R 2005. Synthesis and characterization of porous β -tricalcium phosphate blocks. *Biomaterials* 26:6099-6105.

- Borovac** Borovac T, Pelage JP, Kasselouri A, Prognon P, Guiffant G, Laurent A 2006. Release of ibuprofen from beads for embolization: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Control Release* 115:266-274.
- Bouler** Bouler JM, Trécant M, Delécrin J, Royer J, Passuti N, Daculsi G 1996. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of five synthesis parameters on compressive strength. *J Biomed Mater Res* 32:603-609.
- Bourne** Bourne RB 2004. Prophylactic use of an antibiotic bone cement. An emerging standard – In the affirmative. *J Arth* 19:69-72.
- Brossard** Brossard C, Lefort des Ylouses D, Duchêne D, Puisieux F, Carstensen JT 1982. Dissolution of a soluble drug substance from vinyl polymer matrices. *J Pharm Sci* 72:162-169.
- Brunauer** Brunauer S, Emmett PH, Teller E 1938. The use of low temperature Van der Waals adsorption isotherm in determining surface area. *J Amer Chem Soc* 60:309-317.
- Busignies** Busignies V, Chulia D, Choisnard L, De Challemaison R, Gèze A, Stainmesse S, Siepmann J, Tchoreloff P, Viana M, Wehrlé P, Wouessidjewe D 2007. Poudres, granulés et comprimés. In Maloine (Ed), *Pharmacie galénique formulation et technologie pharmaceutique*, Paris, France.
- Butensky** Butensky M, Hyman D 1971. Rotary drum granulation. An experimental study of the factors affecting granule size. *Ind Eng Chem Fundam* 10:212-219.
- Capes** Capes CE, Danckwerts PV 1965. Granule formation by the agglomeration of damp powders, Part I: the mechanism of granule growth. *Trans Inst Chem Eng* 43:116-124.
- Carstensen** Carstensen JT, Zoglio MA 1982. Tray drying of pharmaceutical wet granulations. *J Pharm Sci* 71:35-39.
- Castelli** Castelli C, Marone P, Monzillo V, Segu K 1995. Antistaphylococcal activity of antibiotic impregnated bone cement. *The knee* 2:219-222.
- Cavallari** Cavallari C, Albertini B, Gonzalez-Rodriguez ML, Rodriguez L 2002. Improved dissolution behavior of steam-granulated piroxicam. *Eur J Pharm Biopharm* 54:65-73.

- Chandrappa** Chandrappa GT, Steunou N, Livage J 2002. Macroporous crystalline vanadium oxide foam. *Nature* 416:702-702.
- Chang** Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS, Park KW 2000. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 21:1291-1298.
- Charnay** Charnay C, Begu S, Tourne-Peteilh C, Nicole L, Lerner DA, Devoiselle JM 2004. Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property. *Eur J Pharm Biopharm* 57:533-540.
- Charrière** Charrière E, Lemaitre J, Zysset P 2003. Hydroxyapatite cement scaffolds with controlled macroporosity: fabrication protocol and mechanical properties. *Biomaterials* 24:809-817.
- Chen** Chen CH, Takita K, Honda S, Awaji H 2005. Fracture behavior of cylindrical porous alumina with pore gradient. *J Eur Ceram Soc* 25:385-391.
- Chen CH, Takita K, Ishiguro S, Honda S, Awaji H 2005. Fabrication on porous alumina tube by centrifugal molding. *J Eur Ceram Soc* 25:3257-3264.
- Chevalier** Chevalier E, Chulia D, Pouget C, Viana M 2007. Fabrication of porous substrates: a review of processes using the pore forming agents in the biomaterial field. *J Pharm Sci* 97:1135-1154.
- Chevalier E, Viana M, Cazalbou S, Chulia D 2008. Validation of a fabrication process of pellets for bone filling and drug delivery. *JDDST*, in press.
- Chevalier E, Viana M, Pouget C, Cazalbou S, Champion E, Chulia D 2008. From porous pellet fabrication to drug loading and release: the case of calcium phosphate matrix loaded with ibuprofen. In *Bioceramics: Properties, Preparation and Applications*, in press.
- Chevalier E, Viana M, Pouget C, Chulia D 2007. Influence of process parameters on pellets elaborated in a Mi-Pro high-shear granulator. *Pharm Dev Technol* 2:133-144.

- Chu** Chu TMG, Halloran JW, Hollister SJ, Feinberg SE 2001. Hydroxyapatite implants with designed internal architecture. *J Mater Sci Mater Med* 12:471-478.
- Chu TMG, Orton DG, Hollister SJ, Feinberg SE, Halloran JW 2002. Mechanical and *in vivo* performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials* 23:1283-1293.
- Chulia** Chulia D 1990. Compactage et granulation, JEP, Paris.
- Collin** Collin I 2006. Contribution à l'optimisation de céramiques phosphocalciques macroporeuses biphasées pour le comblement de défauts osseux : élaboration et caractérisation mécanique et architecturale ; étude de la fonctionnalité *in vivo*. PhD Thesis, Université de Nantes, Nantes, 249 p.
- Collin I, Lamy B, Gauthier O, Bouler JM 2005. Improvement of macroporous biphasic phosphocalcic ceramics for the filling of bone defects. *ITBM-RBM* 26:247-248.
- Colombier** Colombier ML, Lesclous P, Tulasne JF 2005. La cicatrisation des greffes osseuses. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 106:157-165.
- Cooper** Cooper J, Swartz CJ, Suydam Jr W 1961. Drying of tablet granulations. *J Pharm Sci* 50:67-75.
- Corbin** Corbin SF, Apte PS 1999. Engineered porosity via tape casting, lamination and the percolation of pyrolyzable particulates. *J Am Ceram Soc* 82:693-701.
- Corry** Corry D, Moran J 1998. Assessment of acrylic bone cement as a local delivery vehicle for the application of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biomaterials* 19:1295-1301.
- Costa** Costa HS, Mansur AAP, Barbosa-Stancioli EF, Pereira MM, Mansur HS 2008. Morphological, mechanical, and biocompatibility characterization of macroporous alumina scaffolds coated with calcium phosphate/PVA. *J Mater Sci* 43:510-524.
- Costa P, Sousa Lobo JM 2001. Modelling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 13:123-133.

- Daculsi** Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I 1990. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int* 46:20-27.
- Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B 1989. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics *in vivo*: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mat Res* 23:883-894.
- Daculsi G, Passuti N 1990. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 11:86-87.
- De Groot** De Groot K 1980. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials* 1:47-50.
- Delalonde** Delalonde M, Ruiz T 2008. Dissolution of pharmaceutical tablets: the influence of penetration and drainage of interstitial fluids. *Chem Eng Process* 47:370-376.
- Deleuil** Deleuil M 1990. Les mécanismes de croissance en granulation. *STP Pharm Sci* 6:310-315.
- Del Real** Del Real RP, Wolke JGC, Vallet-Regi M, Jansen JA 2002. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. *Biomaterials* 23:3673-3680.
- De Peinder** De Peinder P, Vredembregt MJ, Visser T, De Kaste D 2008. Detection of Lipitor® counterfeits: a comparison of NIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics. *J Pharm Biomed Anal* 47:688-694.
- Detsch** Detsch R, Mayr H, Ziegler G 2008. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomater* 4:139-148.
- Deville** Deville S, Saiz E, Tomsia AP 2006. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27:5480-5489.
- Dubois** Dubois J, Wolff JC, Warrack JK, Schoppelrei J, Lewis EN 2007. NIR chemical imaging for counterfeit pharmaceutical products analysis. *Spectroscopy* 1-6.
- Dürig** Dürig T, Fassihi R 2000. Evaluation of floating and sticking extended release delivery systems: an unconventional dissolution test. *J Contr Rel* 67:37-44.

- Duschler** Duschler G, Carius W, Bauer KH 1995. Single-step granulation with microwaves preliminary studies and pilot scale results. *Drug Dev Ind Pharm* 21:1599-1610.
- Engin** Engin NO, Tas AC 1999. Manufacture of macroporous calcium hydroxyapatite bioceramics. *J Eur Ceram Soc* 19:2569-2572.
- Ennis** Ennis BJ, Litster JD 1997. Particle size enlargement. In Perry R, Green D (Eds), *Perry's Chemical Engineers Handbook*, 7th ed, MacGraw-Hill, New-York, USA.
- Fabbri** Fabbri M, Celotti GC, Ravaglioli A 1994. Granulate based on calcium phosphate with controlled morphology and porosity for medical applications: physico-chemical parameters and production technique. *Biomaterials* 15:474-477.
- Fabbri M, Celotti GC, Ravaglioli A 1995. Hydroxyapatite-based porous aggregates: physico-chemical nature, structure, texture and architecture. *Biomaterials* 16:225-228.
- Falamaki** Falamaki C, Naimi M, Aghaie A 2004. Dual behavior of CaCO₃ as a porosifier and sintering aid in the manufacture of alumina membrane/catalyst supports. *J Eur Ceram Soc* 24:3195-3201.
- Faure** Faure A, Grimsey IM, Rowe RC, York P, Cliff MJ 1999. Applicability of scale-up methodology for wet granulation process in Collette Gral high shear mixer-granulators. *Eur J Pharm Sci* 8:85-93.
- Flautre** Flautre B, Deschamps M, Delecourt C, Blary MC, Hardouin P 2001. Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections – experimental study in the rabbit. *J Mater Sci Mater Med* 12:679-682.
- Forrest** Forrest S, Bridgwater J, Mort PR, Litster J, Parker DJ 2003. Flow patterns in granulating systems. *Powder Technol* 130:91-96.
- Gabaude** Gabaude CMD, Gautier JC, Saudemon P, Chulia D 2001. Validation of a new pertinent packing coefficient to estimate flow properties of pharmaceutical powders at a very early development stage, by comparison with mercury intrusion and classical flowability methods. *J Mater Sci* 36:1763-1773.

- Gao** Gao JZ, Gray DB, Motheram R, Hussain MA 2000. Importance of inlet air velocity in fluid bed drying of a granulation prepared in a high shear granulator. *AAPS PharmSciTech* 1:1-3.
- Gauthier** Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G 1998. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence in macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 19:133-139.
- Gauthier H, Daculsi G, Merle C 2001. Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: *in vitro* characterization and microbiological activity. *Biomaterials* 22:2481-2487.
- Gbureck** Gbureck U, Vorndran E, Barralet JE 2008. Modeling vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions. *Acta Biomater*, in press.
- Ghorab** Ghorab MK, Adeyeye MC 2007. High shear mixing granulation of ibuprofen and β -cyclodextrin: effects of process variables on ibuprofen dissolution. *AAPS PharmSciTech* 8:1-9.
- Gibassier** Gibassier D, Sado P, Le Verge R, Devissaguet JP 1982. Test de dissolution et fonction de Weibull. *Labo Pharma Prob Techn* 30:250-255.
- Ginebra** Ginebra MP, Traykova T, Planell JA 2006. Calcium phosphate cements as drug delivery systems: a review. *J Control Release* 113:102-110.
- Giry** Giry K, Genty M, Viana M, Wüthrich P, Chulia D 2006. Multiphase versus single pot granulation process: influence of process and formulation parameters on granules properties. *Drug Dev Ind Pharm* 32:509-530.
- Giry K, Viana M, Genty M, Louvet F, Wüthrich P, Chulia D 2008. Comparison of single pot and multiphase granulation. Part 1: Effect of the high shear granulator on granule properties according to the drug substance and its concentration. *Pharm Dev Technol*, in press.

- Giry K, Viana M, Genty M, Louvet F, Wüthrich P, Chulia D 2008. Comparison of single pot and multiphase equipment. Part 2: Effect of the drying process on granules manufactured in a single pot granulator and dried either *in situ* or in a fluid bed dryer. Pharm Dev Technol, in press.
- Gomez** Gomez F, Saleh K, Guigon P 2001. Etude de la granulation humide en mélangeur à taux de cisaillement élevé par rhéométrie par couple de rotation. Récents Progrès en Génie des Procédés 15:317-322.
- Gonzalez** Gonzalez MV, Tang Y, Phillips GJ, Lloyd AW, Hall B, Stratford PW, Lewis AL 2008. Doxorubicin eluting beads-2: methods for evaluating drug elution and *in vitro/in vivo* correlation. J Mater Sci Mater Med 19:767-775.
- Gonzalez-Corchon** Gonzalez-Corchon MA, Salvado M, De la Torre BJ, Collia F, De Pedro JA, Vazquez B, San Roman J 2006. Injectable and self-curing composites of acrylic/bioactive glass and drug systems. A histomorphometric analysis of the behaviour in rabbits. Biomaterials 27:1778-1787.
- Goodwin** Goodwin CJ, Braden M, Downes S, Marshall NJ 1997. Investigation into the release of bioactive recombinant human growth hormone from normal and low-viscosity poly(methylmetacrylate) bone cements. J Biomed Mater Res 34:47-55.
- Graffner** Graffner C 2006. Regulatory aspects of drug dissolution from a european perspective. Eur J Pharm Sci 29:288-293.
- Gregorova** Gregorova E, Pabst W 2007. Porous ceramics prepared using poppy seed as pore-forming agent. Ceram Int 33:1385-1388.
- Guicheux** Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Pilet P, Couillaud S, Jegou D, Daculsi G, Heymann D 1998. Human growth hormone locally released in bone sites by calcium-phosphate biomaterial simulates ceramic bone substitution without systemic effects: a rabbit study. J Bone Miner Res 13:739-748.
- Guicheux J, Grimandi G, Trécant M, Faivre A, Takahashi S, Daculsi G 1997. Apatite as carrier for growth hormone: *in vitro* characterization of loading and release. J Biomed Mater Res 34:165-170.

- Hall** Hall EW, Rouse MS, Jacofsky DJ, Osmon DR, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R 2004. Release of daptomycin from polymethylmetacrylate beads in a continuous flow chamber. *Diagn Microbiol Infect Dis* 50:261-265.
- Hamdani** Hamdani J, Moës AJ, Amighi K 2002. Development and evaluation of prolonged release pellets obtained by the melt pelletization process. *Int J Pharm* 245:167-177.
- Han** Han YS, Li JB, Chen YJ 2003. Fabrication of bimodal porous alumina ceramics. *Mater Res Bull* 38:373-379.
- Hapgood** Hapgood KP, Litster JD, Smith R 2003. Nucleation regime map for liquid bound granules. *AIChE Journal* 49:350-361.
- Harris** Harris LD, Kim BS, Mooney DJ 1998. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *J Biomed Mater Res* 42:396-402.
- Hasegawa** Hasegawa M, Sudo A, Komlev VS, Barinov SM, Uchida A 2004. High release of antibiotic from a novel hydroxyapatite with bimodal pore size distribution. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 70B:332-339.
- Hausman** Hausman DS 2004. Comparison of low shear, high shear and fluid bed granulation during low doses tablet process development. *Drug Dev Ind Pharm* 30:259-266.
- Herath** Herath HMTU, Di Silvio L, Evans JRG 2005. Porous hydroxyapatite ceramics for tissue engineering. *J Appl Biomater Biomech* 3:192-198.
- Higuchi** Higuchi T 1963. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci* 52:1145-1149.
- Hing** Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA 1999. Quantification of bone ingrowth within bone-derived porous hydroxyapatite implants of varying density. *J Mater Sci Mater Med* 10:663-670.
- Hiseman** Hiseman MJ, Laurent BFC, Bridgwater J, Wilson DI, Parker JD, North N, Merrifield DR 2002. Granular flow in a planetary mixer. *Trans IChemE* 80:432-440.
- Hixson** Hixson AW, Crowell JH 1931. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. *Ind Eng Chem* 23:923-931.

- Hollister** Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM 2002. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials* 23:4095-4103.
- Hollister SJ 2005. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 4:518-524.
- Holm** Holm P 1997. High shear mixer granulators. In Parikh DM (Ed), *Handbook of Pharmaceutical granulation Technology*, Marcel Dekker Inc, New York, USA 81:151-204.
- Hoornaert** Hoornaert F, Wauters PAL, Meesters GMH, Pratsinis SE, Scarlett B 1998. Agglomeration behaviour of powders in a Lödige mixer granulator. *Powder Technol* 96:16-128.
- Hubbard** Hubbard WG 1974. Physiological calcium phosphates as orthopedic biomaterials. PhD Thesis, Marquette University, Milwaukee, WI, p 169.
- Hulbert** Hulbert SF, Morrison SJ, Klawitter JJ 1971. Compatibility of porous ceramics with soft tissue; application to tracheal prostheses. *J Biomed Mater Res* 5:269-279.
- Hunter** Hunter B 1992. A critical review on current options in granulation techniques. *Interphex* 82:2-5.
- Ioku** Ioku K, Kawachi G, Sasaki S, Fujimori H, Goto S 2006. Hydrothermal preparation of tailored hydroxyapatite. *J Mater Sci* 41:1341-1344.
- Isobe** Isobe T, Kameshima Y, Nakajima A, Okada K 2007. Preparation and properties of porous alumina ceramics with uni-directionally oriented pores by extrusion method using a plastic substance as pore former. *J Eur Ceram Soc* 27:61-66.
- Isobe T, Kameshima Y, Nakajima A, Okada K, Hotta Y 2006. Extrusion method using nylon 66 fibers for the preparation of porous alumina ceramics with oriented pores. *J Eur Ceram Soc* 26:2213-2217.
- Isobe T, Tomita T, Kameshima Y, Nakajima A, Okada K 2006. Preparation and properties of porous alumina ceramics with oriented cylindrical pores produced by an extrusion method. *J Eur Ceram Soc* 26:957-960.

- Iveson** Iveson SM, Litster JD 1998. Growth regime map for liquid-bound granules. *AIChE Journal* 44:1510-1518.
- Iveson SM, Litster JD, Hapgood K, Ennis BJ 2001. Nucleation, growth and breakage phenomena in agitated wet granulation processes: a review. *Powder Technol* 11:3-39.
- Iveson SM, Wauters PAL, Forrest S, Litster JD, Meesters GMH, Scarlett B 2001. Growth regime map for liquid bound-granules: development and experimental validation. *Powder Technol* 117:83-97.
- Jones** Jones JR, Ehrenfried LM, Hench LL 2006. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27:964-973.
- Jones JR, Hench LL 2003. Effect of surfactant concentration and composition on the structure and properties of sol-gel-derived bioactive glass foam scaffolds for tissue engineering. *J Mater Sci* 38:3783-3790.
- Jorgensen** Jorgensen E, Bhagwat D 1998. Development of dissolution tests for oral extended-release products. *PSTT* 1:128-135.
- Joshi** Joshi A, Pund S, Nivsarkar M, Vasu K, Shishoo C 2008. Dissolution test for site-specific release isoniazid pellets in USP apparatus 3 (reciprocating cylinder): optimization using response surface methodology. *Eur J Pharm Biopharm* 69:769-775.
- Kapur** Kapur PC 1978. Balling and granulation. *Adv Chem Eng* 10:55-123.
- Kawata** Kawata M, Uchida H, Itatani K, Okada I, Koda S 2004. Development of porous ceramics with well-controlled porosities and pore sizes from apatite fibers and their evaluations. *J Mater Sci Mater Med* 15:817-823.
- Knight** Knight PC 2001. Structuring agglomerated products for improved performance. *Powder Technol* 119:14-25.
- Knoop** Knoop C, Vervier I, Thiry P, De Backer M, Kovarik JM, Rousseau A, Marquet P, Estenne M 2003. Cyclosporine pharmacokinetics and dose monitoring after lung transplantation: comparison between cystic fibrosis and other conditions. *Transplantation* 4:683-688.
- Komath** Komath M, Varma HK, Sivakumar R 2000. On the development of an apatitic calcium phosphate bone cement. *Bull Mater Sci* 23:135-140.

- Komlev** Komlev VS, Barinov SM 2002. Porous hydroxyapatite ceramics of bi-modal pore size distribution. *J Mater Sci Mater Med* 13:295-299.
- Komlev VS, Barinov SM, Girardin E, Oscarsson S, Rosengren A, Rustichelli F, Orlovskii VP 2003. Porous spherical hydroxyapatite and fluorhydroxyapatite granules: processing and characterization. *Sci Technol Adv Mater* 4:503-508.
- Komlev VS, Barinov SM, Koplík EV 2002. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. *Biomaterials* 23:3449-3454.
- Komlev VS, Barinov SM, Rustichelli F 2003. Strength enhancement of porous hydroxyapatite ceramics by polymer impregnation. *J Mater Sci Lett* 22:1215-1217.
- Kopcha** Kopcha M, Lordi N, Tojo KJ 1991. Evaluation of release from selected thermosoftening vehicles. *J Pharm Pharmacol* 43:382-387.
- Krajewski** Krajewski A, Ravaglioli A, Roncari E, Pinasco P 2000. Porous ceramic bodies for drug delivery. *J Mater Sci Mater Med* 12:763-771.
- Kristensen** Kristensen HG, Schaefer T 1987. Granulation, a review on pharmaceutical wet granulation. *Drug Dev Ind Pharm* 13:803-873.
- Kukura** Kukura J, Baxter JL, Muzzio FJ 2004. Shear distribution and variability in the USP Apparatus 2 under turbulent conditions. *Int J Pharm* 279:9-17.
- Lamprecht** Lamprecht A, Saumet JL, Roux J, Benoit JP 2004. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int J Pharm* 278:407-414.
- Laurent** Laurent BFC 2005. Structure of powder flow in a planetary mixer during wet-mass granulation. *Chem Eng Sci* 60:3805-3816.
- Lee** Lee JS, Park JK 2003. Processing of porous ceramic spheres by pseudo-double-emulsion method. *Ceram Int* 29:271-278.
- Lee SH, Shin H 2007. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Delivery Rev* 59:339-359.

- LeGeros** LeGeros RZ 1988. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv Dent Res* 2:164-180.
- LeGeros RZ, Daculsi G, Orly I, Gregoire M, Heughebaert M, Gineste M, Kijkowska R 1992. Formation of carbonate apatite on calcium phosphate materials: Dissolution/precipitation processes. In Ducheyne, Kokubo and Van Blitterswijk (Ed), *Bone-bonding*. Reed Healthcare Communications, 201-212.
- Le Hir** Le Hir A 1997. In Masson (Ed), *Abrégé de pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments*, 7^{ème} ed, Paris, France.
- Lemos** Lemos AF, Ferreira JMF 2000. Porous bioactive calcium carbonate implants processed by starch consolidation. *Mat Sci Eng C* 11:35-40.
- Leuenberger** Leuenberger H 1982. Granulation, new techniques. *Pharm Acta Helv* 57:72-82.
- Lewis** Lewis EN, Schoppelrei J, Lee E, Kidder LH 2005. Near-Infrared chemical imaging as a process analytical tool. In *Process Analytical Technology*. Bakeav KA (Ed), Blackwell Publishing, p 451.
- Li** Li W, Woldu A, Kelly R, McColl J, Bruce R, Rasmussen H, Cunningham J, Winstead D 2008. Measurement of drug agglomerates in powder blending simulation samples by near infrared chemical imaging. *Int J Pharm* 350:369-373.
- Litster** Litster J, Ennis B, Lian L 2004. In *The science and engineering of granulation processes*. Litster J and Ennis B (Eds), Kluwer academic publishers, Inc London, UK.
- Litster JD, Hapgood KP, Michaels JN, Kamineni SK, Hsu T, Sims A, Roberts M 2001. Liquid distribution in wet granulation. Dimensionless spray flux. *Powder Technol* 114:32-39.
- Liu** Liu DM 1996. Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite granules. *Biomaterials* 17:1955-1957.
- Liu DM 1997. Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. *J Mater Sci Mater Med* 8:227-232.
- Lohmann** Lohmann H, Grass G, Rangger C, Mathiak G 2007. Economic impact of cancellous bone grafting in trauma surgery. *Arch Orthop Trauma Surg* 127:345-348.

- Lu** Lu JX, Flautre B, Anselme K, Hardouin P, Gallur A, Deschamps M, Thierry B 1999. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization *in vitro* and *in vivo*. *J Mater Sci Mater Med* 10:111-120.
- Lu JX, Gallur A, Flautre B, Anselme K, Deschamps M, Thierry B, Hardouin P 1998. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical and medullar bone sites in rabbits. *J Biomed Mater Res* 42:357-367.
- Lustig-Gustafsson** Lustig-Gustafsson C, Kaur Johal H, Podczeczek F, Newton JM 1999. The influence of water content and drug solubility on the formulation of pellets by extrusion and spheronization. *Eur J Pharm Sci* 8:147-152.
- Lyckfedt** Lyckfedt O, Ferreira JMF 1998. Processing of porous ceramics by “starch consolidation”. *J Eur Ceram Soc* 18:131-140.
- Ma** Ma J, Wang C, Peng KW 2003. Electrophoretic deposition of porous hydroxyapatite scaffold. *Biomaterials* 24:3505-3510.
- Maggio** Maggio RM, Castellano PM, Kaufman TS 2008. A new principle component analysis-based approach for testing “similarity” of drug dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 34:66-77.
- Mandal** Mandal TK, Chiao CS, Ace LN 1994. Design and evaluation of a rotating basket-paddle dissolution apparatus. *Drug Dev Ind Pharm* 20:1753-1760.
- Marchetti** Marchetti JM 2001. Potential use of gelcasting hydroxyapatite porous ceramic as an implantable drug delivery system. *Int J Pharm* 213:117-125.
- Marchi** Marchi J, Dantas ACS, Greil P, Bressiani JC, Bressiani AHA, Müller FA 2007. Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium phosphate powders. *Mater Res Bull* 42:1040-1050.
- Markovic** Markovic M, Takagi S, Chow LC 2001. Formation of macroporous phosphate cements through the use of mannitol crystals. *Key Eng Mater* 192:773-776.
- Marsh** Marsh JL 2003. Principles of bone grafting: non-union, delayed union. *Surgery* 24:207-210.

- Mastriogiacomo** Mastriogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, Quarto R 2006. Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 27:3230-3237.
- Mattok** Mattok GL, McGilveray IJ, Hossie RD 1971. Technical problems of the USP/NF dissolution test. *J Pharm Sci* 61:460-462.
- Medvecky** Medvecky L, Stulajterova R, Briancin J 2007. Study of controlled tetracycline release from porous calcium phosphate/polyhydroxybutyrate composites. *Chem Pap* 61:477-484.
- Mehta** Mehta AC. Dissolution testing of tablet and capsule dosage forms. *J Clin Pharm Ther* 18:415-420.
- Melville** Melville AJ, Rodriguez-Lorenzo LM, Forsythe JS 2008. Effects of calcination temperature on the drug delivery behaviour of ibuprofen from hydroxyapatite powders. *J Mater Sci Mater Med* 19:1187-1195.
- Mendez** Mendez JA, Fernandez M, Gonzalez-Corchon A, Salvado M, Collia F, De Pedro JA, Levenfeld BL, Lopez-Bravo A, Vazquez B, San Roman J 2004. Injectable self-curing bioactive acrylic-glass composites charged with specific anti-inflammatory/analgesic agent. *Biomaterials* 25:2381-2392.
- Meseguer-Olmo** Meseguer-Olmo L, Ros-Nicolas MJ, Clavel-Sainz M, Vicente-Ortega V, Alcaraz-Banos M, Lax-Perez A, Arcos D, Ragel CV, Vallet-Regi M 2002. Biocompatibility and *in vivo* gentamicin release from bioactive sol-gel glass implants. *J Biomed Mater Res Part A* 61:458-465.
- Miao** Miao X, Hu Y, Liu J, Wong AP 2004. Porous calcium phosphate ceramics prepared by coating polyurethane foams with calcium phosphate cements. *Mater Lett* 58:397-402.
- Milosevski** Milosevski M, Bossert J, Milosevski D, Gruevska N 1999. Preparation and properties of dense and porous calcium phosphate. *Ceram Int* 25:693-696.
- Missaghi** Missaghi S, Fassihi R 2005. Release characterization of dimehydrate from an eroding and swelling matrix: selection of appropriate dissolution apparatus. *Int J Pharm* 293:35-42.
- Montanaro** Montanaro L, Jorand Y, Fantozzi G, Negro A 1998. Ceramic foams by powder processing. *J Eur Ceram Soc* 18:1339-1350.

- Moore** Moore JW, Flanner HH 1996. Mathematical comparison of curves with an emphasis on *in vitro* dissolution profiles. Pharm Tech 20:64-74.
- Mort** Mort PR, Tardos G 1999. Scale-up of agglomeration processes using transformations. Kona 17:64-75.
- Murugan** Murugan R, Ramakrishna S 2004. Coupling of therapeutic molecules onto surface modified coralline hydroxyapatite. Biomaterials 25:3073-3080.
- Nasir** Nasir SS, Wilken Jr LO, Nasir SM 1978. New *in vitro* dissolution test apparatus. J Pharm Sci 68:177-181.
- Netz** Netz DJA, Sepulveda P, Pandolfelli VC, Spadaro ACC, Alencastre JB, Bentley MVLB, Marchetti JM 2001. Potential use of gel-casting hydroxyapatite porous ceramic as an implantable drug delivery system. Int J Pharm 213:117-125.
- Newitt** Newitt DM, Conway-Jones JM 1958. A contribution to the theory and practice of granulation. Trans I Chem Eng 36:422-441.
- Nicoll** Nicoll SB, Radin S, Santos EM, Tuan RS, Ducheyne P 1997. *In vitro* release kinetics of biologically active transforming growth factor- β 1 from a novel porous glass carrier. Biomaterials 18:853-859.
- Nienow** Nienow AW 1995. Fluidised bed granulation and coating: applications to materials, agriculture and biotechnology. Chem Eng Commun 139:233-253.
- O'Brien** O'Brien P, Roskowski MT, Wolff LF, Hinrichs JE, Hargreaves KM 1996. Effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug on tissue levels of immunoreactive prostaglandin E₂, immunoreactive leukotriene and pain after periodontal surgery. J Periodontol 67:1307-1316.
- Ohashi** Ohashi H, Therin M, Meunier A, Christel P 1994. The effect of drilling parameters on bone. J Mater Sci Mater Med 5:237-241.
- Oliveira** Oliveira JM, Rodrigues MT, Silva SS, Malafaya PB, Gomes ME, Viegas CA, Dias IR, Azevedo JT, Mano JF, Reis RL 2006. Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. Biomaterials 27:6123-6137.

Otsuka

Otsuka M, Matsuda Y, Baig AA, Chettry A, Higuchi WI 2000. Calcium-level responsive controlled drug delivery from implant dosage forms to treat osteoporosis in an animal model. *Adv Drug Deliv Rev* 42:249-258.

Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, Fox JL, Higuchi WI 1994. A novel skeletal drug-delivery system using self-setting calcium phosphate cement. 3. Physicochemical properties and drug release rate of bovine insulin and bovine albumin. *J Pharm Sci* 83:255-258.

Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, Fox JL, Higuchi WI 1994. A novel skeletal drug-delivery system using self-setting calcium phosphate cement. 4. Effect of the mixing solution volume on the drug-release rate of heterogeneous aspirin-loaded cement. *J Pharm Sci* 83:259-263.

Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, Fox JL, Higuchi WI 1997. A novel skeletal drug-delivery system using self-setting calcium phosphate cement. VIII. The relationship between *in vitro* and *in vivo* drug release from indomethacin-containing cement. *J Control Release* 43:115-122.

Otsuka M, Nakahigashi Y, Matsuda Y, Fox JL, Higuchi WI, Sugiyama Y 1998. Effect of geometrical cement size on *in vitro* and *in vivo* indomethacin release from self-setting apatite cement. *J Control Release* 52:281-289.

Padilla

Padilla S, Roman J, Vallet-Regi M 2002. Synthesis of porous hydroxyapatite by combination of gel casting and foams burn out methods. *J Mater Sci Mater Med* 13:1193-1197.

Palazzo

Palazzo B, Sidoti MC, Tampieri A, Sandri M, Bertolazzi L, Galbusera F, Dubini G, Vena P, Contro R 2005. Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: an experimental and theoretical approach. *Mat Sci Eng C* 25:207-213.

Parker

Parker MD, Rowe RC, Upjohn NG 1990. Mixer torque rheometry-A method for quantifying the consistency of wet granulations. *Pharm Tech Int* 9:52-64.

- Passuti** Passuti N, Daculsi G, Martin S, Basle M, Roher S 1990. Macroporous calcium phosphate ceramics for long bone surgery in human and dogs – Clinical and histological studies. In Heimke G, Soltesz U, Lee AJC (Eds), *Clinical Implants Materials. Advances in Biomaterials*. BV, Amsterdam: Elsevier Sciences Publishers, 255-258.
- Paul** Paul W, Sharma CP 1999. Development of porous spherical hydroxyapatite granules: application towards protein delivery. *J Mater Sci Mater Med* 10:383-388.
- Peltonen** Peltonen L, Liljeroth P, Heikkila T, Kontturi K, Hirvonen J 2003. Dissolution testing of acetylsalicylic acid by a channel flow method- correlation to USP basket and intrinsic dissolution methods. *Eur J Pharm Sci* 19:395-401.
- Perry** Perry AC, Rouse MS, Khaliq Y, Piper KE, Hanssen AD, Osmon DR, Steckelberg JM, Patel R 2002. Antimicrobial release kinetics from polymethylmetacrylate in a novel continuous flow chamber: orthopaedic infections. *Clin Orthop* 403:49-53.
- Pillay** Pillay V, Fassihi R 1998. Evaluation and comparison of dissolution data derived from different modified release dosage forms: an alternative method. *J Control Release* 55:45-55.
- Pillay V, Fassihi R 1999. Unconventional dissolution methodologies. *J Pharm Sci* 88:843-851.
- Pitchumani** Pitchumani R, Zhupanska O, Meesters GMH, Scarlett B 2004. Measurement and characterization of particle strength using a new robotic compression tester. *Powder Technol* 143:56-64.
- Plank** Plank R, Diehl B, Grinstead H, Zega J 2003. Quantifying liquid coverage and powder flux in high-shear granulators. *Powder Technol* 134:223-234.
- Pontier** Pontier C 2001. Les phosphates de calcium apatitiques en compression. De la chimie aux qualités d'usage. PhD Thesis, Université de Paris XI, Chatenay-Malabry.
- Prabhakaran** Prabhakaran K, Melkeri A, Gokhale NM, Sharma SC 2007. Preparation of macroporous alumina ceramics using wheat particles as gelling and pore forming agent. *Ceram Int* 33:77-81.

- Prado da Silva** Prado da Silva MH, Lemos AF, Gibson IR, Ferreira JMF, Santos JD 2002. Porous glass reinforced hydroxyapatite materials produced with different organic additives. *J Non-Cryst Solids* 304:286-292.
- Ramsey** Ramsey ML, Fenlin JM 1996. Use of an antibiotic-impregnated bone cement block in the revision of an infected shoulder arthroplasty. *J Shoulder Elbow Surg* 5:479-482.
- Räsänen** Räsänen E, Rantanen J, Jorgensen A, Karjalainen M, Paakkari T, Yliruusi J 2001. Novel identification of pseudopolymorphic changes of theophylline during wet granulation using near infrared spectroscopy. *J Pharm Sci* 90:389-396.
- Ratier** Ratier A, Gibson IR, Best SM, Freche M, Lacout JL, Rodriguez F 2001. Setting characteristics and mechanical behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline. *Biomaterials* 22:897-901.
- Raynaud** Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D 1998. Synthesis, sintering and mechanical characteristics of non stoichiometric apatite ceramics. 11th Int Symposium on Ceramics in Medicine, New-York, *Bioceramics* 11:109-112.
- Ritger** Ritger PL, Peppas NA 1987. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J Control Release* 5:23-36.
- Rivera-Muñoz** Rivera-Muñoz E, Diaz JR, Rogelio Rodriguez J, Brostow W, Castaño VM 2001. Hydroxyapatite spheres with controlled porosity for eye ball prosthesis: processing and characterization. *J Mater Sci Mater Med* 12:305-311.
- Roseman** Roseman TJ, Derr GR, Nelson KG, Lieberman BL, Butler SS 1980. Continuous flow bead-bed dissolution apparatus for suppositories. *J Pharm Sci* 70:646-651.
- Rosetto** Rosetto Y 1998. In Rosetto Y (Ed), p 41 *Pharmacotechnie Industrielle*. IMT Inc, France.
- Rowe** Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ (Eds) 2003. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 4th edition. Chicago: Pharmaceutical Press.

- Rumpf** Rumpf H 1962. The strength of granules and agglomerates. In Knepper W (Ed), Agglomeration. AIME, Interscience, New York, USA, 379-418.
- Ruotsalainen** Ruotsalainen M, Heinämäki J, Guo H, Laitinen N, Yliruusi J 2003. A novel technique for imaging film coating defects in the film-core interface and surface of coated tablets. Eur J Pharm Biopharm 56:381-388.
- Ryshkewitch** Ryshkewitch E 1953. Compression strength of porous sintered alumina and zirconia. J Am Ceram Soc 36:65-68.
- Sachs** Sachs CJ 2005. Oral analgesics for acute nonspecific pain. Am Fam Physician 71:913-918.
- Safronova** Safronova TV, Putlyaev VI, Shekirev MA, Kuznetsov AV 2007. Composite ceramic containing a bioresorbable phase. Glass Ceram 64:102-106.
- Sasaki** Sasaki T, Ishibashi Y, Katano H, Nagumo A, Toh S 2005. *In vitro* elution of vancomycin from calcium phosphate cement. J Arth 20:1055-1059.
- Schaefer** Schaefer T, Bak HH, Jaegerskou A, Kristensen A, Svensson JR, Holm P, Kristensen HG 1986. Granulation in different types of high speed mixers. Part 1: Effects of process variables and up-scaling. Pharm Ind 48:1083-1089.
- Schaefer T, Mathiesen C 1996. Melt pelletization in a high shear mixer: IX. Effects of binder particle size. Int J Pharm 139:139-148.
- Schmitt** Schmitt M 2000. Contribution à l'élaboration de nouveaux matériaux biphasés en phosphates de calcium. PhD Thesis, Université de Nantes, Nantes.
- Scott** Scott AC, Hounslow MJ, Instone T 2000. Direct evidence of heterogeneity during high-shear granulation. Powder Technol 113:205-213.

- Sepulveda** Sepulveda P 1997. Gel-casting foams for porous ceramics. Am Ceram Soc Bull 76:61-65.
- Sepulveda P, Binner JGP 1999. Processing of cellular ceramics by foaming and in situ polymerization of organic monomers. J Eur Ceram Soc 19:2059-2066.
- Sepulveda P, Binner JGP, Rogero SO, Higa OZ, Bressiani JC 2000. Production of porous hydroxyapatite by the gel-casting of foams and cytotoxic evaluation. J Biomed Mater Res 50:27-34.
- Shah** Shah VP, Tsong Y, Sathe P 1998. *In vitro* dissolution profile comparison-statistics and analysis of the similarity factor, f2. Pharm Res 15:889-896.
- Shears** Shears E, Dehne K, Murata H, Adubu A, Grimer RJ, Tillman RM, Carter SR 2008. Healing of ungrafted bone defects of the talus after benign tumor removal. Foot Ankle Surg 14:161-165.
- Sherrington** Sherrington PJ 1968. The granulation of sand as an aid to understanding fertilizer granulation. Chem Eng July/August:201-215.
- Sheskey** Sheskey PJ, Williams DM 1996. Comparison of low-shear and high-shear wet granulation techniques and the influence of percent water addition in the preparation of a controlled-release matrix tablet containing HPMC and a high-dose, highly water-soluble drug. Pharm Technol 20:81-92.
- Shiromani** Shiromani PK, Clair J 2000. Statistical comparison of high-shear versus low-shear granulation using a common formulation. Drug Dev Ind Pharm 26:357-364.
- Siewert** Siewert M, Dressman J, Brown CK, Shah VP. FIP/AAPS Guidelines to dissolution *in vitro* release testing of novel/special dosage forms. AAPS PharmSciTech 4:1-10.
- Silverman** Silverman LD, Lukashova L, Herman OT, Lane JM, Boskey AL 2007. Release of gentamicin from a tricalcium phosphate bone implant. J Orthop Res 25:23-29.
- Sivakumar** Sivakumar M, Manjubala I, Panduranga Rao K 2002. Preparation, characterization and *in vitro* release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-chitosan composite microspheres. Carbohydr Polym 49:281-288.

- Slosarczyk** Slosarczyk A, Stobierska E, Paszkiewicz Z 1999. Porous hydroxyapatite ceramics. *J Mater Sci Lett* 18:1163-1165.
- Smolen** Smolen VF, Weigand WA 1976. Optimally predictive *in vitro* drug dissolution testing for *in vivo* bioavailability. *J Pharm Sci* 65:1718-1724.
- Snedecor** Snedecor GW, Cochran WG 1989. Analysis of variance: The random effects model. In *Statistical methods*, 8th ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa, p 237-257.
- Stahl** Stahl H 2000. Single-pot systems for drying pharmaceutical granules. *Pharm Technol Eur* 12:23-34.
- Sunder** Sunder M, Babu NR, Victor SP, Kumar KR, Sampath Kumar TS 2005. Biphasic calcium phosphates for antibiotic release. *Trends Biomater Artif Organs* 18 (2):213-218.
- Taboas** Taboas JM, Maddox RD, Krebsbach PH, Hollister SJ 2003. Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds. *Biomaterials* 24:181-194.
- Tadic** Tadic D, Beckmann F, Schwarz K, Epple M 2004. A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering. *Biomaterials* 25:3335-3340.
- Takagi** Takagi S, Chow LC 2001. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *J Mater Sci Mater Med* 12:135-139.
- Takechi** Takechi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, Kon M, Asaoka K, Suzuki K 1998. Effects of added antibiotics on the basic properties of anti-washout-type fast-setting calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 39:308-316.
- Tamai** Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, Yoshikawa H 2002. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction *in vivo*. *J Biomed Mater Res* 59:110-117.
- Tancred** Tancred DC, McCormack BAO, Carr AJ 1998. A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone. *Biomaterials* 19:2303-2311.

- Tancret** Tancret F, Bouler JM, Hamousset J, Minois LM 2006. Modelling the mechanical properties of microporous and macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Eur Ceram Soc* 26:3647-3656.
- Tang** Tang Y, Taylor RR, Gonzalez MV, Lewis AL, Stratford PW 2006. Evaluation of irinotecan drug-eluting beads: a new drug-device combination product for the chemoembolization of hepatic metastases. *J Control Release* 116:55-56.
- Terrier de la Chaise** Terrier de la Chaise B, Le Perdriel F 1972. The drying of granules. *Pharm Int* 6:16-22.
- Tian** Tian J, Tian J 2001. Preparation of porous hydroxyapatite. *J Mater Sci* 36:3061-3066.
- Turchiuli** Turchiuli C, Eloualia Z, El Mansouri N, Dumoulin E 2005. Fluidised bed agglomeration: agglomerates shape and end-use properties. *Powder Technol* 157:168-175.
- Uchida** Uchida A, Nade SML, McCartney ER, Ching W 1984. The use of ceramics for bone replacement: a comparative study of three different porous ceramics. *J Bone Joint Surg* 66-B:269-275.
- Urist** Urist MR, Lietze A, Dawson E 1984. Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 187:277-280.
- Vallet-Regi** Vallet-Regi M, Balas F, Arcos D 2007. Mesoporous materials for drug delivery. *Angew Chem Int* 46:7548-7558.
Vallet-Regi M, Gonzalez-Calbet JM 2004. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry* 32:1-31.
- Van Blitterswijk** Van Blitterswijk CA, Grote JJ, Kuijpers W, Daems WT, De Groote K 1986. Macropore tissue ingrowth: a quantitative and qualitative study on hydroxyapatite ceramic. *Biomaterials* 7:137-143.
- Viana** Viana M, Jouannin P, Pontier C, Chulia D 2002. About pycnometric density measurements. *Talanta* 57:583-593.
- Victor** Victor SP, Kumar TSS 2008. BCP ceramic microspheres as drug delivery carriers: synthesis, characterization and doxycycline release. *J Mater Sci Mater Med* 19:283-290.
- Visavarungroj** Visavarungroj N, Remon JP 1991. Crosslinked starch as binding agent III. Granulation of an insoluble filler. *Int J Pharm* 69:43-51.

- Vogel** Vogel RI, Schneider L, Goteiner D 1986. The effects of a topically active non-steroidal anti-inflammatory drug on ligature induced periodontal disease in the squirrel monkey. *J Clin Periodontol* 13:139-144.
- Vonk** Vonk P, Guillaume CPF, Ramaker JS, Vromans H, Kossen NWF 1997. Growth mechanisms of high-shear pelletisation. *Int J Pharm* 157:93-102.
- Wang** Wang C, Kasuga T, Nogami M 2005. Macroporous calcium phosphate glass-ceramic prepared by two-step pressing technique and using sucrose as a pore former. *J Mater Sci Mater Med* 16:739-744.
- Wauters** Wauters PAL, Jakobsen RB, Litster JD, Meesters GMH, Scarlett B 2002. Liquid distribution as a means to describing the granule growth mechanism. *Powder Technol* 123:166-177.
- Weiss** Weiss P, Layrolle P, Clergeau LP, Enckel B, Pilet P, Amouriq Y, Daculsi G, Giumelli B 2007. The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in human clinical trial. *Biomaterials* 28:3295-3305.
- Williams** Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH 1989. Altering the progression of human alveolar bone loss with the non-steroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen. *J Periodontol* 16:100-108.
- Xu** Xu HHK, Quinn JB 2002. Calcium phosphate cement containing resorbable fibers for short-term reinforcement and macroporosity. *Biomaterials* 23:193-202.
- Xu HHK, Quinn JB, Takagi S, Chow LC, Eichmiller C 2001. Strong and macroporous calcium phosphate cement: effects of porosity and fiber reinforcement on mechanical properties. *J Biomed Mater Res* 57:457-466.
- Xu HHK, Simon Jr CG 2004. Self hardening calcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering. *J Orthop Res* 22:535-543.
- Xu HHK, Simon Jr CG 2005. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* 26:1337-1348.

- Xu HHK, Takagi S, Quinn JB, Chow LC 2004. Fast-setting calcium phosphate scaffolds with tailored macropore formation rates for bone regeneration. *J Biomed Mater Res* 68 A:725-734.
- Xu HHK, Weir MD, Burguera EF, Fraser AM 2006. Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffolds. *Biomaterials* 27:4279-4287.
- Yamamoto** Yamamoto K, Miyagawa N, Masaoka T, Katori Y, Shishido T, Imakiire A 2008. Cement spacer loaded with antibiotics for infected implants of the hip joint. *J Arth*, in press.
- Yang** Yang L, Ning X, Chen K, Zhou H 2007. Preparation and properties of hydroxyapatite filters for microbial filtration. *Ceram Int* 33:483-489.
- Yao** Yao X, Tan S, Jiang D 2005. Improving the properties of porous hydroxyapatite ceramics by fabricating methods. *J Mater Sci* 40:4939-4942.
- Yoon** Yoon JJ, Park TG 2001. Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *J Biomed Mater Res* 55:401-408.
- York** York P, Rowe RC 1994. Monitoring granulation size enlargement process using mixer torque rheometry. 1st Int Particle Technol Forum, Denver, USA.
- Yoshikawa** Yoshikawa H, Myoui A 2005. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs* 8:131-136.
- Yu** Yu LX, Wang JT, Hussain AS 2002. Evaluation of USP Apparatus 3 for dissolution testing of immediate release products. *AAPS PharmSci* 4:1-5.
- Zeitler** Zeitler JA, Shen Y, Baker C, Taday PF, Pepper M, Rades T 2007. Analysis of coating structures and interfaces in solid oral dosage forms by three dimensional tetrahertz pulsed imaging. *J Pharm Sci* 96:330-340.
- Zeng** Zeng T, Dong XL, Chen ST, Yang H 2007. Processing and piezoelectric properties of porous PZT ceramics. *Ceram Int* 33:395-399.

- Zhang** Zhang HL, Li JF, Zhang BP 2007. Microstructure and electrical properties of porous PZT ceramics derived from different pore-forming agents. *Acta Mater* 55:171-181.
- Zhou** Zhou MX, Shoudt D, Calderon G, Feng M 2007. Application of USP Apparatus 7 to *in vitro* drug release in scopolamine transdermal systems. *Dissolution Technol* 14:25-29.
- Zoulgami** Zoulgami M, Lucas A, Briard P, Gaudé J 2001. A self-setting single-component calcium phosphate cement. *Biomaterials* 22:1933-1937.

European Pharmacopoeia 6th ed, Council of Europe, Strasbourg, 2006.

The United States Pharmacopoeia 22nd ed, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 1991.

The United States Pharmacopoeia 29th ed, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2006.

ASTM F 1088-04 Standard specification for beta-tricalcium phosphate for surgical implantation, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, United States.

International Conference of Harmonization, ICH Q8 Pharmaceutical Development, www.ich.org, 2 September 2008.

US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for industry: Dissolution testing of immediate release solid dosage forms, August 1997.

US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for industry: Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of *in vitro/in vivo* correlations, September 1997.

Image J software, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.