

PHBV를 이용한 황산겐타마이신 서방성 제형의 제조와 방출거동

최학수* · 김상욱* · 윤덕일** · 강길선*** · 이종문*** · 김용식*** · 이해방****†

*전북대학교 고분자공학과, **전북대학교 유기신물질공학과

가톨릭대학교 의과대학 정형외과, *한국화학연구원 생체의료고분자연구팀

(2001년 2월 28일 접수)

Preparation of Biodegradable PHBV Devices Containing Gentamicin Sulfate

Hak Soo Choi*, Sang Wook Kim*, Duck-Il Yun**, Gilson Khang***, John M. Rhee***, Yong Sik Kim***, and Hai Bang Lee****†

*Department of Polymer Science and Technology, Chonbuk National University, 664-14, Dukjin, Chonju 561-756, Korea

**Department of New Organic Materials Engineering, Chonbuk National University, 664-14, Dukjin, Chonju 561-756, Korea

***Department of Orthopedic Surgery, Catholic University Medical School, Youido-dong, Youngdeungpo, Seoul 150-010, Korea

****Biomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, P. O. Box 107, Yusung, Taejon 305-343, Korea

†e-mail : hblee@pado.kRICT.re.kr

(Received February 28, 2001)

요약: 항생제의 서방형 전달을 위해 황산겐타마이신 gentamicin sulfate (GS)을 함유한 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) 제형을 제조하였다. 본 연구에서는 제형의 두께, hydroxyvalerate (HV) 농도, 초기 약물함유량 및 첨가제의 함유에 따른 약물 방출거동의 변화를 조사하였다. 전자주사현미경을 이용하여 제형의 표면형태와 매트릭스 내부 약물의 조성을 관찰한 결과 약물방출 전과 후 모두 거칠고 다공성인 형태를 가짐을 알 수 있었다. 또한, HV와 첨가제의 함량이 증가할수록 약물이 고분자 매트릭스에 더 조밀하게 배열함을 관찰하였고, 이러한 구조가 약물의 방출에 영향을 미침을 알았다. HPLC를 이용하여 약물의 방출량을 측정한 결과, 모든 제형이 복합적인 방출 경향을 나타내었고, 일부 매트릭스는 30일 동안 거의 영차에 가까운 방출거동을 보였다. 이상의 결과에서 우리는 제형의 두께, 고분자 매트릭스의 조성, 첨가제의 함유량 등을 조절함으로써 약물 방출을 제어할 수 있음을 확인하였다.

ABSTRACT: Gentamicin sulfate (GS)-loaded poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) devices were prepared for controlled-release of antibiotics. In this study, the effects of thickness, hydroxyvalerate (HV) content, initial drug-loading ratio, and additive content on the release profile have been investigated. The morphology of devices was examined with scanning electron microscope (SEM) before and after *in vitro* release; their highly porous surface and cross-sectional were observed. It could be suggested that device would be affected by the packing of the HV and additive content, which would depend on their structure. A high performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect and quantify the release of GS from the device. The drug release from all the devices showed biphasic release patterns, and some matrices released the incorporated antibiotic throughout 30 days with a near zero-order release rate. The release patterns were shown to be changed by altering the thickness, copolymer ratio, and additive content.

Keywords: gentamicin sulfate, PHBV, controlled release, zero-order release rate.

서 론

항생제인 황산겐타마이신(GS)은 뼈의 골수강 내에 있는 골수에서 염증으로 인해서 발병되는 골수염의 치료에 주로 사용되는 약물로서, 이는 수술 후에 주사제나 경구복용으로 치료시 보통 4주에서 6주 정도의 치료기간이 필요하다.^{1,2} 이러한 치료방법은 장기간 지속적인 정맥이나 근육주사를 통한 치료는 약물의 과다복용으로 인한 부작용 발생과 치료비용 및 환자의 불편함 등이 문제점으로 제기되어 왔다. 더구나, GS는 장기적 약물 치료에 따른 구토, 현기증, 두통, 피부발진, 신장장애 및 청각장애 등의 심각한 부작용이 있는 것으로 알려진 약물이다.³ 그래서 수술후의 경구 및 비경구적인 투여로 인한 문제점을 해결하고자 수술하는 동안에 감염된 부위의 염증을 제거한 후 바로 수술부위에 약물을 투여할 수 있는 국부적인 제제화가 시도되어 왔다. 또한, 이러한 국부적 치료로 인해 혈중에서의 과량의 약물농도로 인해 생기는 부작용 감소와 반복적인 투여가 아닌 지속적으로 약물을 전달할 수 있는 많은 연구가 병행되어 왔다.

서방성 의약제제에 사용되는 고분자는 생체 내에서 완전히 분해되어 몸밖으로 안전하게 배출되어야 하므로 생분해성과 무독성을 가져야 한다. 1970년대 이후 골수염의 치료에 이용되었던 폴리메틸메타아크릴레이트(PMMA) 구슬제형은 PMMA가 분해성 고분자가 아니므로 몸 속에서 분해되지 않아 약물 방출이 완료된 이후에 재수술을 하여 제형을 제거하는 어려움이 있다.^{4,5} 이러한 문제를 해결하기 위해 생분해성이고 생체적합성인 고분자를 기반으로 하여 약물을 서서히 방출할 수 있는 다양한 형태의 제형에 관한 연구가 진행되어 왔다. 이러한 연구에서 사용되어진 대부분의 고분자는 합성고분자로서 생체 분해성인 폴리락타이드(PLA)와 락타이드-글리콜라이드 공중합체(PLGA)가 주를 이루고 있으나,⁶⁻¹⁴ 최근에 들어서 미생물에 의한 생합성으로 제조되는 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)를 이용한 제형의 연구도 활발히 진행되고 있다. PHA는 미생물이 과량의 탄소원 존재하에서 다른 영양분이 제한될 경우에 축적되는 폴리에스터계 고분자 물질이고, 기존의 상용 합성고분자와 유사한 기계적 물성을 지닌다. 또한, 사용 후에는 미생물에 의해 이산화탄소와 물로 완전히 분

해되기 때문에¹⁶ 환경오염을 야기하는 석유 합성고분자의 대체 물질로 관심의 대상이 되고 있다. 특히, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHBV)는 기계투과성이 우수하고, 혈액적합성과 조직적합성이 우수하며,¹⁹ 느린 분해속도, 가공의 용이성, 방출조절의 용이성 등 입체특이성과 생체적합성을 가지고 있으므로 의료용 고분자 및 항생제 등의 전구체로써의 응용이 기대되고 있다.¹⁸⁻²⁵

본 연구에서는 이전 연구를 바탕으로^{26,27} 국소 부위에서 영차로 약물을 방출할 수 있는 서방성 약물방출 제형을 제조하는데 목적을 두었고, 방출 시간에 따른 적절한 제형을 선택하기 위해 항생제를 함유한 PHBV 필름과 매트릭스로 제형화하여 이들의 두께, 약물의 함유량, 공중합체의 조성, 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC) 함량 등이 GS의 방출에 어떠한 영향을 미치는가를 살펴보았다.

실 험

시약 및 재료. 본 실험에서 사용한 GS는 동신제약에서 제공받았다. PHBV는 미국의 Monsanto Chem.에서 제공받은 D300G, D400G 및 D600G이며, hydroxyvalerate(HV) 함량은 각각 5, 10 및 15 mol% 이었다. 약물의 방출시간을 조절하기 위해 사용한 첨가제 HPC는 미국의 Aldrich Chem.에서 구입한 것으로, 분자량 1000000 g/mole인 제품을 사용하였다. 그 외 모든 화학약품과 유기용매는 high performance liquid chromatography(HPLC) 등급을 사용하였다.

항생제를 함유한 PHBV 제형의 제조. 본 연구에서는 결정성이 큰 고분자인 PHBV에 수용성인 GS를 함유한 제형을 제조하기 위하여 용융압축 성형방법을 사용하였다. 먼저, pellet 상태의 고분자를 미세한 분말 형태로 만들기 위해서 PHBV를 액체질소로 동결된 동결분쇄기(SPEX 6700, Metuchen, USA)를 이용하여 10분 동안 분쇄하였다. 분쇄된 PHBV와 GS를 균일하게 혼합하기 위해 다시 동결분쇄기를 이용하여 5분간 섞어준 후 1분간 교반(Maxi Mix II, Thermolyne, USA) 하였다. 이렇게 혼합된 고분자-약물 혼합물을 각각 필름과 매트릭스 제조용 몰드에 넣어 가온 가능한 압축성형기(MH-50Y CAP 50

tons, Japan)를 이용해 170 °C에서 20 kg_f/cm²의 압력으로 필름은 5분간, 매트릭스는 20분간 각각 유지하였다. GS는 고온, 고압에서도 분해가 되지 않는 안정성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.²⁶ 생성된 용융물은 상온에서 냉각시켜 최종적인 제형을 얻었다. 항생제를 함유한 서방성 제형은 제형의 두께, 초기 약물함유량 및 첨가제의 영향 등을 변수로 하여 제조하였고, 고분자의 종류별 (D300G, D400G 및 D600G)로 각각 3개씩 제조하였다 (Table 1).

XRD 측정과 SEM 관찰. 약물과 고분자의 결정성을 알아보기 위해 X-ray diffraction (XRD, D/MAXIII, Rigaku, Japan)을 이용하여 조사하였다. 분석시 10~50°의 분석각도 (2θ)에서 0.1 deg/min의 속도로 분석하였다. 제조한 제형의 표면과 내부 형태는 전자주사현미경 (SEM, scanning electron microscope, S-2250N, Hitachi, Japan)을 사용하여 관찰하였다. SEM 사진을 찍기 위하여 양면테이프를 붙인 금속판 위에 충분히 건조한 샘플을 고정시킨 후 플라즈마 스퍼터 (SC 500K, Emscope, UK)를 이용하여 아르곤 분위기 하에서 1분 30초 동안 백금으로 코팅하였다. 또한 매트릭스의 단면도를 보기 위

해 샘플을 액화질소에 넣어 동결시켜 단면을 얻었다. SEM 관찰은 약물방출 전과 후 모두 동일하게 실시하였다.

생체의 방출 실험 및 분석. 제조한 제형을 각각 phosphate buffered saline (PBS, pH; 7.4, Sigma Chem., USA) 용액 50 mL에 넣어 약물을 추출하였다. 제형을 담은 용기는 37 °C로 유지되는 항온조에서 흔들어주었고, 100 μL씩 일정한 간격으로 샘플을 채취한 후 동일한 양의 PBS 용액을 보충해 넣었다.

방출된 GS의 농도를 분석하기 위하여 o-phthalaldehyde (OPA)를 첨가하여 15분간 유도과정을 거친 후, HPLC (HP 1100 Series, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 분석하였다.^{8,26} 분석시 컬럼은 역상컬럼 (UG 120 5 μm, 4.6×150 mm, USA)을 사용하였고, UV 파장은 330 nm에서 검출하였다. 이동상은 methanol, distilled water, glacial acetic acid가 각각 70 : 25 : 5 vol%로 구성되었고, 여기에 5 g의 sodium 1-heptanesulfonate를 첨가하였다. OPA 유도방법과 HPLC 분석은 USP에 따라 실시하였다.

GS의 생물학적 활성을 관찰하기 위해 항생제 원판 확산법을 이용하였다. 본 실험에는 영양 육즙 (nutrient broth; beef extract, peptone, Difco Laboratories, USA)에서 24시간 동안 배양한 황색 포도상구균 (*Staphylococcus aureus* ATCC 29737)을 이용하였다. 생체의 방출실험에서 얻어진 용출액은 인산염 완충액을 이용하여 100배 희석한 후에 3 mm cloning disk (Sigma Chem., USA)에 적셔서 영양한천 (nutrient agar, Difco Laboratories) 배지 위에 도포된 황색 포도상구균의 영양 육즙층 위에 떨어뜨렸다. 37 °C에서 24시간 동안 균을 성장시킨 후에 각 배지의 항생영역을 antibiotic zone reader (Fisher-Lilly 290, Fisher Scientific, USA)를 이용하여 측정하였다.^{29,30}

결과 및 고찰

고분자와 약물 혼합물의 물리화학적 특성. 본 실험에서 사용한 고분자인 PHBV는 Figure 1과 3에서와 같이 입체 규칙적이고, HB와 HV의 랜덤한 구조로 이루어져 있다. 또한, PHBV와 약물의 혼합에 따

Table 1. Preparation Conditions of GS-loaded PHBV Devices

batch	GS ratio (%)	polymer (g)	drug (g)	additive (%)	thickness (mm)
F1	5	0.95	0.05	-	0.1
F2	10	0.90	0.10	-	0.1
F3	20	0.80	0.20	-	0.1
F4	5	0.95	0.05	-	0.2
F5	10	0.90	0.10	-	0.2
F6	20	0.80	0.20	-	0.2
M7	10	0.09	0.01	-	0.3
M8	10	0.27	0.03	-	0.9
M9	10	0.45	0.05	-	1.5
M10	10	0.90	0.10	-	3.0
M11	10	1.35	0.15	-	4.5
M12	5	0.95	0.05	-	3.0
M13	20	0.80	0.20	-	3.0
M14	10	0.85	0.10	HPC (5)	3.0
M15	10	0.80	0.10	HPC (10)	3.0

F1 to F6; different initial drug-loading and film thickness. M7 to M11; different matrix thickness. M10, M12, and M13; different initial drug loading. M14 and M15; different additive ratio.

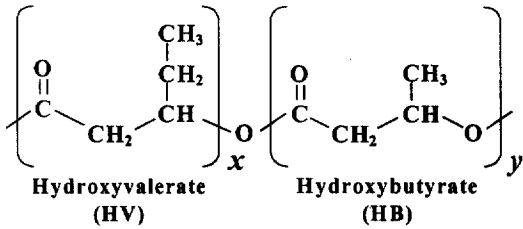


Figure 1. The chemical structure of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV).

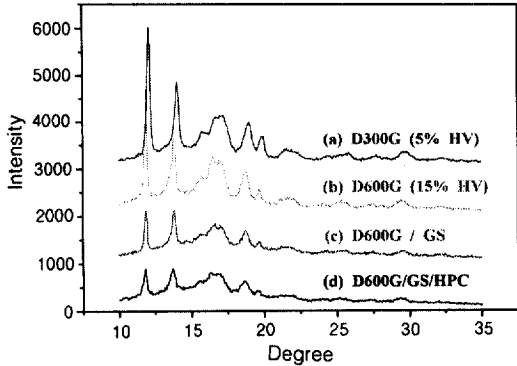


Figure 2. X-ray diffraction patterns of (a) D300G, (b) D600G, (c) 10% GS/D600G mixture, and (d) 10% GS/10% HPC/D600G mixture.

큰 결정성을 알아보기 위하여 고분자의 조성 및 GS 함유량과 HPC의 첨가에 따른 결정영역의 변화를 XRD를 이용하여 측정하였다. 그 결과, Figure 2에서와 같이 HV 함유량이 5%인 D300G가 가장 결정성이 크게 나타났고, HV 함유량이 15%인 D600G와 약물을 함유한 생분해성 제형에서 이러한 고분자지지체의 결정영역의 변화는 약물의 포접 및 방출거동에 많은 영향을 미친다.²⁸ 일반적으로 생분해성 제형은 고분자지지체 내에서 약물 확산과 물로 인한 고분자의 침식에 의한 분해의 두 가지 기구에 의해 약물을 방출한다. 본 실험을 통해 제작된 제형에서는 고분자지지체의 결정성과 다공성이 큰 구조일수록 단순 확산에 의한 약물의 초기 방출량이 증가하는 현상을 관찰하였다.

제형의 형태 관찰. Figure 3에서는 약물과 고분자의 형태와 제형들의 방출 전/후의 표면 및 내부구조

를 SEM을 통해 관찰한 결과를 나타내었다. 방출 전의 사진에서는 매우 둥근 구형의 약물이 고분자지지체 내부에 일정치 않게 분산되어 있다가 방출이 완료된 후에는 약물이 분포해 있던 공간을 중심으로 구멍이 크게 변해 있음을 관찰할 수 있다. 제형의 내부를 절단한 단면을 살펴보면, 전반적으로 친수성인 약과 소수성인 고분자가 서로 잘 결합하지 못하고 덩어리로 뭉쳐있는 현상을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 HV의 함량이 증가할수록, HPC의 첨가량이 증가할수록 감소되었다. 따라서, HV의 함량과 첨가제에 따라서 제형의 구조를 조절한다면, 입자들의 회합현상을 배제하고 약물이 고분자지지체 내부에 골고루 분산되어 방출속도를 일정하게 제어할 수 있을 것으로 사료되었다.

제형의 두께에 따른 방출 경향. Figure 4는 제형의 두께에 따른 GS의 방출거동을 나타낸 것이다. D600G와 10%의 GS로 만들어진 제형에서 필름(F2)과 매트릭스(M7~M11)는 두께가 두꺼워질수록 방출 시간이 5~30일로 점차 증가함을 보였다. 또한, 초기 방출효과도 점차 감소하여 거의 영차에 가까운 방출을 보임을 관찰하였다. 이것은 제형의 두께가 두꺼워질수록 용매와 고분자 사이에서 팽윤과 확산에 의한 약물의 방출이 줄어든다는 것을 의미한다.²⁶ 이러한 현상은 항균실험(Figure 5)을 통해 항균영역의 크기를 측정함으로써 HPLC 분석분과 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 위의 결과를 통해 제형의 두께를 조절함으로써 약물의 방출시간을 조절할 수 있다는 사실을 증명할 수 있다. D300G와 D400G를 고분자지지체로 사용한 제형에서도 같은 현상을 관찰하였다.

초기 약물함유량에 따른 방출 경향. Figure 6 (F1, F2 및 F3)과 Figure 7 (M10, M12 및 M13)은 제형에 따라 초기 약물함유량이 *in vitro* 방출에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 동일조건(1g 기준, D600G/GS)에서 제조된 제형에서 5%의 약물을 함유한 제형은 20%를 함유한 제형보다 초기 방출효과가 줄었음을 알 수 있다. 친수성인 약물은 소수성인 고분자와 균일한 분산이 어려운데, 약물의 농도가 증가할수록 골고루 분산되는 것보다 약물이 덩어리를 형성하여 고분자 내에서 뭉쳐 있다가 물의 유입에 따라 방출량이 증가한 것으로 판단된다. 그래프에서와

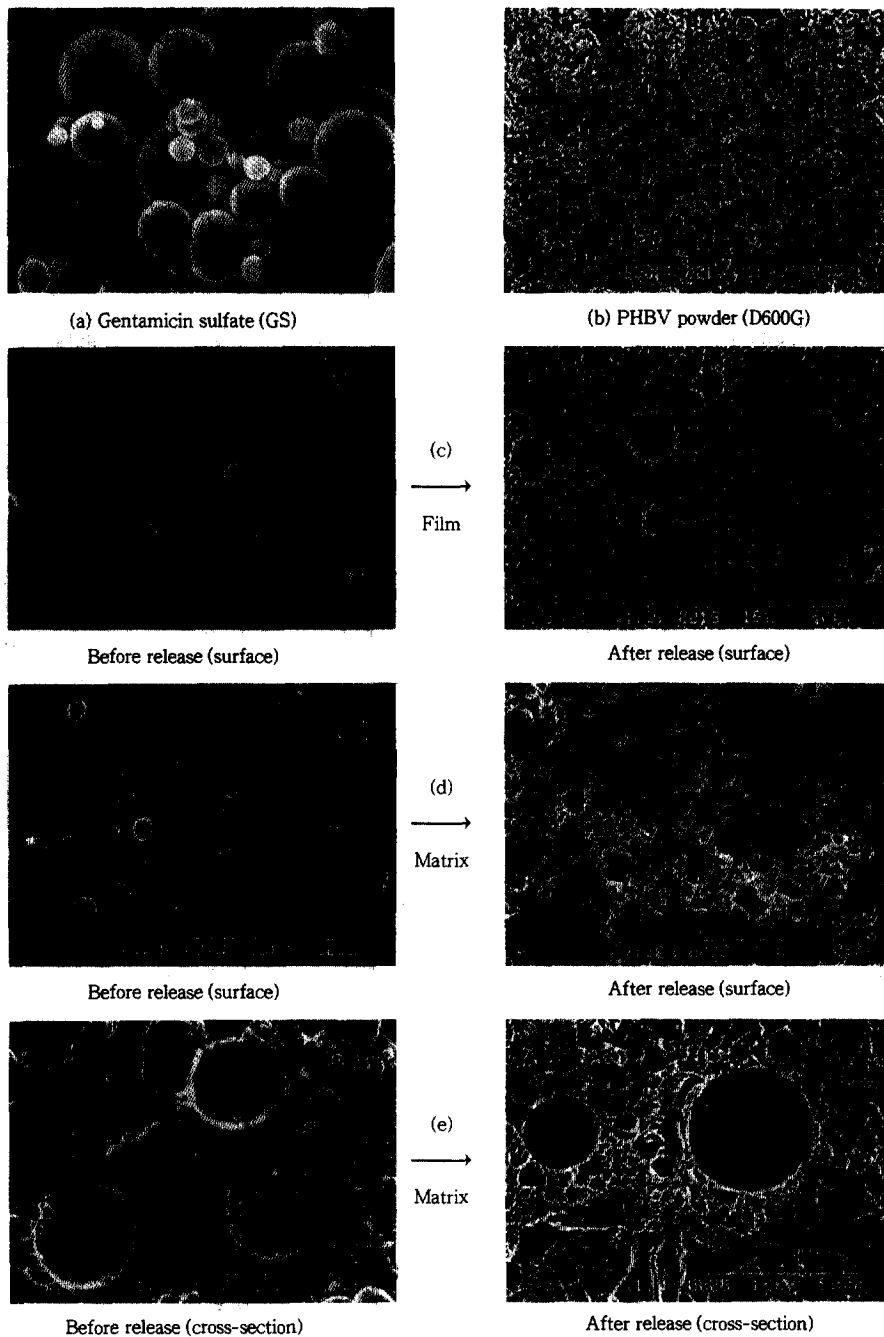


Figure 3. SEM micrographs of (a) GS, (b) D600G powder, (c) surface of GS/D600G film, (d) surface of GS/D600G matrix, and (e) cross-section of GS/D600G matrix.

같이 약물을 5% 함유한 제형은 2일 후에 약 12%, 5일 후에는 약 35%의 약물을 초기 방출효과 없이 거

의 영차로 20일 동안 지속적으로 방출하였다. 이에 비해 약물을 20% 함유한 제형은 2일 후에는 약 26%,

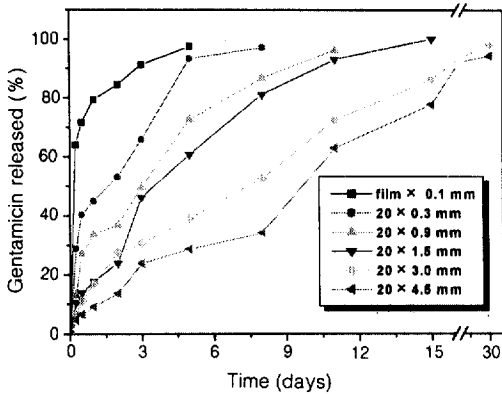


Figure 4. Effect of matrix thickness on the GS release profiles (10% GS loading). [■] F2, [●] M7, [▲] M8, [▼] M9, [◆] M10, and [◄] M11.

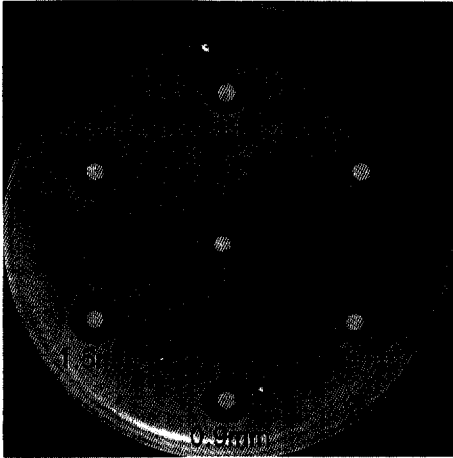


Figure 5. Bacterial inhibition zone test with different matrix thickness (8-day release; 10% GS loading). SH (Standard high; 1 mg/mL), SL (Standard low; 0.1 mg/mL), 0.1 mm (F2), 0.3 mm (M7), 0.9 mm (M8), 1.5 mm (M9), and 3.0 mm (M10).

5일 후에는 약 62%의 방출되는 등 초기 방출이 증가함을 관찰하였다. 이는 약물의 함량이 증가하면서 약물 상호간에 접촉할 수 있는 확률이 높아지며, 이들이 서로 채널을 형성하여 수용성 약물이 낮은 함량의 것보다 용이하게 용출되는 것으로 추측된다. 이러한 현상은 항균영역 측정 (Figure 8)을 통해서도 HPLC 분석분과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 따라서, 초기 방출의 감소와 선형에 가까운 방출거동은

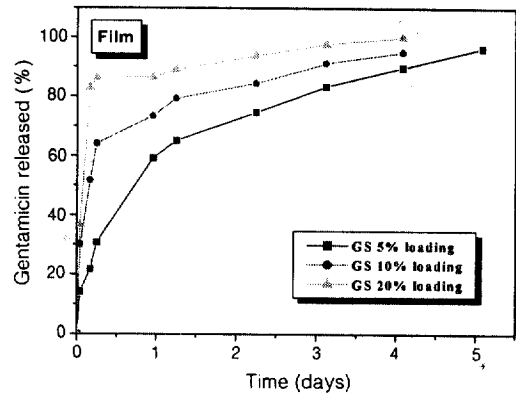


Figure 6. Effect of drug loading ratio on the GS release profiles (0.1 mm thickness film). GS 5% (F1), GS 10% (F2), and GS 20% (F3).

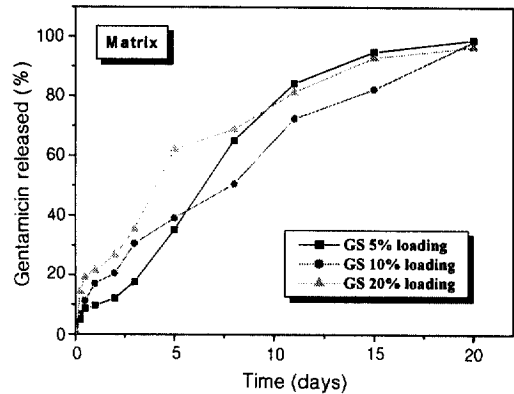


Figure 7. Effect of drug loading ratio on the GS release profiles (3.0 mm thickness matrix). GS 5% (M12), GS 10% (M10), and GS 20% (M13).

약물함유량의 조절과 약물을 고분자지지체 내에 균일하게 분산시킴으로써 얻을 수 있다.

고분자의 종류에 따른 방출 경향. 생분해성 고분자인 PHBV를 이용한 항생제 방출 제형에서 고분자의 조성 중 HV의 함량 증가에 따른 방출거동의 변화를 D600G와 10% GS를 함유한 필름 (Figure 9)과 매트릭스 (Figure 10)를 통해 각각 확인하였다. 두 그래프에서 모두 HV의 함량이 증가할수록 초기방출량이 줄어들었고, 방출거동이 선형성을 보임을 알 수 있다. 이는 XRD를 통해 관찰했듯이 고분자 내에 HV의 함량이 증가할수록 결정성이 감소하므로 매트릭스 내에서 약물이 고분자와 더 조밀하게 밀집되었

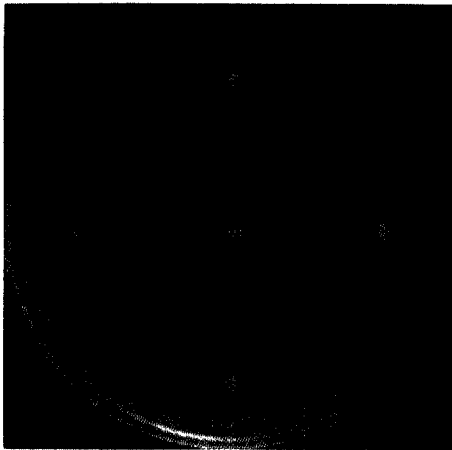


Figure 8. Bacterial inhibition zone test with PHBV matrices of different drug loading ratio (8-day release). SH (Standard high; 1 mg/mL), SL (Standard low; 0.1 mg/mL), 5% (M12), 10% (M10), and 20% (M13).

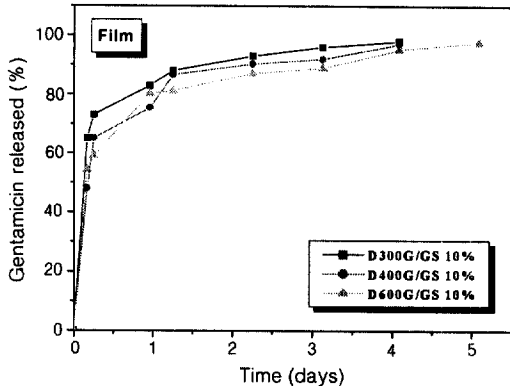


Figure 9. Effect of HV content on the GS release profiles (F2: 0.1 mm thickness).

고, 이로 인해 물의 침투로 인한 확산이 제어되어 선형의 방출거동을 보인 것으로 판단된다.²⁸

첨가제에 따른 방출 경향. D600G와 10% GS (1g 기준)로 이루어진 혼합물에 친수성 고분자인 HPC를 5%와 10% 첨가시 약물의 방출거동에 미치는 영향을 조사하였다 (Figure 11; M10, M14 및 M15). 첨가제를 넣지 않은 제형은 일반적으로 물에 의한 침식과 채널을 통한 확산에 의한 방출을 보인다.¹² 이는 SEM 사진에서 관찰했듯이 결정영역이 많

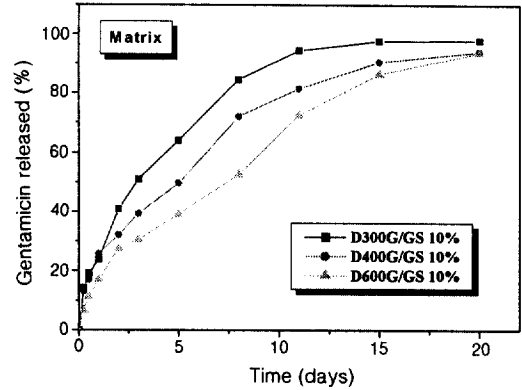


Figure 10. Effect of HV content on the GS release profiles (M10: 3.0 mm thickness).

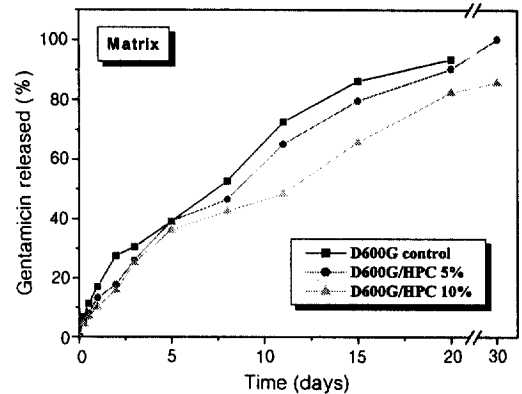


Figure 11. Effect of additive ratio on the GS release profiles. [■] M10, [●] M14, and [▲] M15.

은 고분자와 수용성 약물이 서로 조밀하게 결합하지 못하기 때문이다. 이에 반해 무정형인 HPC를 첨가하면, 첨가제의 무정형영역이 약물을 포집하여 고분자 지지체 내에 조밀하게 밀집시키게 되고, 이로 인해 물에 의한 단순확산 현상을 제어하여 거의 일정한 방출 속도를 나타낼 수 있었다. 5%와 10%의 HPC 함유 제형을 비교하면 HPC를 10% 첨가한 제형이 약물방출 속도 지연효과가 큰 현상을 관찰할 수 있다. 따라서, 첨가제의 선택과 이의 함유량을 조절함으로써 제형에서 약물의 방출을 조절할 수 있음을 알 수 있었다.¹²

결 론

본 연구에서는 생체적합성과 생분해성을 가진 PHBV를 이용한 용융압축 성형방법을 사용하여 항생제를 서서히 방출하는 생분해성 제형을 제조하였고, 생체 외에서 이들 제형의 방출거동을 관찰하였다. 실험 결과와 같이 제조 조건을 달리하여 여러 형태의 방출패턴을 얻을 수가 있었다. 일반적으로 제형의 두께가 두꺼워질수록, HV 함량이 증가할수록, 그리고 적절한 초기약물함유량 등의 조건을 조절함으로써 약물은 영차에 가까운 방출을 보였다. 또한, 10% GS와 D600G의 혼합물에 HPC를 첨가함으로 30일 이상 약물을 방출하는 제형을 얻을 수 있었고, 5~30일 이내에서 원하는 기간 동안 약물을 방출하는 제형을 제조하는 기술도 확립하였다. 이러한 용융압축 성형방법은 유기용매와 접촉하지 않으므로 미립구 등 용매증발법을 이용한 제형 제조에 제약이 있는 서방성 방출제제를 제조하는데 유리하고, 첨가제 등을 통해 고분자지지체를 통한 단순 확산에 의한 약물의 초기방출을 제어할 수 있다는 장점을 갖고 있다. 이를 기반으로 현재 실험동물들을 통한 생체내의 방출거동 실험을 수행중이다.

감사의 글: 본 연구는 한국과학재단(97-0401-03-3) 및 보건복지부(HMP-98-G-2-050-A)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. D. Schlossberg, "Orthopaedic Infection", Springer-Verlag, New York, 1988.
2. R. Coombs and R. H. Fitzgerald, "Infection in the Orthopaedic Patient", Butterworths, Boston, 1989.
3. J. Mauduit, N. Buhk, and M. Vert, *J. Control. Rel.*, **23**, 221 (1993).
4. X. Zhang, P. Wyss, D. Pichora, and M. F. A. Goosen, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 718 (1994).
5. S. B. Trippel, *J. Bone Joint Surg.*, **68A**, 1297 (1986).
6. G. Khang, J. C. Cho, J. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **9**, 45 (1999).
7. G. Khang, J. C. Cho, J. M. Rhee, J. S. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Preprints*, **40**, 288 (1999).

8. J. C. Cho, G. Khang, J. M. Rhee, Y. S. Kim, J. S. Lee, and H. B. Lee, *Korea Polymer J.*, **7**, 79 (1999).
9. G. Khang, J. H. Lee, J. W. Lee, J. C. Cho, and H. B. Lee, *Korea Polymer J.*, **8**, 80 (2000).
10. J. C. Cho, G. Khang, H. S. Choi, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**(5), 728 (2000).
11. H. B. Lee, G. Khang, J. C. Cho, J. M. Rhee, and J. S. Lee, "Fentanyl-loaded PLGA Microspheres for Local Anesthesia", in "Controlled Drug Delivery; Designing Technologies for the Future", eds. by K. Park and R. J. Mrrnsy, ACS Symp. Series 752, p. 385, ACS, Washington D.C., 2000.
12. H. Okada and H. Toguchi, *CRC Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.*, **12**, 1 (1995).
13. S. S. Sampath, K. Garvin, and D. H. Robinson, *Int. J. Pharm.*, **78**, 165 (1992).
14. A. A. Firsov, A. D. Navarov, and I. P. Fomina, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **13**, 1651 (1987).
15. M.-C. Bissery, F. Valeriote, and C. Thies, "In vitro and in vivo, Evaluation of BCNU-loaded Microspheres Prepared from Poly((±)-lactide) and Poly(β-hydroxybutyrate)", in "Microspheres and Drug Therapy", Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects, eds. by S. S. Davis, L. Illum, J. G. McVie, and Tomlinson, p. 217, Elsevier Sci., New York, 1984.
16. K. Juni and M. Nakano, *CRC Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.*, **3**, 209 (1987).
17. S. Gogolewski, M. Jovanoic, S. M. Perren, J. G. Dillon, and M. K. Hughes, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1135 (1993).
18. P. J. Hocking, *J. M. S.-Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **C32**, 35 (1992).
19. N. Gangrade and J. C. Price, *J. Microencapsulation*, **8**, 185 (1991).
20. S. Akhtar and C. W. Pouton, *Drug News Perspectives*, **2**, 89 (1989).
21. T. W. Atkins and S. J. Peacock, *J. Microencapsulation*, **13**, 709 (1996).
22. I. Gursel and V. Hasirci, *J. Microencapsulation*, **12**, 185 (1995).
23. B. R. Conway, J. E. Eyles, and H. O. Alpar, *J. Control. Rel.*, **49**, 1 (1997).
24. F. Koosa, R. H. Muller, S. S. Davis, and M. C. Davies, *J. Control. Rel.*, **9**, 149 (1989).
25. K. Juni, M. Nakano, and M. Kubota, *J. Control. Rel.*, **4**,

- 25 (1986).
26. G. Khang, H. S. Choi, J. M. Rhee, S. C. Yoon, J. C. Cho, and H. B. Lee, *Korea Polymer J.*, **8**(6), 253 (2000).
27. G. Khang, S. W. Kim, J. C. Cho, J. M. Rhee, S. C. Yoon, and H. B. Lee, *Bio-Med. Mater. Eng.*, in press (2000).
28. S. Akhtar, C. W. Pouton, L. J. Notarianni, and P. L. Gould, *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 118 (1988).
29. V. Iannuccelli, G. Coppi, M. Bondi, M. Pinelli, A. Mingione, and R. Camerani, *Int. J. Pharm.*, **143**, 187 (1996).
30. D. Sendil, I. Gursel, D. L. Wise, and V. Hasirci, *J. Control. Rel.*, **59**, 207 (1999).