

고분자 혼합법과 다중 에멀전법에 의해 제조된 생분해성 미립구로부터 펩타이드의 용출에 관한 연구

정구영 · 김중권* · 박목순* · 명평근†

충남대학교 약학대학, *동국제약(주)

(2006년 6월 29일 접수 · 2006년 7월 20일 승인)

Release Profile of Peptide from Biodegradable Microspheres: Comparison of Blending and Multiple Emulsion Method

Goo Young Jung, Jung kwoun Kim*, Mork-Soon Park* and Pyung-Keun Myung†

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

*Department of Pharmaceutical Research, Dongkook Pharmaceutical Research Institute, Jincheon, Chungbuk 365-834, Korea

(Received June 29, 2006 · Accepted July 20, 2006)

ABSTRACT—The novel microsphere blending and multiple emulsion method by single process was tried to prepare sustained release microspheres which release a physiologically active substance for long periods of time. A drug was separately dissolved in each of two or more oils containing biodegradable polymers to give the primary oil phases. The primary oil phases were dispersed in single aqueous phase in succession. From the drug-dispersed solution, the organic solvent was removed to produce microspheres. The accelerated drug release from the microsphere formulation prepared by single process through the multiple emulsion method was very similar to a physical blending of separately prepared microspheres using the same polymers. But long term release was not same. In this study, leuprorelin acetate loaded poly(lactide-co-glycolide) microsphere formulation for one-month delivery was developed by the multi-emulsion method followed by solvent extraction/evaporation method.

Key words—Microspheres, Biodegradable polymers, Blending, Multiple emulsion

생분해성 고분자를 담체로 하여 제조한 미립구는 생물학적으로 활성인 펩타이드나 단백질의 약물전달에 있어서 효과적인 시스템이다. 미립구의 서방출성 특성은 피하 및 근육 주사시 빈번한 투여 횟수를 감소시키고 약물의 치료학적 혈중 농도를 장기간 유지시킴으로서 환자의 순응도를 증진시키는 효과가 있다. 이러한 약물전달시스템의 부가적인 장점으로서는 생체적합성 및 생분해성이기 때문에 약물의 장기 방출에 유리하며, 높은 흡수성과 독성이 없는 분해산물의 생성으로 생체내에서 약물의 효율적인 이용이 가능하다.¹⁾

Leuprorelin acetate는 천연의 황체형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH, Luteinizing hormone-releasing hormone) 동족체의 반감기를 연장시킨 합성 nonapeptide로서, 치료학적으로 뇌하수체의 성선자극 호르몬 분비를 억제하는 작용약(agonist)으로 작용한다. Leuprorelin을 함유한 서방출성 제제로는 1980년대 일본 Takeda사가 개발한 Lupron®이 상용화되어 있으며, 이 제품은 W/O/W법으로 제조된 미립구 형태

의 저장체(depot)이기 때문에 1개월 또는 수개월동안 약물을 지속적으로 방출하여 궁극적으로 testosterone을 억제함으로써 호르몬 의존성 전립선암 치료에 사용되고 있다.²⁾

일반적으로 서방출성 약물전달시스템의 영역에서 사용되는 고분자는 폴리락티드(PLA) 및 폴리락티드/글리콜리드 공중합체(PLGA)가 있으며, 전자는 락티드의 비율이 100이고³⁾ 후자의 경우 락티드/글리콜리드의 비율에 의해 50:50,⁴⁾ 65:35,⁵⁾ 75:25,⁶⁾ 85:15⁷⁾ 등으로 구분되어 진다. 이러한 약물 전달시스템에서의 약물 방출기간의 조절은 락티드와 글리콜리드의 비율과 같은 화학적 요인뿐만 아니라 고분자의 분자량, 친수성 그리고 제조된 미립구의 입자 크기와 같은 물리적 요인도 크게 작용한다. 예를 들어 *in-vitro*에서 저분자량 PLGA 50:50은 고분자량 PLGA 50:50보다 빠르게 분해되며, 락티드의 비율에 따라 PLGA 50:50 > PLGA 67:33 > PLA 100의 순서로 분해 속도가 결정되는 것을 보고한 문헌이 있다.⁸⁾ 결과적으로 PLGA와 PLA를 서방출성 약물전달시스템에 적절하게 조합하면 하나의 고분자를 사용하는 것에 비하여 초기와 후기의 약물 방출률을 동시에 조절할 수 있음을 알 수 있다.

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)821-5929, E-mail : pyung@cnu.ac.kr

그러나 2가지 이상의 고분자를 단순히 혼합하여 미립구를 제조하게 되면 각각의 미립구에 특성이 다른 고분자가 물리적으로 섞이게 되어 약물의 용출 특성을 예측하는데 있어서 어려움이 따르게 되며, 이 때문에 펩타이드와 같은 고가의 약물을 제품화하여 대량 생산에 적용시 비용 측면에서 많은 부담이 생기게 된다.

이러한 관점에서 본 연구에서는 1개의 수상에 2개 이상의 유상을 연속적으로 주입하여 단일공정으로 각각 성질이 다른 미립구를 제조함으로써 1개월 동안 유효성분을 일정하게 용출할 수 있는 서방출성 제제를 제조하고 평가하는데 그 목적이 있다.

실험 방법

재료 및 기기

주성분인 leuprorelin acetate은 Bachem AG(Switzerland, Bubendorf)에서 구입하였으며, 서방형 담체로서 사용된 생분해성고분자는 Boehringer Ingelheim(Deutschland, Ingelheim)의 RG502H(inherent viscosity: 0.18 dl/g)과 RG503H(inherent viscosity: 0.37 dl/g)를 사용하였다. 고분자를 용해시키는데 사용된 용매로서 메틸렌클로라이드와 메탄올은 HPLC급을 사용하였으며, 폴리비닐알코올(PVA, M.W. 13000-23000)은 Sigma사에서 구입하였다. 기타 실험에 사용된 시약은 특급 이상의 것을 사용하였다.

에멀전을 제조할 때 사용된 균질기는 LR4-Mixer(Silverson, U.K.)을 사용하였으며, 주성분의 정량을 위한 HPLC는 Agilent 1100 series를 사용하였다. 미립구를 건조하기 위해서 사용된 동결건조기는 Consol 12 model(Virtis)이었다. 입자분포 측정은 Windox 7.0 program이 내장된 laser diffraction particle size analyzer(Sympatec, Deutschland)를 사용하였고, 제조된 미립구의 morphology의 관찰을 위하여 사용된 주사전자현미경은 Sirion(FEI, Netherland) model 이었다. 혈장내의 testosterone의 양은 enzyme immunoassay(EIA) kit(Cayman Chemistry, USA)를 사용하여 측정하였다.

미립구의 제조

RG502H 미립구의 제조-1.00 g의 메탄올에 0.28 g의 leuprorelin acetate을 용해시키고 4.01 g의 메틸렌클로라이드에 1.72 g의 RG502H를 용해시킨 후, 두 유기용매를 약 10분간 격렬하게 혼합하여 에멀전을 제조한다(DP, Dispersion Phase). 이 용액을 20°C에서 5000 rpm으로 교반하는 1.0% PVA 수용액(CP, Continuous Phase) 500 ml에 천천히 적가한다. 10분 후에 온도를 41°C로 승온하고 교반속도를 800 rpm으로 낮춰 2

시간동안 유기용매를 휘발시킨다. 이후 미립구를 경화시키기 위하여 일정한 교반속도를 유지하면서 온도를 20°C로 유지하면서 30분간 냉각시킨다. 미립구를 수득하기 위하여 3500 rpm에서 15분간 원심분리하고 증류수로 3회 세척하여 유리된 leuprorelin을 제거하고 48시간 동안 동결 건조하였다.

RG503H 미립구의 제조-1.72 g의 메탄올에 0.28 g의 leuprorelin acetate을 용해시키고, 6.88 g의 메틸렌클로라이드에 1.72 g의 RG503H를 용해시킨 후, 두 유기용매를 약 10분간 격렬하게 혼합하여 에멀전을 제조한다. 이하의 과정은 RG502H 미립구의 제조와 동일하였다.

RG502H/RG503H=1/1로 혼합된 미립구의 제조-1.29 g의 메탄올에 0.28 g의 leuprorelin acetate을 용해시키고, 5.16 g의 메틸렌클로라이드에 각각 0.86 g의 RG502H와 RG503H를 혼합하여 용해시킨 후, 두 유기용매를 약 10분간 격렬하게 혼합하여 에멀전을 제조한다. 이하의 과정은 RG502H 미립구의 제조와 동일하였다.

RG502H/RG503H=1/1 다중 에멀전에 의한 미립구의 제조-0.50 g의 메탄올에 0.14 g의 leuprorelin acetate을 용해시키고, 2.00 g의 메틸렌클로라이드에 0.86 g의 RG502H를 용해시킨 용액(DP-1)과 0.86 g의 메탄올에 0.14 g의 leuprorelin acetate을 용해시키고, 3.44 g의 메틸렌클로라이드에 0.86 g의 RG503H를 용해시킨 용액(DP-2)을 각각 제조한다. DP-1과 DP-2를 20°C에서 5000 rpm으로 교반하는 1.0% PVA 수용액 500 ml에 연속적으로 적가한다. 이하의 과정은 RG502H 미립구의 제조와 동일하였다.

Table I에 미립구를 제조하기 위해 사용된 생분해성고분자의 종류와 leuprorelin의 양 및 투명한 유기용매상을 제조하기 위해 사용되는 메탄올과 메틸렌클로라이드의 비율을 나타내었다.

미립구의 특성 평가

입자분포-제조된 미립구 약 100 mg을 증류수 50 ml에 현탁하여 침전방지를 위해 교반하면서 632 nm의 He-Ne laser source로 회전 패턴을 검출한 후, 입자분포를 측정하였다.

입자의 형태 측정-미립자의 외관을 관찰하기 위하여 미립구 약 50 mg을 aluminum stub에 고정시키고 진공도 0.1 torr 및 고전압(10 kV)하에서 15분간 백금으로 코팅한 후, SEM 본체에 장착하고 image analyzer program을 사용하여 미립구의 morphology를 관찰하였다.

Leuprorelin의 함량 측정-미립구 약 10 mg을 메틸렌클로라이드 2 ml에 넣어 완전히 용해시킨 후, 0.1 M Acetate buffer (pH 4.0) 8 ml를 가하여 수층으로 추출한 다음 0.45 μm syringe filter로 여과한 후, HPLC로 검출파장 210 nm에서

Table I—Manufacturing Parameters for Microspheres

Formulation	Target drug load (%)	Polymer Conc. (% w/w)	MeOH/CH ₂ Cl ₂ (% w/w)
RG502H	14.0	30	0.25
RG503H	14.0	20	0.25
RG502H/RG503H=1/1(Blend)	14.0	25/25	0.25
RG502H/RG503H=1/1(Multi)	14.0	30/20	0.25

미립구내에 봉입되어 있는 leuprorelin의 함량을 측정하였다.

In-vitro 가속 용출시험-미립구 100 mg을 응집방지를 위해 0.1% 폴리소르베이트 80 용액을 넣은 유리병에 넣고 55°C에서 125 rpm으로 진탕한다. 미리 정해진 시간에 내용물을 균일하게 분산시킨 후 1 ml를 취한다. 이 용액을 원심 분리하여 상등액을 취해 UV-spectrophotometer를 이용하여 검출 파장 280 nm에서 용출된 leuprorelin의 양을 측정하였다.

In-vitro 장기 용출시험-제조된 미립구 약 10 mg을 내용량 12 ml의 시험관에 넣고 10 ml의 0.033 M phosphate buffer saline(PBS, pH 7.0)에서 25 rpm으로 회전시킨다. 이후 37°C에서 인큐베이션하여 1, 4, 7, 14, 21, 28일에 상등액 2 ml를 취하여 원심분리하고 HPLC로 용출된 leuprorelin의 양을 측정하였다. 이때 사용된 컬럼은 YMC C-18(4.6×150 mm)이며, 주입량은 20 µl이고 검출파장은 210 nm이었다. 이동상으로는 0.1% TFA가 함유된 물(이동상 A)과 0.1% TFA가 함유된 아세토니트릴(이동상 B)을 사용하였으며, 농도 구배는 최초 0-20분 동안 15%→70%(이동상 B)로 leuprorelin을 분리하고 이후 10분 동안 15%(이동상 B)를 유지하였다.

혈중 testosterone level 측정-대한바이오링크(주)에서 구입한 체중 250-300 g의 수컷 Sprague Dawley rat를 7일 동안 안정화시키고 leuprorelin으로서 9.0 mg/kg의 투여용량으로 D-만니톨 100 mg, sodium-CMC, polysorbate 10 mg가 함유된 주사용수 1 ml에 균일하게 현탁한 후, rat의 등뒤에 피하주사 하였다. 이후 diethyl ether로 마취시킨 다음 꼬리 정맥으로부터 6시간, 1, 4, 7, 14, 21, 28, 35일에 혈액 600-800 µl를 채취하였다. 5분 동안 10000 rpm에서 원심분리한 시료를 1.0 ml의 polypropylene tube에 넣고 -70°C에 냉동 보관하였다. 검체를 분석할 때는 Cayman chemical(MI, USA)

에서 구입한 enzyme immunoassay(EIA) kit(Lot.# 582701)를 이용하였다. Control으로는 약물을 투여하지 않은 rat의 혈청을 사용하였다.

결과 및 고찰

미립구의 입자분포

제조된 미립구는 Table II와 Figure 1에 나타난 바와 같이 0에서 150 µm의 입자 분포를 나타내었다. 실제로 D-만니톨 100 mg, sodium-CMC, polysorbate 10 mg가 함유된 용액에 균일하게 현탁하였을 때, 23 G의 주사바늘에 막힘이 없었다. 또한 RG503H로 제조된 미립구의 경우 x(50%)의

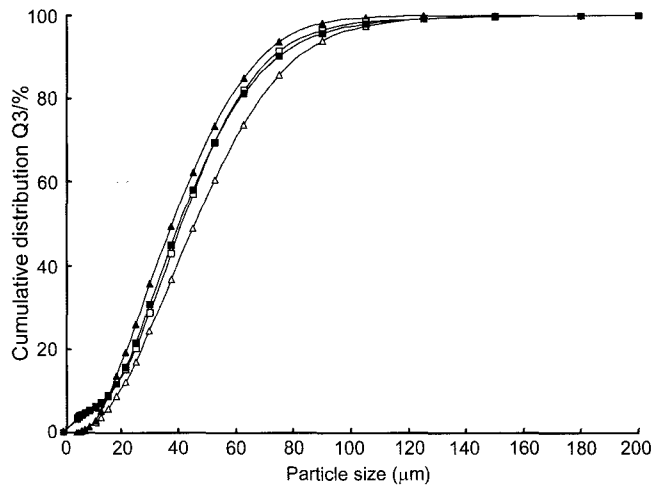


Figure 1—Cumulative size distribution of microspheres containing leuprorelin. △: RG502H, ▲: RG503H, □: RG502H/RG503H=1/1(Blend), ■: RG502H/RG503H=1/1(Multi).

Table II—Particle Size and Practical Drug Loading of the Formulated Microspheres Containing Leuprorelin (n=3)

Formulation	Particle size (µm)			Drug content (%)
	x(50%)	x(84%)	x(90%)	
RG502H	45.64	73.11	82.76	9.8 ± 0.5
RG503H	37.85	61.52	69.50	10.9 ± 0.3
RG502H/RG503H=1/1(Blend)	41.29	64.98	73.08	10.8 ± 0.5
RG502H/RG503H=1/1(Multi)	40.43	66.37	74.60	10.0 ± 0.7

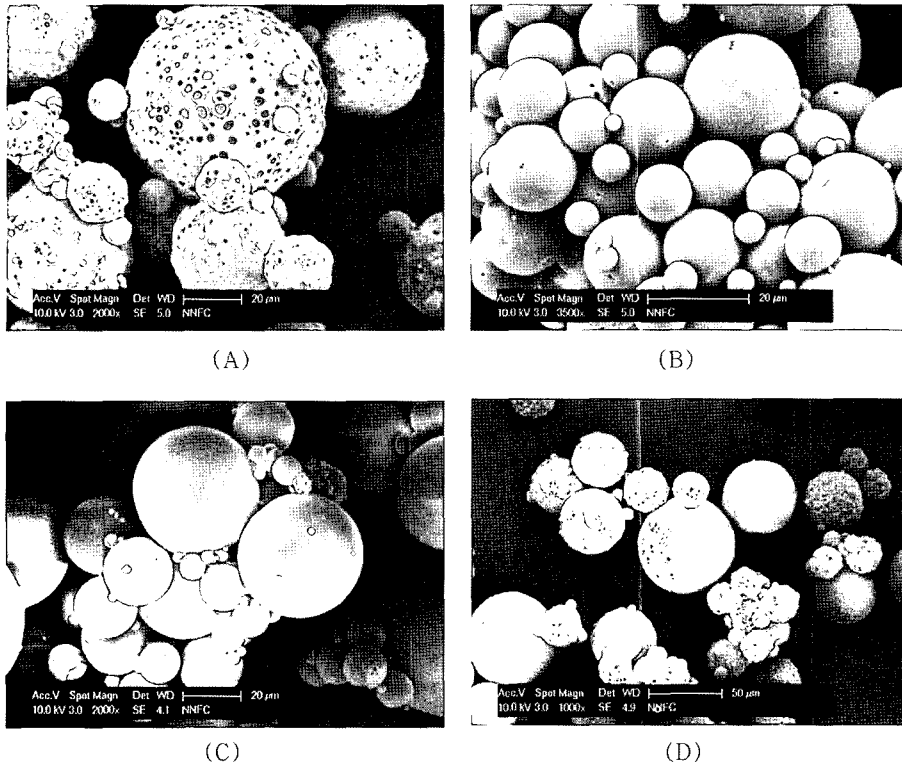


Figure 2—Scanning electron micrograph of microspheres containing leuprorelin. (A) RG502H, (B) RG503H, (C) RG502H/RG503H=1/1(Blend), (D) RG502H/RG503H=1/1(Multi).

값이 $37.85\ \mu\text{m}$ 으로 RG502H로 제조된 미립구의 $45.64\ \mu\text{m}$ 보다 비교적 작은 입자분포를 가지고 있었으며, 제조된 모든 미립구의 x(90%)는 69.5 에서 $82.76\ \mu\text{m}$ 의 범위를 나타내었다.

미립구의 형태

Figure 2는 전자현미경으로 관찰된 미립구의 morphology를 나타낸 그림이다. (A)의 경우 RG502H를 담체로 제조한 미립구이며 표면에 높은 다공임을 알 수 있다. 반면에 (B)는 RG503H로만 제조되었으며 미립구의 표면이 모두 비다공성이었다. 이것은 미립구 제조시 메틸렌클로라이드에 용해된 고분자의 농도가 20%w/w로 RG502H에 비해 점도가 낮기 때문에 관찰된 미립구의 크기는 (A)보다 작고 구형임을 알 수 있다. (C)는 RG502H와 RG503H를 혼합하여 제조한 미립구이다. 미립구의 표면은 비교적 비다공성이며 (A)와 같이 RG502H로 제조된 미립구의 성질은 찾아볼 수 없었다. (D)의 경우에는 다공성과 비다공성 모양을 가진 미립구를 분명하게 볼 수 있으며 이는 (A)와 (B)로 제조된 두 미립구의 특징을 동시에 가지고 있음을 알 수 있다.

Leuprorelin의 봉입률

Water-in-Oil-in-Water(W/O/W)법의 장점은 수상에 소량의

점증제를 첨가하여 미립구내의 약물 봉입률을 증가시킬 수 있으나,⁹⁾ Oil-in-Water법은 그러한 부형제의 사용이 상당히 제한되어 있다. 따라서 약물의 봉입률을 증가시키기 위한 방법은 고분자의 농도와 최초 유상을 수상에 주입할 때의 rotor speed를 변화시키는 방법이 일반적으로 사용되고 있다.

Table II에는 제조된 미립구내의 약물 봉입률을 나타내었으며 RG503H의 경우 10.9%로 RG502H의 9.8%보다 높았고 RG502H/RG503H=1/1 (Blend)와 RG502H/RG503H=1/1(Multi)는 각각 10.8%, 10.0%로 측정되었다. 이것은 고분자의 조성, 분자량 그리고 유기용매에서 용해도에 의한 차이에 기인한 것이라 생각된다.¹⁰⁾

In-vitro 장기 용출시험

In-vivo에서 1개월 또는 그 이상의 기간동안 약물의 용출률을 측정하는 방법은 상당히 까다롭고 숙련된 기술이 필요하기 때문에 장기간의 in-vitro 용출시험은 실제 생체내에서 약물의 용출양상을 판단할 수 있는 중요한 기준이 된다.¹¹⁾ 그러나 이러한 경우에 있어서의 문제점은 약물과 고분자간의 상호작용 및 용출시험액의 이온결합력 차이 때문에 원하는 기간동안 이론적인 용출률(일반적으로 최종 100%까지)을 얻는 것은 쉽지 않다.¹²⁾

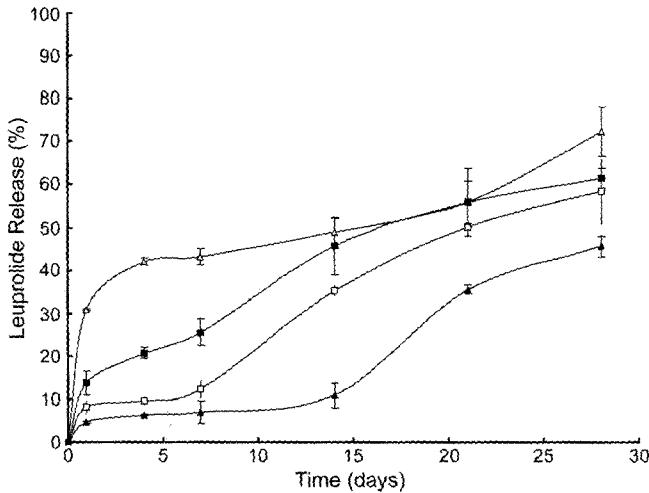


Figure 3—Long-term release of leuprorelin microspheres at 37°C in 0.033 M PBS pH7.0. Results are expressed as the mean with the bar showing S.D. values of five experiments. Δ : RG502H, \blacktriangle : RG503H, \square : RG502H/RG503H=1/1(Blend), \blacksquare : RG502H/RG503H=1/1(Multi).

Figure 3에서 나타난 바와 같이 RG502H로 제조된 미립구는 1일째 용출률이 30.8%, 4일째 42.1%로 initial burst가 매우 큰 것을 알 수 있다. 이는 전자현미경에서 나타난 바와 같이 미립구 자체의 다공성으로 인하여 미립구 내에 함유되어 있는 leuprorelin이 시험액과의 상호작용에 의해 초기 용출률을 증가시키기 때문이다. 반면에 RG503H로 제조된 미립구는 용출개시 14일째에 10.9%에 불과하며 이후 고분자의 분해력이 가속화되어 28일째에 45.6%의 용출률을 나타내었다. 또한 RG502H/RG503H=1/1(Blend)와 RG502H/RG503H=1/1(Multi)의 경우 RG502H와 RG503H의 중간 정도의 용출률을 나타내었으며, 보다 많은 다공성 특성을 갖는 RG502H/RG503H=1/1(Multi)는 1일째에 13.6%를 나타낸 이후 전체적으로 RG502H/RG503H=1/1(Blend) 보다 약 10% 가량 많은 누적 용출률을 나타내었다.

전체적으로 용출시험이 진행된 이후 약 4주 동안 기대했던 만큼의 leuprorelin의 용출이 저조한 이유로는 pH 7.0에서 양전하를 띠는 펩타이드와 고분자의 분해에 의해 생성된 음전하를 띠는 카르복실기 상호간의 이온결합으로 인해 인산원충액에서 미립구내의 leuprorelin 용출을 억제하고 그 결과 누적 용출률의 감소를 야기한 것으로 생각된다.

In-vitro 가속 용출시험

생분해성 고분자를 담체로 사용하여 약효를 지속하는 주사제에 대한 in-vitro 용출시험에 대한 연구는 많은 어려움을 안고 있다. 이러한 방법에 있어서의 문제점은 1) 재현성 있

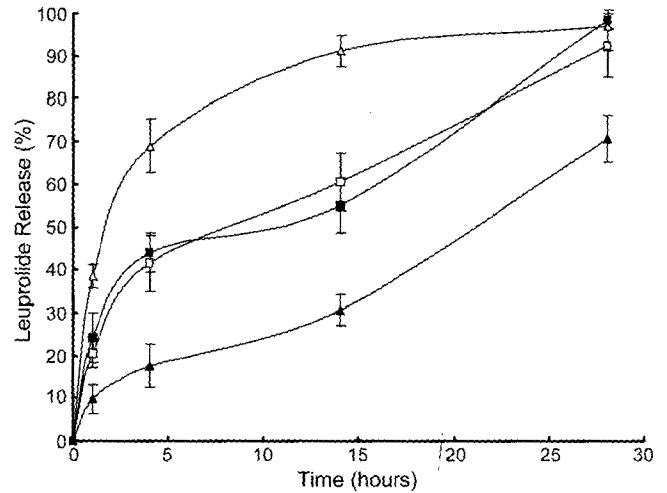


Figure 4—Accelerated release of leuprorelin microspheres at 55°C in 0.1% Polysorbate 80. Results are expressed as the mean with the bar showing S.D. values of six experiments. Δ : RG502H, \blacktriangle : RG503H, \square : RG502H/RG503H=1/1(Blend), \blacksquare : RG502H/RG503H=1/1(Multi).

는 시험결과, 2) 생체내의 약물 거동을 판정할 수 있는 기준, 3) in-vivo와 in-vitro 간의 상호관계 등을 고려하여야 한다.¹³⁾ 이러한 이유로 비교적 단시간내에 용출양상을 판단할 수 있는 가속용출시험은 제제 평가에 있어서 매우 유의한 정보를 줄 수 있다.

Figure 4는 0.1% polysorbate 80을 시험액으로 사용하여 고분자의 유리전이온도(Tg: RG502H=42.8°C, RG503H=47.2°C)보다 높은 온도에서 가속 용출시험을 진행한 결과이다. 장기 용출시험과 비교하여 불 때 전반적인 용출양상은 매우 유사할 뿐만 아니라, 28시간에서 RG503H로 제조된 미립구를 제외하고 모든 제제에서 90% 이상의 용출률을 나타내고 있다. 따라서 이러한 시험방법은 장기 용출시험의 보완적인 방법으로 사용하였을 때 제제의 용출양상을 추론할 수 있는 유의한 방법이 될 수 있다.

수컷 흰쥐에서의 혈중 testosterone level 측정

Figure 5는 약물 투여 후 35일 동안 혈액중의 testosterone 억제 효과를 나타낸 그래프이다. Testosterone의 농도는 RG502H의 경우 투여 후 6시간에서 19.1 ng/ml인 반면 RG503H는 6.0 ng/ml로 약 3배의 차이를 나타내었고 7일째에는 castration level까지 억제되었다. 이후 RG502H는 21일째부터 testosterone 억제 효과가 떨어지기 시작하였으나, RG503H는 35일까지 유지하였다. 반면 RG502H/RG503H=1/1(Blend)와 RG502H/RG503H=1/1(Multi)는 6시간에 10.1에서 12.0 ng/ml까지 testosterone을 release하였고 35일까지 억제 효과가

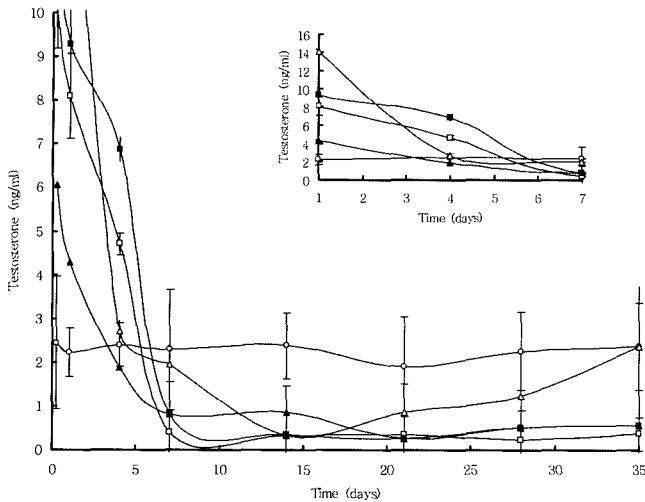


Figure 5—Serum testosterone level in S.D. rats following administration of microspheres formulations. The insert shows testosterone suppression within the 7 day after administration. Results are expressed as the mean with the bar showing S.D. values of five experiments. ○: Control, △: RG502H, ▲: RG503H, □: RG502H/RG503H=1/1(Blend), ■: RG502H/RG503H=1/1(Multi).

지속되었다. 이것은 leuporelin을 함유한 RG502H 미립구는 testosterone 억제효과가 약 2-3주에 불과하고 RG503H의 경우에는 4주 이상 지속된다는 것을 말해 주는 결과이다.

결 론

본 연구에 사용된 O/W법은 RG502H와 RG503H를 담체로 하는 미립구의 제조방법에 있어서 고분자의 농도를 조절함으로써 leuporelin의 encapsulation efficacy를 증가시키고 최대 입자크기를 150 μm 이하로 조절할 수 있는 좋은 방법이 되었다.

또한 고분자 혼합과 다중 에멀전에 의해 제조한 미립구는 RG502H와 RG503H 각각의 고분자로 제조한 미립구와 비교하여 볼 때 가속 용출에 있어서 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 하나의 수상에 분자량이 다른 고분자의 물리적 혼합(DP-1)에 의해 제조된 미립구는 다른 하나의 수상에 각각의 고분자를 함유하는 DP-1과 DP-2을 연속해서 주입하여 제조한 미립구와 비교해 볼 때, 미립구의 morphology와 *in-vitro* 장기 용출시험은 동일하지 않은 결과를 나타내었다.

향후 생분해성 고분자인 RG502H와 RG503H의 최적 비율을 확립하고 *in-vivo*에서 약물의 PK/PD profile을 확인한다면 전립선암, 자궁내막증 치료제 등에 사용되는 leuporelin 함유 1개월 지속성 서방출제제를 개발할 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단(ERC grant R11-2002-100-03006-0)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Y. Yamaguchi, M. Takenaga, A. Kitagawa, Y. Ogawa, Y. Mizushima and R. Igarashi, Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules: Initial burst release controlled by hydrophilic additives, *J. Control. Rel.*, **81**, 231-249 (2002).
- 2) N. J. Wojciechowski, Leuprolide: A gonadotropin-releasing hormone analogue for the palliative treatment of prostatic cancer, *Drug Intell. Clin. Pharm.*, **20**, 746-751 (1986).
- 3) Byung H. Woo, Janusz W. Kostanski, Sisay Gebrekidan, Bhas A. Dani, B. C. Thanoo and Patrick P. DeLuca., Preparation, characterization and in vivo evaluation of 120-day poly(D,L-lactide) leuprolide microspheres, *J. Control. Rel.*, **75**, 307-315 (2001).
- 4) W. Juan, M. W. Barbara and P. S. Steven, Mechanistic evaluation of the glucose-induced reduction in initial burst release of octreotide acetate from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *Biomaterials*, **25**, 1919-1927 (2004).
- 5) Yang, Y. Y., H. H., Chung, T.S., Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method, *J. Control. Rel.*, **69**, 81-96 (2000).
- 6) T. Ogawa, M. Yamamoto, H. Okada, T. Yashiki and T. Shimamoto, A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1095-1103 (1988).
- 7) J. P. McGee, M. Singh, X. M. Li, H. Qiu and D.T. O'Hagan, The encapsulation of a model protein in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles of various size: An evaluation of process reproducibility, *J. Microencapsul.*, **14**, 197-210 (1997).
- 8) F. G. Hutchinson and B. J. A. Furr, Biodegradable polymer systems for the sustained release of polypeptides, *J. Control. Rel.*, **13**, 279-294 (1990).
- 9) H. Okada, One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuporelin acetate, *Adv. Drug Del. Reviews*, **28**, 43-70 (1997).
- 10) R. Jeyanthi, R. C. Metha, B. C. Thanoo and P. P. Deluca, Effect of processing parameters on the properties of peptide-containing PLGA microspheres, *J. Microncapsulation*, **14**(2), 163-174 (1997).
- 11) M. Sophie, F. Philippe and S. Reto, Profiling and in vivo quantification of proteins by high resolution Mass spectrometry: The example of goserelin, an analogue of luteinizing hormone-release hormone, *Cli. Chem. Lab. Med.*, **41**(12),

- 1589-1598 (2003).
- 12) D. Bodmer, T. Kissel and E. Traechslin, Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems, *J. Control. Rel.*, **21**, 129-138 (1992).
- 13) Diane J. Burgess, Daan J.A. Crommelin, Ajaz S. Hussain and Mei-Ling Chen, Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report, *AAPS Pharm. Sci.*, **6**(1), 1-12 (2004).