

레티노산 함유 폴리락탄산 나노입자의 제조 및 약물 방출

채지만 · 이경만 · 김인숙 · 이용복 · 신상철 · 오인준[†]

전남대학교 약학대학 및 약품개발연구소
(2004년 8월 20일 접수 · 2004년 10월 1일 승인)

Preparation and Drug Release of All-Trans Retinoic Acid-Loaded Poly(L-lactic acid) Nanoparticles

Ji-Man Chae, Kyung-Man Lee, In-Sook Kim, Yong-Bok Lee, Sang-Chul Shin and In-Joon Oh[†]

College of Pharmacy and Research Institute of Drug Development, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received August 20, 2004 · Accepted October 1, 2004)

ABSTRACT—To develop an intravenous delivery system of all-*trans* retinoic acid (ATRA) for the cancer therapy, poly(L-lactic acid) nanoparticles were prepared and characterized. Emulsification-solvent evaporation method was chosen to prepare submicron sized nanoparticles. Spherical nanoparticles less than 200 nm in diameter with narrow size distribution were prepared, and the entrapment efficiency of drug was more than 95%. The endothermic peak at 183°C and X-ray crystallographic peak of ATRA appeared in the nanoparticle system, suggesting the inhibition of crystallization of ATRA by polymer adsorption during the precipitation process. ATRA was released at 37°C for 60 days and the release rate was dependent on the concentration of drug incorporated in the nanoparticles. While ATRA was unstable in the light, it was very stable at 4°C. These results suggest the usefulness of PLA nanoparticles as a sustained and prolonged release carrier for ATRA.

Key words—Poly(L-lactic acid), All-*trans* retinoic acid, Nanoparticles, Prolonged release

나노입자는 일반적으로 고분자로 만들어진 μm 이하의 입자 크기를 갖는 콜로이드계이다. 나노입자는 내부에 약물을 봉입하여 조절된 약물 방출을 할 수 있는 효율적인 형태이기 때문에 각광을 받고 있는 약물 전달체계 중의 하나이다. 나노입자 전달체는 특정 세포나 조직으로 약물의 전달을 가능하게 하고, 경구 투여시 생체 이용률을 높일 수 있으며, 표적 조직에서 약물의 작용을 서서히 하게 하거나, 혈관 내 약물 전달을 할 수 있도록 가용화할 수 있으며, 효소 등의 분해에 대한 안정성을 증가시키는 등의 장점이 있다.¹⁾ 특히 적절히 설계된 나노입자는 어느 정도 암 조직이나 세포로 표적화할 수 있는 약물 매질로 작용할 수 있다. 정맥 주사된 나노입자의 암세포 수준에서 축적 기전은 새기 쉽고 고투과성인 종양 맥관 구조를 통한 수동 확산 또는 대류에 의존하고 있다고 보고²⁾되어 있다. 나노입자는 주로 단핵성 식이세포계인 간, 비장, 폐, 골수 등에 잘 전달되기 때문에 이러한 조직으로의 약물 전달에 효율적인 전달 체계라고 할 수 있다.

여러 고분자가 생분해성 나노입자로 사용되지만 특히 poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA)나 poly(L-lactic acid) (PLA)는 미국 식품의약품청에서 인정한 생체 적합성 및 생

분해성 고분자이므로 광범위하게 연구되고 있다.³⁻⁵⁾ PLA나 PLGA를 사용한 나노입자의 제조 방법은 유화-증발과정, 염석 과정, 나노 침전 과정 등 3가지로 분류되고 있다.³⁾

All-*trans*-레티노산(ATRA)은 성장 분화, 재생, 대사 등 모든 중요한 생체 프로그램을 조정하는 물질이다.⁶⁾ ATRA는 급성 전골수구성 백혈병, 혈장 세포암, 피부 판상 세포 종양 등에 효과적이며 간 종양 세포소멸 유발 인자라고 알려져 있다.⁷⁾ 지금까지 리포솜,⁷⁾ 마이크로에멀전,⁸⁾ 미세구,^{6,9)} 고체 지질 나노입자,¹⁰⁾ 글리아딘 나노입자,¹¹⁾ 갈락토스로 코팅된 PLA 나노입자¹²⁾ 등의 여러 전달체에 의한 ATRA 송달 연구가 보고되었다.

현 연구에서는 ATRA를 봉입한 PLA 나노입자를 제조하여 ATRA의 방출 조절을 하려고 한다. PLA 나노입자는 유화-용매증발법에 의해 제조하였고, 나노입자의 물리화학적 특성 및 약물의 방출에 대해 실험하여 레티노산을 함유한 나노입자의 제조 특성에 대해 검토하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

시약으로는 PLA(분자량 50,000, Polysciences, USA), ATRA(Aldrich, USA), 폴리비닐알코올(PVA, Aldrich, USA).

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 062)530-2927, E-mail : ijoh@chonnam.ac.kr

염화메틸렌(MC, 대정, Korea)을 사용하였고, 기타 다른 시약들은 시판 특급 혹은 일급을 사용하였다. 기기로는 동결건조기(FDU-506, Eyela, Japan), 초음파 발생기(CV17, Sonic, USA), X-선 회절 분석기(DMAX1200, Rigaku, Japan), 시차 열분석기(DTA, SSC5200, Seiko, Japan), 주사 전자 현미경(SEM, S-4700, Hitachi, Japan), 입도 분석기(Autosizer Lo-C, Malvern, UK), 향온향습기(KCH1000, Eyela, Japan), 자외부 분광광도계(Specgene, Techne, UK), 고속 액체 크로마토그래피(Waters, USA) 등을 사용하였다.

나노입자의 제조

나노입자의 제조는 기존의 유화-용매증발법⁴⁾을 약간 변경하여 수행하였다. PLA(100 mg)와 ATRA(5 mg, 10 mg, 15 mg)를 MC 4 ml에 녹인 용액을 5%(w/v) PVA 수용액 8 ml에 가해 o/w 유탁액을 만들었다. 10분간 초음파를 가한 후 회전 농축기를 이용하여 용매를 증발시켰다. 20°C, 17,000 rpm에서 60분간 원심분리하여 입자를 세척하고 이 과정을 2번 더 한 후 동결건조하였다. 얻어진 나노입자는 약물이 분해되지 않도록 용기에 넣어 밀봉한 후 냉장 보관하였다.

나노입자 내 약물 봉입률 측정

10 mg의 나노입자를 취해 10 ml의 에탄올에 넣고 2시간 동안 충분히 교반시킨 후 상층액에서 1 ml를 취하여 0.45 µm 필터로 여과한 여액을 시료로 하였다. 얻어진 용액을 일정량 희석한 다음 자외부 분광광도계로 약물 농도를 측정하였다. 약물 함량과 봉입 효율은 다음 식을 사용하였다.⁹⁾

$$\text{약물 함량 (\%, w/w)} = \frac{\text{나노입자에 잔존된 ATRA의 무게}}{\text{나노입자의 무게}} \times 100$$

$$\text{봉입율 (\%, w/w)} = \frac{\text{나노입자에 잔존된 ATRA의 양}}{\text{ATRA의 초기 공급량}} \times 100$$

입도 분석

나노입자의 크기 및 크기분포는 광산란 입도분석기를 사용하여 측정하였다. 각 나노입자는 증류수에 분산된 상태로 초음파를 가해 분산시킨 다음 입자의 직경을 측정하였고, 3개의 시료군에 대해 측정하여 평균값 및 표준편차를 구하였다. 시료의 크기 및 형태를 관찰하기 위하여 SEM을 사용하였다. 측정하기 전에 시료를 금속판 위에 놓고 백금 증착기를 이용하여 백금 코팅을 실시하였다.

열분석 및 X-선 회절 분석

ATRA, 약물이 들어있지 않은 나노입자, 물리적 혼합물,

약물이 함유된 나노입자에 대한 열적 성질을 DTA를 사용하여 측정하였다. 각각의 시료를 약 2–5 mg 취해 알루미늄 팬에 올려놓고 30°C에서 300°C의 온도 범위에서 10.0°C/min의 가열속도로 하여 열분석을 행하였다.

X-선 회절분석기를 사용하여 시료의 결정성을 조사하였다. X-선은 40 kV의 전압과 25 mA의 전류를 가하여 얻어졌고, Ni 여과 Cu Kα 선을 방사하여 발생시켰다. 회절각은 0°에서 70° 범위까지로 하였고, 주사속도는 5°/min로 하여 측정하였다.

안정성 시험

약물의 저장 시 안정성을 살펴보기 위하여 향온향습기에 나노입자를 보관하면서 약물의 잔존량을 측정하여 약물의 분해 정도를 관찰하였다. 알루미늄 호일을 찢지 않았을 경우를 “open” 조건으로, 알루미늄 호일로 둘러싼 경우를 “close” 조건으로 하여 25°C에서 자연광에 노출시키면서 분해정도를 측정하였다. 4°C의 조건은 냉장고에 보관할 때의 조건으로 정하였다. 분해되지 않고 남아있는 약물의 농도를 HPLC에 의해 측정하였다. 사용된 HPLC 조건은 다음과 같다: µBondapak C₁₈ 칼럼을 사용하였고, 이동상은 아세트니트릴/메탄올/2% 초산암모늄 용액(40:40:20)을 사용하였다. 이동상의 유동속도는 1.5 ml/min이고, 시료 주입 용량은 10 µl를 사용하였으며, 349 nm에서 UV검출기로 ATRA의 농도를 측정하였다.

약물 방출 시험

10 mg의 나노입자를 정확히 칭량하여 pH 7.4 인산 완충액 (PBS) 1 ml에 가한 다음 초음파 발생기로 분산시키고 분자량 한계가 12,000인 투석막에 담아 놓아 약물 방출을 행하였다. 약물이 광분해 되지 않도록 밀봉하고 자연광에 노출되지 않도록 하여 PBS가 20 ml 담긴 Falcon 튜브에 넣은 후 진탕 수조에서 37°C를 유지하면서 100 rpm으로 교반하였다. Sink 조건을 유지하도록 일정한 시간 간격으로 용출액 1 ml를 취한 다음 새 PBS 용액으로 완전 교환하였다. 약물 방출은 60일간 실시하였으며 적절히 희석된 약물의 양을 UV 흡광도계를 사용하여 349 nm에서 흡광도를 측정하였고 미리 준비한 검량선에 따라 약물 농도를 결정하였다.

결과 및 고찰

나노입자의 입자도

ATRA함유 나노입자를 유화-용매증발법에 의해 제조하였다. 제조된 나노입자의 입자 크기를 Table I에 나타내었다. Kwon 등¹³⁾은 PLGA 나노입자의 경우 나노입자의 제조 중

Table 1-Particle Size and Drug Loading Efficiency of PLA Nanoparticles*

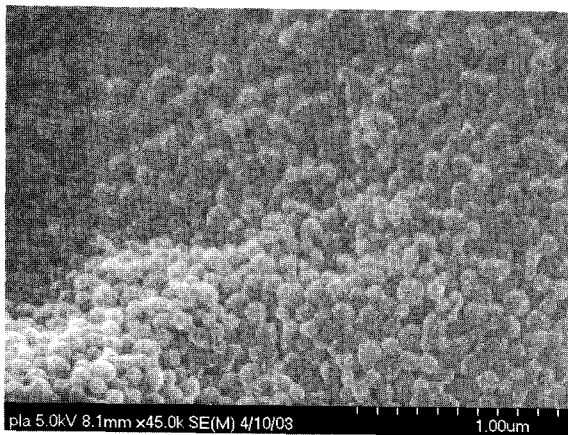
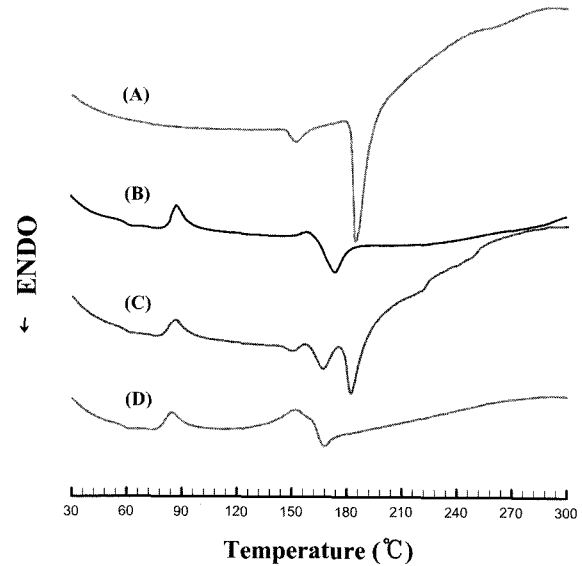
	Formulation (Polymer weight : Drug weight)		
	100 : 5	100 : 10	100 : 15
Size (nm)	181.9±14.7	181.9±27.9	196.2±28.3
Polydispersity	0.071±0.070	0.117±0.051	0.150±0.057
Drug contents (% w/w)	4.9±0.5	8.7±0.7	12.8±0.4
Efficiency (%)	103.6±10.8	95.8±8.1	98.5±3.3

*(averagy±standard deviation)

에 사용된 안정제의 종류 및 농도, 고분자의 농도 등에 의존한다고 보고하였다. 현재의 결과에서는 약물 함량이 증가할수록 평균 입자크기는 약간 증가하였지만 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. Table I에 제시된 다분산도는 모두 0.2를 초과하지 않았으며 이 결과로 보아 비교적 단분산적이라는 것을 알 수 있었다.¹⁴⁾ 일반적으로 마이크로미터 이하의 크기를 갖는 나노입자는 마이크로미터 이상의 크기를 갖는 미세입자에 비해 세포내 유입이 증가된다.¹⁾ 따라서 마이크로미터 이하의 크기를 갖도록 나노입자의 크기 조절이 제조에서 중요한 인자라고 할 수 있다. 제조된 나노입자는 입자 크기가 200 nm 이하의 크기를 갖고 있으며 1 µm 이상의 입자도를 갖는 입자는 발견되지 않았다. 주사 전자현미경을 사용하여 입자의 크기 및 형태를 관찰한 결과(Figure 1), 100-200 nm 내외의 입자 크기를 보이고 있으며 형태는 구형을 이루고 있다는 것을 알 수 있다. 입자의 크기 분포도 매우 양호하기 때문에 균일한 형태의 나노 입자가 제조되었음을 알 수 있다.

열분석 및 X-선 회절 분석

나노입자 및 약물의 열적 성질을 관찰하기 위하여 DTA

**Figure 1-Scanning electron microphotograph of retinoic acid-loaded PLA nanoparticles.****Figure 2-DTA/TG thermograms of drug and nanoparticles. (A) RA, (B) PLA nanoparticles without RA, (C) Physical mixture and (D) RA-loaded PLA nanoparticles.**

에 의한 열분석을 행하였다(Figure 2). ATRA 약물의 녹는점은 183°C이었고, 결정성을 갖는 PLA 고분자의 경우 174°C이었다. 약물이 들어있지 않은 PLA 나노입자와 ATRA를 혼합한 물리적 혼합물의 경우 167°C와 182°C에서의 흡열 피크를 보이고 있는 반면, ATRA를 함유한 나노입자의 경우 168°C에서만 흡열피크를 보이고 있다. 일반적으로 순수한 상태보다 혼합물의 경우 녹는점은 낮아지기 때문에 물리적 혼합물이나 약물 함유 나노입자의 경우 결정성 PLA의 녹는점이 낮아지고 있다. 반면 ATRA 약물은 물리적 혼합물의 경우 약물의 순수성을 유지하고 있기 때문에 녹는점이 그대로 나타나며, 약물 함유 나노입자의 경우에는 나노입자 내에서 약물이 분자적 분산을 이루고 있기 때문에 결정성이 소실되어 흡열 피크가 나타나지 않은 것으로 사료된다.¹⁵⁾ 나노입자 제조 과정 중에 PLA 고분자는 약물의 결정 표면에 흡착되어 결정 성장을 억제하기 때문에 결정형이 이루어지지 않게 되어 그 결과 녹는점의 흡열 피크가 나타나지 않았고, PLA 고분자 역시 불완전한 결정 형태를 이루어 녹는점이 감소하는 것으로 보이고 있다.

분말 X-선 회절 시험의 결과도(Figure 3) 이 사실을 뒷받침하고 있다. 그림(A)의 경우 결정성 약물의 X-선 회절 스펙트럼을 나타낸 것이다. 2θ가 15°인 위치에서 강한 피크가 나타나고 있다. (C)의 물리적 혼합물에서 이 피크가 소실되지 않고 있는 반면, (D)의 나노입자에서는 잘 보이지 않고 있다. 이 결과에서도 역시 나노입자 내부에 순수성 약물이 분자적 분산이 이루어져 결정성이 소실되었음을 보여주고 있

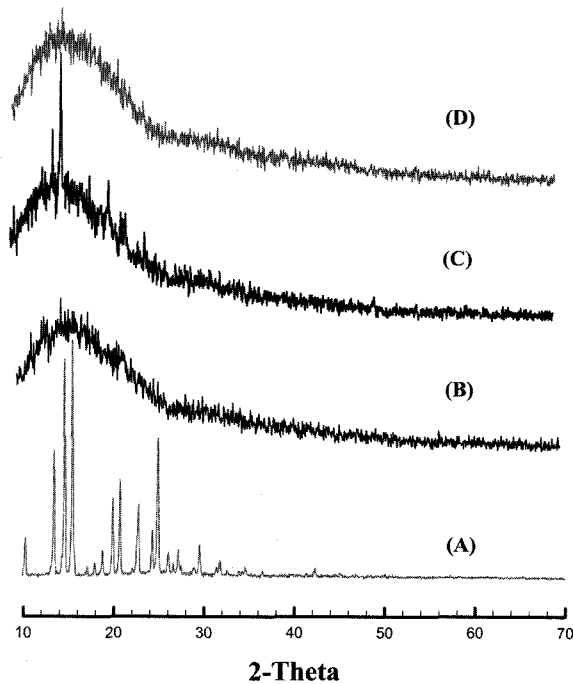


Figure 3—X-ray diffraction spectra of drug and nanoparticles. (A) RA, (B) PLA nanoparticles without RA, (C) Physical mixture and (D) RA-loaded PLA nanoparticles.

다. 높은 농도의 약물이 봉입된 경우 결정형으로 존재한다고 보고¹⁶⁾하고 있으나 현재 사용된 농도에서는 결정형이 나타나지 않고 분자분산되고 있음을 알 수 있다.

약물의 안정성

ATRA 약물은 광분해되기 쉬운 약물이다.⁷⁾ ATRA를 여러 조건에서 보관하여 분해되지 않고 남은 양을 HPLC로 측정하였다. 그 결과, 분해물은 5분, ATRA 약물은 5.9분의 체류 시간을 보이고 있었다. 표준약물의 10~150 µg/ml의 농도 범위에서 $y=0.01664x+3.281$ (상관계수 $r^2=0.99$)의 양호한 직선 형태의 검정선을 얻을 수 있었다. 약물의 시간에 따른 안정성을 살펴본 결과(Figure 4), 25°C의 “open” 조건에서는 15일 지나면 60% 이상의 약물이 광분해되었고, “close” 조건에서는 30% 정도 분해되어 좀 더 안정한 상태를 이루고 있었다. 4°C에서는 거의 분해되지 않고 안정성을 유지하고 있음을 알 수 있다. Liposome에 ATRA를 봉입한 결과⁷⁾도 이와 유사함을 보이고 있다.

약물의 봉입률 및 방출 양상

PLA 나노입자 내에 봉입된 ATRA 약물의 함량 및 봉입율을 측정하였다(Table I). 약물의 함량은 5~13% w/w이었고 약물의 봉입율은 모두 95% 이상이었다. ATRA 약물의 물에

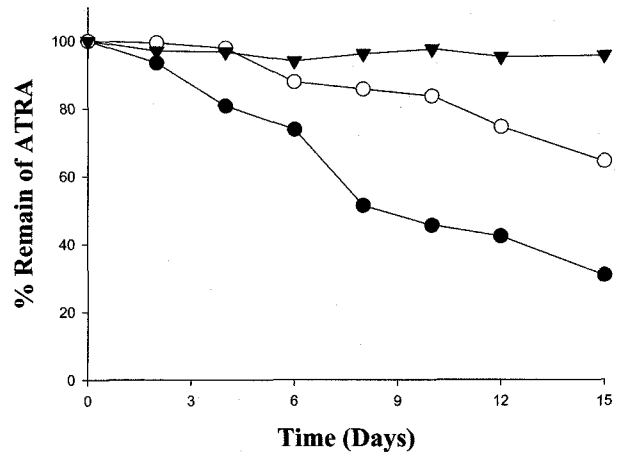


Figure 4—Photo-stability of retinoic acid in PLA nanoparticles. Conditions : (●) 25°C (open), (○) 25°C (close), (▼) 4°C.

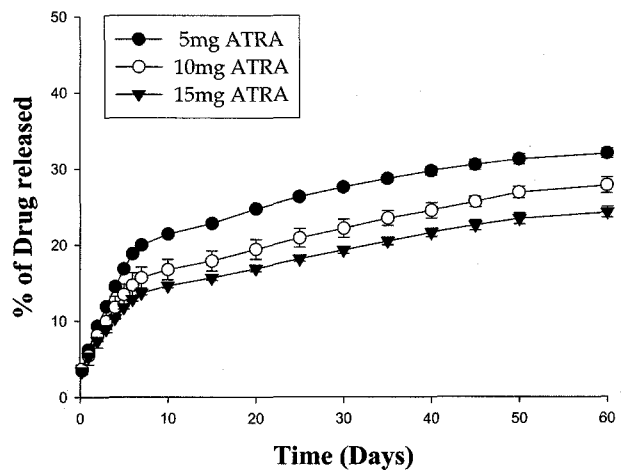


Figure 5—Dependency of drug amounts on the release rate of retinoic acid from the PLA nanoparticles at 37°C (n=3).

서의 용해도가 낮기 때문에 나노 입자 제조 과정 중에 약물의 수상으로 이동이 적고 대부분의 약물이 소수성인 PLA 고분자 담체 내부에 쉽게 분산되었음을 보이고 있다.⁶⁾

ATRA 약물의 농도에 따른 방출 양상을 살펴보았다(Figure 5). 약물의 용해도가 매우 낮아 나노입자에서 약물 방출량은 매우 작았으며 60일간 방출을 행하였을 때 5 mg의 경우 35%, 10 mg의 경우 25%, 15 mg의 경우 약 22% 정도의 방출을 나타내고 있다. 봉입된 약물 농도가 낮을수록 방출속도는 증가하였다. PLGA 미세구에서 ATRA의 방출 양상⁹⁾도 유사한 현상을 나타내고 있다. 여기에 따르면 소수성 약물은 낮은 약물 농도에서는 담체 내에 분자 분산되고, 높은 약물 농도에서는 담체 내부에서 결정화 및 상 분리가 일어나기 때문에 결정화된 소수성 약물이 서서히 녹아 확산이 느려져 방출속도가 낮다고 주장하였다. 하지만 현재의 결과에서는

ATRA 약물이 나노입자 내에서 결정화된 근거는 나타나지 않고 있다. 이것은 미세구와는 달리 나노입자의 경우 입자 크기가 매우 작기 때문에 나노입자 내부에서 약물이 결정화되기 어려울 것으로 판단된다. 다만 약물의 농도가 증가하면 입자간 응집이 커져서 집합체가 형성되기 쉽고, 이 결과 약물의 방출속도가 낮아지는 것으로 판단된다.

Lamprecht 등¹⁴⁾은 PLGA 나노입자로부터 소 혈청 알부민 약물의 방출 양상을 다음과 같은 3단계로 설명하였다. i) 나노입자 벽에 흡착된 약물에 의한 초기 단계의 빠른 방출 결과로 나타나는 초기 burst 방출, ii) 고분자 담체로부터 분산된 약물의 확산으로 인한 평평한 양상의 방출, iii) 약물의 확산 뿐 아니라 고분자의 분해로 인한 약물의 지속적인 방출-이와 같은 3단계의 약물 방출이 나타난다고 하였다. 그러나 현재의 결과는 초기의 burst가 작고 0차 방출 속도를 보이다가 더 낮은 방출속도를 나타내는 2단계 방출 양상을 보이고 있다. 이것은 봉입된 약물이 수용성을 갖고 있지 않아 입자 내부에 주로 자리잡고 있어 초기 burst가 작은 것으로 사료된다. 초기의 약물 방출에서 burst 효과는 약물 투여하였을 때 부작용을 일으킬 수 있기 때문에 바람직하지 않다.¹⁷⁾ 따라서 실험에서 얻어진 높은 약물 봉입률과 작은 burst 효과를 갖는 PLA 나노입자는 좋은 전달체가 될 것으로 사료된다.

결 론

ATRA 함유 나노입자를 제조하여 물리적 특성 및 약물 방출에 대해 실험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 제조된 나노입자의 입자 크기는 200 nm 이내로 매우 균일하고 구형인 형태를 보이고 있었다.

2. 나노입자에 봉입된 ATRA의 열적 성질을 측정된 결과 ATRA 약물은 나노입자 내부에서 결정으로 성장하지 못하여 녹는점이 나타나지 않았다. 또한, 나노입자 내에서 약물의 결정성 소실을 X-선 회절 분석의 결과로 확인하였다.

3. ATRA 약물은 밀봉된 상태로 두었을 때 안정하였으며, 냉장 보관시에는 분해가 일어나지 않았다.

4. 약물은 나노입자 내에 95% 이상의 봉입률로 봉입되었다. 나노입자 내에 약물의 농도가 낮을수록 약물의 방출속도가 증가하였으며 약물의 방출은 60일간 계속되었다.

이상의 실험을 통하여 ATRA의 지속적 방출을 위하여 PLA 나노입자를 활용하는 것이 가능하다고 사료된다.

문 헌

1) J. Panyam and V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles

for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 329-347 (2003).

2) I. Brigger, C. Dubernet and P. Couvreur, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 631-651 (2002).

3) D. Quintanar-Guerrero, H. Fessi, E. Allemann and E. Doelker, Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique, *Int. J. Pharm.*, **143**, 133-141 (1996).

4) S.K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha and V. Labhasetwar, Residual polyvinyl alcohol associated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake, *J. Control Release*, **82**, 105-114 (2002).

5) M.F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude and C. Vigneron, Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method, *J. Control Release*, **50**, 31-40 (1998).

6) Y. Choi, S.Y. Kim, S.H. Kim, K.S. Lee, C. Kim and Y. Byun, Long-term delivery of all-trans-retinoic acid using biodegradable PLLA/PEG-PLLA blended microspheres, *Int. J. Pharm.*, **215**, 67-81 (2001).

7) K. Shimizu, K. Tamagawa, N. Takahashi, K. Takayama and Y. Maitani, Stability and antitumor effects of all-trans retinoic acid-loaded liposomes contained sterylglucoside mixture, *Int. J. Pharm.*, **258**, 45-53 (2003).

8) S.R. Hwang, S.J. Lim, J.S. Park and C.K. Kim, Phospholipid-based microemulsion formulation of all-trans-retinoic acid for parenteral administration, *Int. J. Pharm.*, **276**, 175-183 (2004).

9) Y.I. Jeong, J.G. Song, S.S. Kang, H.H. Ryu, Y.H. Lee, C. Choi, B.A. Shin, K.K. Kim, K.Y. Ahn and S. Jung, Preparation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres encapsulating all-trans retinoic acid, *Int. J. Pharm.*, **259**, 79-91 (2003).

10) S.J. Lim and C.K. Kim, Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid, *Int. J. Pharm.*, **243**, 135-146 (2002).

11) I. Ezpeleta, J.M. Irache, S. Stainmesse, C. Chabenat, J. Gueguen, Y. Popineau and A.M. Orecchioni, Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid, *Int. J. Pharm.*, **131**, 191-200 (1996).

12) C.S. Cho, K.Y. Cho, I.K. Park, S.H. Kim, T. Sasagawa, M. Uchiyama and T. Akaike, Receptor-mediated delivery of all trans-retinoic acid to hepatocyte using poly(L-lactic acid) nanoparticles coated with galactose-carrying polystyrene, *J. Control Release*, **77**, 7-15 (2001).

13) H.Y. Kwon, J.Y. Lee, S.W. Choi, Y. Jang and J.H. Kim, Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method, *Colloids & Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **182**, 123-130 (2001).

14) A. Lamprecht, N. Ubrich, M.H. Perez, C.M. Lehr, M. Hoffman

- and P. Maincent, Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification, *Int. J. Pharm.*, **184**, 97-105 (1999).
- 15) I. Oh, K. Lee, H.Y. Kwon, Y.B. Lee, S.C. Shin, C.S. Cho and C.K. Kim, Release of adriamycin from poly(γ -benzyl-L-glutamate)/poly(ethylene oxide) nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, **181**, 107-115 (1999).
- 16) R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin and R. Langer, Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres, *Science*, **263**, 1600-1603 (1994).
- 17) A. Lamprecht, N. Ubrich, H. Yamamoto, U. Sch fer, H. Takeuchi, C.M. Lehr, P. Maincent and Y. Kawashima, Design of rolipram-loaded nanoparticles: comparison of two preparation methods, *J. Control Release*, **71**, 297-306 (2001).