

多肽/蛋白类药物在微球中的不稳定因素及解决方法

李志平, 梅兴国*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 多肽/蛋白类药物在人类疾病治疗过程中起着越来越重要的作用,但通常该类物质半衰期短,需频繁注射给药,患者顺应性低,因此多肽/蛋白类药物的缓控释制剂尤其是生物可降解微球引起了广泛关注,但该类物质较不稳定,其在提取分析、微球的制备、储存及释放过程中均易失活。本文主要针对微球中多肽/蛋白类药物不稳定的因素及解决方法加以综述。

关键词: 多肽; 蛋白; 微球; 稳定剂

中图分类号: R944.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2007)02-0115-05

Factors affecting the stability of polypeptides/proteins in microspheres and methods for resolution

LI Zhi-ping, MEI Xing-guo

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Polypeptides/proteins play important roles in the therapy of human diseases, however, their half-lives are very short, which make it necessary to be injected frequently. As the result, the compliance of patients is often very low. Therefore, more and more attention is paid to the controlled/sustained release preparations of polypeptide/protein drugs. But these drugs are apt to denature during the extraction, analysis, and preparation, storage or release of microspheres, so in this review, the unstable factors of polypeptides/proteins in microspheres and methods for resolution are discussed.

Key words: polypeptides; proteins; microspheres; stabilizer

1 前言

随着生物技术的发展,越来越多的多肽/蛋白类药物应用于疾病的治疗,该类物质具有活性高、特异性强及毒性低等特点,可有效治疗癌症、自身免疫性疾病及高血压等多种疑难病,但大多半衰期短,且剂型多为溶液或粉针注射剂,需频繁给药,这种给药方式容易导致明显的峰谷现象,使药物浓度过高产生毒副作用,具有一定的危险性,因此往往只有在严密医学监视下才能使用。实验证实,干扰素(IFN)等长期低剂量给药最为可取,为此多肽/蛋白类药物的缓控释制剂,尤其是生物可降解微球引起了药剂研

究者的广泛关注。

但多肽/蛋白药物分子量大,结构复杂,很易发生物理或化学变化,导致活性丧失或产生免疫原性。为降低毒副作用并维持制剂的正常释放,必须保证物质在制备、储存和使用过程中保持全部活性,这也是成功制备可生物降解微球最重要的难点之一。因此本文拟从可生物降解微球中多肽/蛋白物质不稳定的因素及解决方法两方面加以综述。

2 影响多肽/蛋白稳定性的因素

任何导致多肽/蛋白折叠结构解体/松散以及损害三维结构的因素都会影响其生物活性,这种因素可能发生在各个环节,因此被包裹多肽/蛋白在提取分析、微球制备、储存和释放过程中的稳定性均值得关注。

2.1 取样及分析过程

收稿日期:2006-07-21

作者简介:李志平,女,在读博士研究生,研究方向:缓控释制剂, Tel:010-86472239, E-mail: dearwood2000@yahoo.com.cn

* 通讯作者:梅兴国,男,教授,博士生导师,研究方向:药剂学, Tel: 010-66932644, E-mail: xg_mei@yahoo.com

通常测定微球中的药物要先以有机溶剂提取法或碱性溶液水解法将药物提取出来,油水界面的存在或恶劣的提取环境均不利于多肽/蛋白的稳定。目前多肽/蛋白的测定很容易受操作过程中因素的影响,且稳定性评价及精确定量比较困难,应采用几种互补性方法同时测定来确定药物量^[1]。

2.2 药物的性质

纯度是多肽/蛋白稳定最关键的问题之一,结晶型蛋白通常较无定型更稳定。由于蛋白呈现一种“自我保护”行为,尤其在乳化过程中蛋白浓度越高其稳定性越高,因此药物的理化性质不同,其对环境的敏感程度不同。

2.3 微球的制备条件

微球的制备工艺不同,多肽/蛋白面临的不稳定因素不同,目前主要有以下几种因素。

2.3.1 界面 大多数多肽/蛋白为两亲性,极易迁移或吸附到油/水或气/水界面聚集变性。有研究表明,葡萄糖氧化酶(GOD)在初乳形成时活性损失28%,在复乳形成时活性损失20%,而在固化、离心和冻干过程中活性共损失4%。组成界面的有机溶剂性质亦影响多肽/蛋白的稳定性,二氯甲烷通常更易引起药物变性,当乙腈/二氯甲烷比例为1:1时,GOD的活性维持有所改善,且乙腈的保护效应已通过提高蛋白C和神经生长因子(NGF)的稳定性得到证实。因此使用乙腈/二氯甲烷混合液通常较单独使用二氯甲烷好,这可能与降低界面张力有关。

2.3.2 搅拌、超声或雾化 搅拌或超声亦会导致多肽/蛋白失活,但通常药物对界面效应更为敏感。搅拌/超声/雾化在很大程度上增加了多肽/蛋白与油/水和气/水界面的接触机会,且搅拌/超声/雾化所产生的热量及剪切力都可能造成多肽/蛋白的聚集变性或链断裂。乳化装置对多肽/蛋白的稳定性也有影响,如超声或涡旋较匀质化更易引起红细胞生成素(EPO)的聚集,而涡旋对蛋白C的活性影响较超声小^[2]。

2.3.3 聚合物的性质 聚酯、聚酞及聚氮磷等均可用于制备多肽/蛋白微球,但这些材料制备的微球仍存在药物聚集、释放慢或不完全等问题,这主要与药物和材料间的疏水作用有关。聚合物的晶型、单体比例及末端修饰也是影响多肽/蛋白稳定的因素之一。有人用Langmuir和Freundlich方程描述了蛋白的吸附行为,并发现3-甲基丙烯酸甲酯丙氧基-三甲基硅氧烷(MPS)明显提高了牛血清白蛋白(BSA)的

吸附速率和吸附量。

2.3.4 冷冻干燥 多肽/蛋白由溶液状态变为冷冻及干燥状态均伴随着其与水分之间作用的变化,由此可能导致药物性质的改变,如BSA、乳球蛋白及GOD在冻干过程中易发生二硫键的交换而聚结。

2.4 储存及释放过程中的不稳定因素

在贮存过程中,微球内残留的有机溶剂和水分子易导致多肽/蛋白聚集,而聚合物特征玻璃化转变温度(Tg)和抗水解能力等的变化亦会影响多肽/蛋白的稳定和释放特性^[3]。

在释放条件下蛋白不同表现出的稳定程度不同,这除与药物自身性质密切相关外,还受释放条件影响^[4,5]。释放时的37℃高温、再水化及体内各种酶均易使药物不稳定,释放介质中缓冲液种类和浓度可以在很大程度上影响多肽/蛋白的稳定性^[6],如溶菌酶在磷酸缓冲液中易聚集而导致释放不完全,但甘氨酸缓冲液可使其稳定。多肽/蛋白在载体表面的吸附、聚酯降解产酸降低微球内部pH(可低至3)及微球粒径大小影响酸性物质扩散路程均会影响多肽/蛋白的稳定性^[4,7]。另外,释放容器或透析膜对多肽/蛋白的吸附作用也是导致其不稳定或释放不完全的因素。

3 多肽/蛋白的稳定策略

目前稳定多肽/蛋白的策略主要有改进制备工艺、添加保护剂及选择合适载体材料几方面,频繁更换释放介质或采用透析系统亦可以减少酸性产物的积累,利于药物的稳定。

3.1 改善多肽/蛋白状态

将多肽/蛋白混悬在有机溶剂中可降低其构象灵活度而提高界面稳定性。通过使多肽/蛋白在等电点沉淀使其更易溶于有机溶剂中,或在偏离等电点时将其冻干,使其更易溶于不同极性和水溶性的有机溶剂如二甲基亚砷中。采用该法已成功包裹胰岛素,但溶菌酶微球释放却不完全,形成离子对也可提高多肽/蛋白在有机溶剂中的溶解度,即利用多肽/蛋白与带相反电荷的表面活性剂结合得到中性疏水实体,该技术提高了溶菌酶的构象稳定性。另一种方法是包裹以可逆聚集形式存在的多肽/蛋白,以避免制备过程中不可逆聚集体的形成,采用该法已成功包裹生长激素(GH)。

对多肽/蛋白进行化学修饰也可以明显改善其稳定性,其中聚乙二醇(PEG)化是最有希望的多肽/

蛋白化学修饰方法。罗氏公司的 PEG 化 IFN 不仅具有更长的半衰期,而且显示出更好的抗二氯甲烷/水界面能力,该药物已应用于商业治疗。将多肽/蛋白与锌离子结合可形成更稳定的复合物,应用较成功的有重组人生长激素(rhGH)等。

3.2 改进微球制备工艺

许多学者对多肽/蛋白微球的制备工艺加以改进,以减少制备过程对药物的破坏。除将常规复乳法——水/油/水法(W/O/W法)改为固/油/水法或固/油/油法外,还有如下一些方法。

将多肽/蛋白包封于壳聚糖-海藻酸钠^[8~10]、琼脂或淀粉水凝胶颗粒中形成含药球芯,然后制备微球。这样既可保护药物免遭有机溶剂破坏,阻止其向油水界面扩散,在释放时也可避免其与周围疏水和酸性环境接触,提高其稳定性。

将多肽/蛋白混悬于聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)的有机溶剂中,然后喷到覆有液氮的冻结乙醇中,升温至 -70°C 时,乙醇融化,液滴中的有机溶剂被提取到乙醇中而固化。该法避免了高温及油水界面,成功保护了包封过程中的 GH。

将药物/聚合物的有机溶液在 CO_2 超临界条件下雾化,有机溶剂扩散进入 CO_2 相使微球沉淀,即为超临界流体法,该法制备的微球粒径均匀,在不同温度下能稳定 1 年以上,且药物失活减少。

以泊洛沙姆 F127 为致孔剂、乳化-溶剂挥发法制备多孔空白 PLGA 微球,再以滴入法包载 rhGH,并用乙醇蒸气法封闭孔洞,发现 rhGH 微球包封率高且释放缓慢^[11]。

将溶于 PEG400 的蛋白加入到含 PLGA 和吐温 80 的甘油醋酸酯或三乙基枸橼酸盐中,混合后滴加到含司盘 80 的中链甘油三酸酯(Miglyol 812)或大豆油中并搅拌,可得到稳定的半固体微球,与水性介质混合便可形成固体微球。

3.3 加入稳定剂

在微球中加入稳定剂已成为保护多肽/蛋白最常用的策略。目前,保护剂主要有糖和多元醇、表面活性剂、蛋白质、氨基酸和盐等,也可使用螯合剂如乙二胺四乙酸。

3.3.1 糖和多元醇 糖和多元醇等在水溶液中稳定多肽/蛋白最易接受的解释是蛋白优先产生水合作用。一些糖如海藻糖和麦芽糖等可提高胶原质及卵白蛋白等的稳定性,则可能是提高了蛋白的 T_g 。

复乳法制备微球过程中,经常在内水相加糖类

稳定剂。实验证实,海藻糖可以提高 PLGA 和壳聚糖微球内破伤风毒素(TT)的稳定性^[12],共包裹麦芽糖降低了 α -糜蛋白酶的聚集,乳糖和乳果糖可明显提高溶菌酶的稳定性。环糊精(CD)也可用作稳定剂,如羟丙基- β -环糊精(HPCD)可与胰岛素形成络合物从而影响微球的释放行为^[13],HPCD 还可以提高猪生长激素在热和油水界面的稳定性。PEG400 溶解在内水相中可保护 NGF 和门冬酰胺酶,PEG 可降低 γ -糜蛋白酶等在冻干和乳化过程中的不稳定,甚至会改善 γ 照射对微球性质的影响^[14]。右旋糖酐、乙二醇、甘油和 CD 等也可增加冻干过程中肿瘤凋亡因子的稳定性。

但并非所有糖类或多元醇均会增加任一条件下多肽/蛋白的稳定性,如 PEG 不能阻止喷雾干燥法制备的微球体外释放时 NGF 的聚集,蔗糖不能阻止乳化法制备过程中蛋白构象的变化^[15],海藻糖在制备过程中可有效保护 NGF,但在体外释放过程中不能阻止其聚集。某些糖类甚至会降低蛋白的稳定性,如蔗糖和海藻糖可降低脲酶活性。另外,有些糖如甘露醇只在一定浓度范围内对多肽/蛋白有稳定作用,浓度过高反而起不到稳定作用。

3.3.2 表面活性剂 表面活性剂可以降低溶液表面张力,阻止多肽/蛋白在疏水表面的吸附和(或)聚集。复乳法制备微粒时采用 3 种不同亲水亲油平衡值(HLB)的非离子表面活性剂与胰岛素共包裹,发现只有吐温 20 可以提高胰岛素的稳定性,但吐温 20 和吐温 80 不能有效抵抗水/二氯甲烷界面造成的溶菌酶和 GH 伸展,可能是由于其亲水段(聚氧乙烯)和疏水段(脂肪酸链)均优先分配于二氯甲烷所致。磷酸卵磷脂可以保护复乳法制备过程中的白介素-1 α ;十二烷基硫酸钠明显降低了二氯甲烷/水界面造成的胰岛素聚集,十二烷基麦芽苷虽不能稳定油/水界面处的多肽/蛋白,但可有效稳定气/水界面或固/液界面处多肽/蛋白。泊洛沙姆 407 已成功用于脲酶的包裹,这可能也与其亲水性聚乙烯链形成水凝胶结构有关。

3.3.3 蛋白质 目前主要使用白蛋白和明胶作为蛋白稳定剂。白蛋白阻止蛋白质的伸展和聚集已在文献中得到广泛证实,如 BSA 可使胰岛素样生长因子-I(IGF-I)在 W/O 乳或超声条件下保持 80% 以上的完整性,BSA 还可以提高喷雾干燥法中 TT 的抗原性。白蛋白可以阻止胰岛素等在固体表面的吸附并在聚合物降解过程中清除质子,但白蛋白并

没有减少复乳法制备过程中胰蛋白酶和 NGF 活性的损失,据推测,人血清白蛋白与 NGF 形成了一种复合物阻止了两者在界面上的置换。明胶可明显降低复乳法制备微粒时因暴露于二氯甲烷而造成的乙肝核心抗原(HBeAg)失活,琥珀酰化的明胶明显改善 IGF- I 的抗超声能力,同时使用明胶与 BSA 可更充分的保持 IGF- I 的完整性。但明胶的保护效应应具有分子量和浓度依赖性。

尽管在包裹过程中蛋白类稳定剂的有效性得到了证实,但此类稳定剂会使处方的一些性质更为复杂,如易引起免疫反应或传染血液疾病等,且从法规角度考虑,目前制剂中蛋白类稳定剂的应用不是很理想。

3.3.4 氨基酸 氨基酸也可以作为多肽/蛋白稳定剂,但通常使用较少。*L*-精氨酸可以明显降低 EPO 的聚集,这可能与离子间相互作用有关。组氨酸可以强烈抑制冻干时甲醛导致的 f-BSA 聚集。PEG-聚组氨酸可以提高 BSA 稳定性的同时,还可以有效缓冲微粒局部的酸性,降低突释并延长微粒的连续释放时间^[16]。但甘氨酸和赖氨酸并没有减少胰蛋白酶的失活或 HBeAg 的降解。

3.3.5 盐 为了减少多肽/蛋白在释放过程中酸诱导的降解,共包裹碱性盐可以提高多肽/蛋白的稳定性,静电作用也是其保护多肽/蛋白的机制之一。加入碳酸氢钙改善了胰岛素的体外释放行为,明显降低了未释放胰岛素共价二聚体的形成;在微粒中加入锌可以提高皮下注射后 GH 的血清水平。碳酸钙、磷酸钙、氢氧化镁或碳酸锌等均可用作稳定剂。为平衡渗透压,也可加入氯化钠。

总的来说,因不能预测添加某种敷料后多肽/蛋白的稳定性,冗长的试验筛选是必需的。另外,并非所有稳定剂能同时增强任何条件下多肽/蛋白的稳定性,往往需要同时使用多种稳定剂。

3.4 选择合适的载体材料

通常亲水和疏水聚合物的混合物或两亲聚合物会更有利于多肽/蛋白的稳定。用亲水性聚合物 PEG 和疏水性聚合物聚乳酸(PLA)的混合物制备 BSA 微粒时,PEG 含量在 20% ~ 30% 时 BSA 结构完整,且持续释放量有所提高。与 PLGA/PEG 相比,PLA/PEG 包裹的胰岛素体外稳定性有所提高,体内 80% 以上保持了天然降血糖活性,这可能与 PLA 的降解速度较 PLGA 慢及 PEG 的亲水性更利于微环境保持中性有关。以单甲氧聚氧乙烯-聚乳酸

(MPEO-PLA)为基质复乳法制备蛋白 C 微粒,工艺优化后释放出的蛋白几乎保持了全部活性。琼脂/淀粉-PLGA、葡聚糖-甘油聚苯乙烯甲基丙烯酸酯(Dex-GMA)/PEG^[17]以及聚乙烯亚胺-硫化葡聚糖系统已被成功应用于微粒的制备。

4 结语

到目前为止,制备多肽/蛋白微粒仍是药剂工作者的一大挑战,主要难点在于多肽/蛋白的稳定问题。本文根据影响微粒中多肽/蛋白稳定的主要因素,总结了一些稳定方法,但这些稳定方法多处于研究考察阶段,在制备微粒时仍应根据药物的不同特征及制剂的不同要求选择合适的稳定方法^[18]。

参 考 文 献

- [1] Bilali U, Allémann E, Doelker E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 59(3): 375 - 388.
- [2] He JT, Su HB, Li GP, et al. Stabilization and encapsulation of a staphylokinase variant (K35R) into poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2006, 309(1/2):101 - 108.
- [3] Tamber H, Johansen P, Merkle HP, et al. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(3):357 - 376.
- [4] Determan AS, Wilson JH, Kipper MJ, et al. Protein stability in the presence of polymer degradation products: consequences for controlled release formulations [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(17):3312 - 3320.
- [5] Ibrahim MA, Ismail A, Fetouh MI, et al. Stability of insulin during the erosion of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres[J]. *J Control Release*, 2005, 106(3): 241 - 252.
- [6] Sah H, Bahl Y. Effects of aqueous phase composition upon protein destabilization at water/organic solvent interface[J]. *J Control Release*, 2005, 106(1/2):51 - 61.
- [7] Li L, Schwendeman SP. Mapping neutral microclimate pH in PLGA microspheres[J]. *J Control Release*, 2005, 101(1 - 3): 163 - 173.
- [8] Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo IV, et al. Alginate microspheres prepared by internal gelation: development and effect on insulin stability[J]. *Int J Pharm*, 2006, 311(1/2):1 - 10.
- [9] Ribeiro AJ, Silva C, Ferreira D, et al. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 25(1):31 - 40.
- [10] Zheng CH, Gao JQ, Zhang YP, et al. A protein delivery system: biodegradable alginate chitosan poly(lactic-co-glycolic acid)

(下转第 122 页)

- Int J Pharm*, 2004, 274(1/2):139 – 148.
- [3] Frederik M, Hubert DH. Cryoelectron microscopy of liposomes [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 391(1):431 – 448.
- [4] Egelhaaf SU, Wehrli E, Müller M, *et al.* Determination of the size distribution of lecithin liposomes; a comparative study using freeze fracture, cryoelectron microscopy and dynamic light scattering[J]. *J Microsc*, 1996, 184(3):214 – 228.
- [5] Berclaz N, Blöchliger E, Müller M, *et al.* Matrix effect of vesicle formation as investigated by cryotransmission electron microscopy [J]. *J Phys Chem B*, 2001, 105(5):1065 – 1071.
- [6] Ruozzi B, Tosi G, Forni F, *et al.* Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 25(1):81 – 89.
- [7] Jass J, Tjarnhage T, Puu G. Atomic force microscopy imaging of liposomes[J]. *Methods Enzymol*, 2003, 367:199 – 213.
- [8] Liang X, Mao G, Ng KY. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mice by atomic force microscopy[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2004, 278(1):53 – 62.
- [9] Grabielle-Madellmont C, Lesieur S, Ollivon M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2003, 56(1 – 3):189 – 217.
- [10] Gimbert LJ, Andrew KN, Haygarth PM, *et al.* Environmental applications of flow field-flow fractionation (FIFFF) [J]. *Trac-Trend Anal Chem*, 2003, 22(9):615 – 633.
- [11] Arifin DR, Palmer AF. Determination of size distribution and encapsulation efficiency of liposome-encapsulated hemoglobin blood substitutes using asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multi-angle static light scattering [J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(6):1798 – 1811.
- [12] Mattison K, Morfesis A, Kaszuba M. A primer on particle sizing using dynamic light scattering[J]. *Am Biotechnol Lab*, 2003, 12:20 – 22.
- [13] Shimizu Y, Nakata M, Matsunuma J, *et al.* Simultaneous quantification of components of neoglycolipid coated liposomes using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. *J Chromatogr B*, 2001, 754(1):127 – 133.
- [14] Ingebrigtsen L, Brandl M. Determination of the size distribution of liposomes by SEC fractionation, and PCS analysis and enzymatic assay of lipid content[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2002, 3(2):E7.
- [15] Sas B, Peys E, Helsen M. Efficient method for (lyso) phospholipid class separation by high-performance liquid chromatography using an evaporative light-scattering detector [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 864(1):179 – 182.
- [16] Katoh S, Kishimura M, Tomioka K. Immune lysis assay of antibodies by use of antigen-coupled liposomes [J]. *Colloids Surfaces*, 1996, 109:195 – 200.
- [17] Zhang XM, Patel AB, de Graaf RA, *et al.* Determination of liposomal encapsulation efficiency using proton NMR spectroscopy [J]. *Chem Phys Lipids*, 2004, 127(1):113 – 120.
- [18] Mehlhorn RJ, Candau P, Packer L. Measurements of volumes and electrochemical gradients with spin probes in membrane vesicles[J]. *Methods Enzymol*, 1982, 88:751 – 772.
- [19] Goins BA, Phillips WT. The use of scintigraphic imaging as a tool in the development of liposome formulations [J]. *Prog Lipid Res*, 2001, 40(1/2):95 – 123.

(上接第 118 页)

- composite microspheres [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(4):1321 – 1327.
- [11] Kim HK, Chung HJ, Park TG. Biodegradable polymeric microspheres with "open/closed" pores for sustained release of human growth hormone[J]. *J Control Release*, 2006, 112(2):167 – 174.
- [12] Jaganathan KS, Rao YU, Singh P, *et al.* Development of a single dose tetanus toxoid formulation based on polymeric microspheres; a comparative study of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) versus chitosan microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2005, 294(1/2):23 – 32.
- [13] De Rosa G, Larobina D, Immacolata La Rotonda M, *et al.* How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based microspheres; the case of insulin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin system[J]. *J Control Release*, 2005, 102(1):71 – 83.
- [14] Dorati R, Genta I, Montanari L, *et al.* The effect of γ -irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin[J]. *J Control Release*, 2005, 107(1):78 – 90.
- [15] Duncan G, Jess TJ, Mohamed F, *et al.* The influence of protein solubilisation, conformation and size on the burst release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres [J]. *J Control Release*, 2005, 110(1):34 – 48.
- [16] Kim JH, Taluja A, Knutson K, *et al.* Stability of bovine serum albumin complexed with PEG-poly(L-histidine) diblock copolymer in PLGA microspheres [J]. *J Control Release*, 2005, 109(1 – 3):86 – 100.
- [17] Chen FM, Wu ZF, Sun HH, *et al.* Release of bioactive BMP from dextran-derived microspheres: a novel delivery concept[J]. *Int J Pharm*, 2006, 307(1):23 – 32.
- [18] Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery [J]. *J Control Release*, 2003, 90(3):261 – 280.