doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.004

## 一种白细胞介素 -12 缓释微球制备及体外表征\*

李晓鸣<sup>1,2</sup> 徐健雄<sup>1,2</sup> 赵笑天<sup>1,2</sup> 张向荣<sup>3</sup> 林 清<sup>1</sup>

(1上海第十人民医院 上海 200072;2 上海交通大学药学院 上海 200240;3 深圳赛宝儿生物药业有限公司 广东 深圳 518129)

摘要目的:开发一种白细胞介素-12(IL-12)长效缓释微球剂型。方法:采用水包油-油包固(S/O/W)法制备了白介素-12因子多糖 微粒的聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(PLGA-PLA)微球,研究了微球的表面形态和粒径大小,并且运用 ELISA 方法考察了微球的体 外释放效果和免疫活性。结果:本方法制备的白介素-12因子微球光滑圆整,体外缓释达45天,累积释放率近90%。结论:本方法 制备的白介素-12因子微球,不仅具有有效地保护IL-12蛋白活性,同时实现长效缓释的目标,是一种可行的IL-12缓释方案。 关键词:白介素-12;缓释微球;聚乳酸-聚羟基乙酸

中图分类号:Q813;R94;R915 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)06-1015-04

# Study on Preparation and Vitro Characterization of Interleukin-12 Sustained-Release Microsphere \*

LI Xiao-ming<sup>1,2</sup>, XU Jian-xiong<sup>1,2</sup>, ZHAO Xiao-tian<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiang-rong<sup>3</sup>, LIN Qing<sup>1,Δ</sup>

(1 Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai, 200072, China; 2 Shanghai JiaoTong University School of Pharmacy, Shanghai, 200240, China; 3 ShenZhen SCIPROGEN Bio-pharmaceutical Co.,Ltd, Shenzhen, Guangdong, 518129, China )

**ABSTRACT Objective:** To exploit an interleukin-12 (IL1-2) long-term sustained release microsphere formulations. **Methods:** Dextran glassy particles were prepared by a unique method of low temperature aqueous-aqueous "emulsion", and then the IL-12-loaded dextran glassy particles were encapsulated into PLGA microspheres by the method of solid-in-oil-in- water (S/O/W) emulsion-evaporation technique. The microspheres were characterized by SEM. In vitro release profiles of IL-12 loaded microspheres were plotted by Human IL12 Quantikine ELISA Kit. **Results:** The IL-12-loaded microspheres possessed spherical shape and smooth surface. The cumulative release in vitro was about 90% after 45 days. **Conclusion:** This method effectively protected the bioactivity of IL-12 and microspheres exhibited an ideal sustained release behavior.

Key words: Interleukin-12; Microspheres; Polylactic-Co-Glycolic Acid Chinese Library Classification(CLC): Q813; R94; R915 Document code: A Article ID: 1673-6273(2015)06-1015-04

## 前言

白介素 -12(IL-12),是白介素家族中的成员,主要由巨噬细胞、树突状细胞、B淋巴细胞以及其他一些抗原提呈细胞(antigen presenting cells,APC)产生,它能促进分化的 CD4 T 辅助细胞 1(Th1)的增殖,诱导 T 细胞和 NK 细胞产生细胞因子,主要 是 γ 干扰素,提高 NK 细胞的细胞毒性,促进细胞毒性 T 细胞 的形成等等<sup>[1]</sup>,IL-12 在机体早期的非特异性免疫和随后的抗原 特异性的适应性免疫过程均扮演了极重要的角色<sup>[1]</sup>。 ส明,IL-12 是一个多功能的免疫调节因子<sup>[1]</sup>。 IL-12 具有抗肿瘤作 用是由其生物活性、瘤作用和 IL-12 用于肿瘤免疫治疗<sup>[25]</sup>。

目前,延长蛋白半衰期的修饰技术难以实现局部缓释<sup>[6-10]</sup>, 而缓释微球可以很好的解决这一问题。微球制备简单,不需要 对蛋白分子进行结构修饰或改造,可以解决蛋白局部用药的问 题。聚乳酸-聚羟基乙酸(PLGA)已被用于制备多肽蛋白类药 物的缓释剂型<sup>[11]</sup>,也是一种生物兼容性良好的材料<sup>[12]</sup>。但是蛋白 结构不稳定,易变性,蛋白的活性难于在制备微球过程中得到 保护<sup>[13-15]</sup>。近年来,关于蛋白的长效缓释已经有广泛的研究,如 文献报道通过锌离子络合人生长素<sup>[16]</sup>、利用小分子糖、PEG等 保护蛋白进行喷雾干燥法制备颗粒、利用温敏水凝胶<sup>[17]</sup>载蛋白 药物等方法,上述研究虽然取得了一些进展,但是也存在着一 些共同的问题。首先是在缓释制剂的制备过程中,因油 - 水界 面的存在以及与缓释材料的吸附等极易造成蛋白的失活变性。 其次,在释放过程中,蛋白药物存在突释严重,而且还存在不能 完全释放,包封率不高,制备过程中用到各种有机溶剂,制备过 程复杂,难于产业化等诸多问题<sup>[18]</sup>。由于 IL-12 的半衰期短,并 且需要局部长期给药。对此,我们运用多糖水相 - 水相体系可 以将蛋白在保持活性的前提下制备成固态的多糖微粒,这种方 法可以将颗粒化的蛋白置于以 PLGA 为基质的缓释系统中,使 蛋白能够以自然形态进行长效可控缓释,希望制备得到的缓释 微球可以解决 IL-12 局部缓释的问题。

1 材料与方法

\*基金项目:国家自然科学基金项目(81001416);医工交叉项目(YG2010ms11)

作者简介:李晓鸣(1993-),女,本科,研究方向:肿瘤治疗

<sup>△</sup>通讯作者:林清,女,博士,主任医师,研究方向:肿瘤治疗,E-mail:linqing.linda@163.com

<sup>(</sup>收稿日期:2014-07-19 接受日期:2014-08-17)

#### 1.1 IL-12 葡聚糖颗粒的制备

精密量取 2 mL 处理过的 IL-12 (上海交通大学药学院提供)原液,按照 1:9 的比例加入 6%葡聚糖的溶液中,混合均匀 后再加入 10 倍体积的 6 % 的 PEG 8000 溶液,磁力充分搅拌 至澄清透明的均一溶液,放到 -80± 2 ℃的冷库冻 24 小时。将 冻好的物质用真空冷冻干燥机进行冻干 24 小时。用 DCM 洗 涤样品,并用用力摇动,使聚乙二醇溶掉,再用离心机,转速为 12000 rpm 进行离心 5 分钟,除去上面的液体,再加入新的 DCM,来回 4-5 次。除掉聚乙二醇的样品,然后用氮气吹干,干 燥的 IL-12 颗粒密封待用<sup>ID2</sup>。

#### 1.2 PLGA-PLA 微球的制备

处方 1:取 100 mg 的 PLA(购自 Lakeshore 公司)、PLGA (PLGA2A: PLA1.5A=60:40), 加入 1000 mg 的 DCM 溶解 PL-GA 和 PLA 形成颗粒的 DCM 混悬液。取 10 mg IL-12 颗粒放 到 PLA-PLGA DCM 溶液中,使它们分散均匀,然后快速转移 到3%的聚乙烯醇(PVA)和亲水油相溶液,并搅拌,使微球中 的二氯甲烷被萃取,并使微球硬化,然后转移到 1.5 L 5.2 % 氯 化钠溶液中进一步硬化约 3-4 小时。然后收集微球,用水洗涤 6-7次,用冷冻干燥的方法除掉残余的水分和有机溶剂待用。处 方 2: 取 125 mg 的 PLA (购自 Lakeshore 公司)、PLGA(PL-GA2A:PLA1.5A=60:40), 加入 1000 mg 的 DCM 溶解 PLGA 和 PLA 形成颗粒的 DCM 混悬液。取 10 mg IL-12 颗粒放到 PLA-PLGA DCM 溶液中,使它们分散均匀,然后快速转移到3 %的聚乙烯醇(PVA)和亲水油相溶液,并搅拌,使微球中的二 氯甲烷被萃取,并使微球硬化,然后转移到1.5L5.2%氯化钠 溶液中进一步硬化约 3-4 小时。然后收集微球,用水洗涤 6-7 次,用冷冻干燥的方法除掉残余的水分和有机溶剂待用。

#### 1.3 IL-12 微球的形态观察

取 IL-12 微球放在导电胶上,涂布均匀,然后在微球的表面喷涂一层金膜后,用 SEM(JSM-7401F)观察颗粒的表面形态和大小。

#### 1.4 体外释放测定

取 3 份 12 mg 的微球放到释放瓶中,每个瓶放 pH=7.4 的 PBS 缓冲液 1 mL,然后放到 37 ℃ 摇床(恒温空气浴)中,分别 在规定的时间内将液体全部取出,并且补充新鲜的缓冲液。32 天后吸干所有液体,冻干剩余残渣,再用二氯甲烷溶剂将其溶 解,8000 rpm 离心,除掉上清液,再放入新的 DCM,来回 4-6 次。洗去 PLA 和 PLGA 的样品用氮气吹干,得到的固体加入 1 ml pH=7.4 的 PBS 缓冲液,充分溶解。然后采用 IL-12 Elisa 试 剂盒(购自 R&D 公司)测定各个时间点的 IL-12 的含量以及残 留量,绘制累计释放曲线。

SEC-HPLC 法考查微球中蛋白的聚集情况具体操作如下: 精密称取 10 mg 载蛋白大分子药物的微球,加入约 1 mL 二氯 甲烷溶解后蜗旋,使其中的高分子溶解,然后用 12,000 rpm 转 速离心 10 min,吸去上清液,重复 3 次,在通风橱自然挥发二氯 甲烷。然后用 1 mL 磷酸缓冲液溶解。然后用 HPLC(Younglin, UV 730D)分析(流动相:流速:0.6 mL/min;pH7.4 的 PBS 缓冲 液;柱温:室温;检测波长:214 nm)。

#### 1.5 试验结果的统计分析

数据表示为平均值±标准误差。一个单因素方差分析和 Bonferroni事后检验或配对的学生t检验。差异以P<0.05为差 异有统计学显著。所有的统计检验均采用SPSS17.0(SPSS公司)进行。P<0.005,表示有显著的统计意义差异。

### 2 结果

#### 2.1 IL-12 微球形态

如图 1 所示,IL-12 微球的粒径比较均匀,呈圆形,大多数 微球表面较光滑,少数表面有孔洞,无粘连现象,微球直径略有 差异,两个处方微球的形态和表面差异不大。



图 1 IL-12 微球的扫描电镜照片(处方 2) Fig.1 SEM photograph of IL-12 loaded microspheres(Formulation 2)

#### 2.2 IL-12 微球的体外释放标准曲线

按照 IL-12 Quantikine ELISA Kit 的说明书,我们制备了 IL-12 标准品的标准曲线(图 2),以 IL-12 的浓度为横坐标,吸 光度(OD 570nm)为纵坐标。如图所示,IL-12 在 7.8-500 pg/mL 的浓度范围内呈良好的线性关系,标准曲线方程为 y=0. 0231x-0.0123, R<sup>2</sup>=0.995。



#### 2.3 微球释药量的检测

图 3 为制备得到的 IL-12 微球的体外累积释放曲线。由图 3-4 可以看出,释放首日的释放量为 11 %,突释不明显,整个释 放过程接近零级释放,32 天的累积释放达 87 %。处方 1 单日体 外释放曲线和累积释放曲线如图 3-1,3-2,处方 2 单日体外释 放曲线和累积释放曲线如图 3-3,3-4。由实验数据可知处方 1 首日释药量接近 70%,之后每日释药量维持在较低水平,可以 推知处方 1 在首日发生突释,其中包裹的药物大部分被释放, 失去缓释作用。推测可能是因为,微球 1 使用的 PLA 及 PLGA 总量较低,由于微球的突释作用与药物含量正相关,即药物/ 高分子材料比值较高时,成球后药物易分布于微球骨架孔隙 中,微球孔隙中含药量的增加提高了药物的扩散速率,突释作 用较大<sup>ID</sup>。也有可能是制备过程中可能涡旋时间过短,高分子与 多糖颗粒未混合均匀,药物未均匀分布于微球骨架中,部分可 能分布在表面,从而导致突释;微球转移至水相进行固化的过 程中,可能由于操作不慎与空气产生界面,导致微球破损。由处 方2单日体外释放曲线可知,处方2释放较为平稳,未发生明 显突释;而结合其累积释放曲线可知,处方2可持续释放约1 个月,缓释效果良好。





图 3-3 处方 2 的每天体外释放曲线

Fig. 3-3 Release curve of Formulation 2



图 3-2 处方 1 的累积释放曲线

Fig. 3-2 Cumulative release curve of Formulation 1



图 3-4 处方 2 的累积释放曲线



#### 图 3 IL-12 微球体外累积释放曲线

Fig.3 In vitro cumulative release of IL-12 loaded PLGA/PLA microspheres

## 2.4 载药量和包封率的测定

包封率测定结果如表所示,处方1测得包封率明显低于处 方2的。由计算可知,微球1,2载药量均较低,而处方2包封率 较高,处方1包封率较低。这是由于包封的材料的量引起的,材 料越多包封的效果越好。

表 1 不同质量高分子(PLA:PLGA=3:2)制:	备的微球的载药量及包封率比较
-----------------------------	----------------

Table 1 Comparison of different quality polymer (PLA: PLGA = 3:2) prepared microspheres drug loading and encapsulation efficiency comparison

Formulation	Weight of PLA and PLGA	Loading efficiency (%)	Encapsulation efficiency (%)
1	100.01± 0.05 mg	0.31± 0.04*	34.14± 0.05*
2	125.02± 0.06 mg	$0.67 \pm 0.05 *$	90.54± 0.06*

Note: \*P<0.005.

#### 2.5 蛋白聚集情况

微球回收样品磷酸缓冲液溶液及微球释放液 SEC-HPLC 检测结果如图 4 所示,其中图 4-1、4-2、4-3、4-4 分别为处方 1 释放液、回收样品及处方 2 释放液、回收样品的检测图谱。两种 微球释放液及回收样品的出峰时间均在 11 min 左右,且未检 测出明显聚集。

处方1回收样品蛋白含量低于处方1释放液中蛋白含量, 结合使用 Micro BCA 法测得的包封率可以推测在洗去包裹多 糖颗粒的高分子材料的过程中可能发生损失。

## 3 讨论

本文首先通过低温水相-水相乳液法制备了 IL-12 蛋白颗粒,该颗粒能够在制备过程中很好的保持 IL-12 的活性,同时可以改善 IL-12 的释放行为。IL-12 蛋白的活性(即 IL-12 没有聚集体产生和免疫活性)得以保护可能是在制备过程中 IL-12 被葡聚糖颗粒包裹,蛋白的空间构象被固定,固定后的 IL-12 蛋白,在重新遇到有机溶剂后,不再受到有机溶剂的影响<sup>[12]</sup>。即同时制备得到的 IL-12 多糖颗粒能够耐受有机溶剂等苛刻条





件,在后续的制备过程中可以很好的保持蛋白的活性。在释放 过程中,IL-12 葡聚糖颗粒在微球中的均匀分布能够有效避免 突释<sup>[13]</sup>。同时,葡聚糖在吸水溶胀后形成的孔道构成了 IL-12 释 放的通道,这样就避免了 IL-12 与 PLGA 等缓释材料的直接接 触造成的变性失活等,即使在后期也能保持很好的缓控释效果 <sup>[18]</sup>。因此,我们采用的方法能够较好地解决目前存在的问题,兼 顾蛋白的活性保护与释放过程,对于蛋白类药物实现长效缓具 有较好的借鉴意义。

研究过程中使用亲水 " 油相 " 连续相微球制备体系制备 具有核 - 壳结构微球,来解决细胞因子蛋白 IL-12 在制剂过程 的聚集及在体外的突释和不完全释放。以前文献报道的制备微 球的方法不可避免的用到大量的有机溶剂<sup>[6]</sup>,导致环境的污染, 我们利用亲水的油相很容易被回收,而且亲水的油相本身也不 会对环境有影响。

经过制备微球以及对其体外释药过程的检测分析,我们初步得到了外形较为光滑圆整的微球,微球2持续释放约一个月,包封率也较高,并且未发生蛋白聚集及突释,释放也较为完全。比起文献报道的方法,我们制备的微球无论是包封率、还是在蛋白变性及释放都显示了很大的优势<sup>[6]</sup>。

但实验制得的处方1于释放首日发生突释,未表现出良好的缓释效果。这可能与高分子材料用量有关,所以在后续实验 中还需对制备微球所使用高分子的量进行优化,提高微球制备 的成功率。当然在制备过程中通过一系列参数的调节,如搅拌的速度和时间,PLGA的浓度及与PLA的比例,甚至采用不同的制作方法等,可以控制粒径的大小和均一性,这对载药情况也有所影响。

#### 参考文献(References)

- 杨家和,钱其军,吴孟超,等. 白介素 12:重要的免疫调节因子[J]. 世 界华人消化杂志, 1999, 7(1): 71-72
   Yang Jia-he, Qian Qi-jun, Wu Meng-chao, et al. Interleukin-12: an important immunoregulatory factor [J]. World Journal of Gastroenterology, 1999, 7(1): 71-72
   [2] 何松青,陈孝平. 白细胞介素 12 及其抗肿瘤作用[J]. 中华外科杂志,
- [2] 何松有, 陈孝干. 日细胞介索 12 及其抗肝瘤作用[J]. 中华列科亲志,
  2000, 38(3): 229-231
  He Song-qing, Chen Xiao-ping. Interleukin-12 and its anti-tumor effectt[J]. Chin J Surg, 2000, 38(3): 229-231
- [3] Hill HC, Conway TF, Michael Jr, et al. Cancer Immunotherapy with Interleukin 12 and Granulocyte-Macrophage Colonystimulating Factor-encapsulated Microspheres: Coinduction of Innate and Adaptive Antitumor Immunity and Cure of Disseminated Disease[J]. Cancer Research, 2002, 62(24): 7254-7263
- [5] Liu LS, Liu SQ, Ng SY, et al. Controlled release of interleukin-2 for tumour immunotherapy using alginate / chitosan porous microspheres
   [J]. Journal of Controlled Release, 1997, 43(1-3): 65-74

(下转第1035页)

Means to Enhanced Drug Delivery to Tumors [J]. Cancer research, 2003, 63(23): 8126-8131

- [3] Lei T C, Glazner G F, Duffy M, et al. Optical properties of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME), a PDT photosensitizer [J]. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2012, 9(3): 232-242
- [4] Agostinis P, Berg K, Cengel K A, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2011, 61(4): 250-281
- [5] Li H T, Song X Y, Yang C, et al. Effect of hematoporphyrin monomethyl ether-mediated PDT on the mitochondria of canine breast cancer cells [J]. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2013, 10(4): 414-421
- [6] Du P, Hu S L, Cheng Y X, et al. Photodynamic therapy leads to death of C6 glioma cells partly through AMPAR [J]. Brain research, 2012, 1433: 153-159
- [7] Zeng H, Sun M, Zhou C, et al. Hematoporphyrin Monomethyl Ether-Mediated Photodynamic Therapy Selectively Kills Sarcomas by Inducing Apoptosis[J]. PloS one, 2013, 8(10): e77727
- [8] Su X, Wang P, Wang X, et al. Apoptosis of U937 cells induced by hematoporphyrin monomethyl ether-mediated sonodynamic action[J]. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 2013, 28(3): 207-217
- [9] Li C Z, Cheng L F, Wang Z Q, et al. Attempt of photodynamic therapy on esophageal varices [J]. Lasers in medical science, 2009, 24(2): 167-171

- [10] Steinbauer J M, Schreml S, Kohl E A, et al. Photodynamic therapy in dermatology [J]. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2010, 8(6): 454-464
- [11] 沙卫红,李瑜元,聂玉强,等.光动力疗法与支架放置术治疗进展 期食管癌比较[J].中华消化内镜杂志,2006,23(1):27-30 Sha Wei-hong, Li Yu-yuan, Nie Yu-qiang, et al. Effect of photodynamic therapy and stent on the management of advanced esophageal cancer[J]. Chin J Dig Endosc, 2006, 23(1):27-30
- [12] Overholt B F, Lightdale C J, Wang K K, et al. Photodynamic therapy with porfimer sodium for ablation of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: international, partially blinded, randomized phase III trial [J]. Gastrointestinal endoscopy, 2005, 62(4): 488-498
- [13] Cheng J, Liang H, Li Q, et al. Hematoporphyrin monomethyl ethermediated photodynamic effects on THP-1 cell-derived macrophages
   [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2010, 101(1): 9-15
- [14] Wang L, Gu Y, Li X S, et al. Fluorescence spectroscopy study on photobleaching properties of photosensitizers in photodynamic therapy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2007, 27(10): 2073-2 078
- [15] Ding X, Xu Q, Liu F, et al. Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation [J]. Cancer letters, 2004, 216(1): 43-54

#### (上接第 1018 页)

- [6] Sinha VR, Aman T. Biodegradable microspheres for protein delivery[J]. Journal of Controlled Release, 2003, 90 (3): 261-280
- [7] Thomas T, Chen M-H, Ronald L. Idiotype-cytokine fusion proteins as cancer vaccines relative efficacy of IL-2, IL-4, and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor [J]. The Journal of Immunology, 1994, 153(10): 4775-4787
- [8] Masaki T, Jay AB. Immunoregulatory T cells in tumor immunity[J]. Current Opinion in Immunology, 2004, 16(2): 157-162
- [9] Hank CH, Thomas F, Conway Jr, et al. Cancer Immunotherapy with Interleukin 12 and Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor-encapsulated Microspheres: Coinduction of Innate and Adaptive Antitumor Immunity and Cure of Disseminated Disease[J]. Cancer Res, 2002, 62(24): 7254-7263
- [10] Hill JA. Cytokines considered critical in pregnancy [J]. Am J Reprod Immunol, 1992, 28(3-4): 123-126
- [11] Fu K, Griebenow K, Hsieh L, et al. FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres[J]. Journal of Controlled Release, 1999, 58(3): 357-366
- [12] 孟乐乐,洪晓芸,张奇昕,等. 干扰素α 缓释微球的制备及体外释 放研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(27): 5201-5203
   Meng Le-le, Hong Xiao-yun, Zhang Qi-xin, et al. The Preparation and Research of Vitro-release of Interferon-loaded Microspheres [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(27): 5201-5203
- [13] Yuan W, Geng Y, Wu F, et al. Preparation of polysaccharide glassy

microparticles with stabilization of Proteins [J]. Int. J. Pharm, 2009, 366(1-2): 154-159

- [14] Weert MV, Hennink WE, Jiskoot W. Protein instability in poly (lactic-co-glyctic acid) microparticles [J]. Pharmaceutics Research, 2000, 17(10): 1159-1167
- [15] Muller R, Keck C. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs-a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles[J]. Journal of biotechnology, 2004, 113 (1-3): 151-170
- [16] Jeffrey LC, Olu Funmi LJ, Scott P, et al. Recombinant human growth hormone poly (lactic-co-glycolic acid) microsphere formulation development[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997, 28(1): 71-84
- [17] Byeongmoon J, You HB, Lee DS, et al. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems[J]. Nature, 1997, 388 (6645): 860-862
- [18] Jin T, Zhu J, Wu F, et al. Preparing polymer-based sustained-release systems without exposing protein to water-oil or water-air interface [J]. J Control Release, 2008, 128(1): 50-59
- [19] Geng Y, Yuan W, Wu F, et al. Formulating erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation[J]. J Control Release, 2008, 130(3): 259-265
- [20] Gombotz W R, Pettit D K. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery[J]. Bioconjug Chem, 1995, 6(4): 332-351
- [21] Jin T, Chen L, Zhu H, et al. Stable polymer aqueous/ aqueous emulsion system and uses thereof[P]. US patent, 2004, 6805879