

PLGA 微粒中蛋白稳定性和完全释放的研究进展

张 敏¹, 高 静², 张 玮³, 高 申^{1*}

1. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433

2. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

3. 解放军第 522 医院药械科, 洛阳 471000

[摘要] 以 PLGA 为载体的蛋白药物微粒给药系统存在的最大的问题是蛋白稳定性和蛋白的完全释放。本文总结了增强蛋白药物稳定性和在体外释放期间促使蛋白完全释放的方法。蛋白药物完全释放的前提是保持蛋白稳定性。保持蛋白稳定性的方法之一是通过加入添加剂、对蛋白药物和聚合物进行修饰等避免蛋白在不利释放环境中聚集变性;另一个方法是避免不稳定环境的形成。

[关键词] 蛋白; PLGA 微粒; 稳定性; 药物释放系统

[中图分类号] R 943

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)03-0328-04

Stability and complete release of protein from PLGA-based microparticles: an update

ZHANG Min¹, GAO Jing², ZHANG Wei³, GAO Shen^{1*}

1. Department of Pharmaceutics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3. Department of Pharmaceutics, No. 522 Hospital of PLA, Luoyang 471000, Henan, China

[Abstract] One of the most challenging issues in the delivery of therapeutic proteins from PLGA-based microparticles is the stability and complete release of the protein in its native form. This review summarizes the methods to promote the stability and *in vitro* release of protein from PLGA-based microparticles. Protein stability is the precondition of complete release. One way to keep protein stability is to use stabilizer or modify protein to avoid denaturation and aggregation; another way is to avoid the pro-instability environment.

[Key words] protein; PLGA microspheres; stability; drug delivery systems

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(3): 328-331]

近年来越来越多的蛋白和多肽作为治疗药物在诊断、治疗或作为疫苗预防各种疾病方面发挥着越来越重要的作用, 由于受到蛋白的易变性和频繁给药的给药方式的限制, 蛋白药物的给药系统有待进一步研究^[1]。为了加强蛋白药物的疗效和达到蛋白缓释给药的效果, 注射用生物降解载药微粒随之发展, 其中研究最多的是 PLGA 蛋白微粒给药系统。

PLGA 是由单体乳酸和羟基乙酸无规聚合的共聚物, 具有很好的生物相容性和可降解性被大量用作微粒控释系统的骨架材料。药物从 PLGA 微球内部通过微球表面的小孔通道、聚合物本体溶蚀后扩散出来。在实验研究中发现蛋白药物和化学小分子的释放趋势是不同的, 蛋白药物的释放存在突释量大、释放后期释放速率慢甚至是不释放的问题。突释大多是由黏附在微球表面的蛋白快速扩散造成的^[2], 不完全释放是由于蛋白的不稳定发生了聚集现象或是蛋白与

聚合物发生相互作用(非特异性吸附)。因此, 要使微粒内蛋白药物完全释放, 可以减小蛋白在微球内的聚集, 减少蛋白和聚合物及降解产物的相互作用。本文综述了影响蛋白体外释放的实验条件和增强蛋白稳定性并使之完全释放的方法。

1 影响释放的实验条件

1.1 释放介质 释放介质的 pH 值对蛋白的稳定性和聚合物的降解具有至关重要的作用, 聚合物在酸性或碱性介质中会加速降解; 同时, pH 值还会影响蛋白质的溶解度, 例如酸性环境能够使一种蛋白聚合, 但可以保持另一种蛋白的稳定性, 在 Li 等^[3]的研究中发现转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 在 pH 值为 3、5、7.4 的缓冲液中的释放速率较小, 尽管微球骨架降解很快, 这是因为 TGF- $\beta 1$ 在这样的环境中发生了聚集现象;

[收稿日期] 2011-10-12 **[接受日期]** 2012-01-04

[基金项目] 国家自然科学基金(81000689, 81172514, 30873178), 上海市自然科学基金(10ZR1437300). Supported by National Natural Science Foundation of China(81000689, 81172514, 30873178) and Natural Science Foundation of Shanghai(10ZR1437300).

[作者简介] 张 敏, 硕士生. E-mail: marylandie@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873715, E-mail: liullk@126.com

而胰岛素生长因子(IGF-1)在 pH 值 5.4、2.5 的条件下不会发生聚集,能够加速并且完全释放^[4]。

一般认为增加释放介质中的离子强度会减慢释放速率, Hora 等^[5]研究认为离子浓度的增加减少了载体聚合物的溶胀,从而减少蛋白从微球内部扩散释放;另外离子强度的增加还能加剧蛋白的聚集。Yang 等^[6]研究发现重组人体干扰素(rhIFN- γ)在等渗的盐溶液中会发生聚集、在低渗液(5 mmol/L 的丁二酸溶液)却能保持稳定。有少数例外,在加入了 NaCl 的高离子强度的释放介质中,大量的溶解酶素能从 PLGA 微球中释放,这是因为介质中阴离子能和溶解酶素中的阳离子相互作用,同时还能加速 PLGA 羧酸基团的断裂,在随后释放阶段中可能会导致不完全释放。

1.2 体外释放试验方法 蛋白微粒常用的体外试验方法有三类: 透析技术、透析膜扩散及连续流动释放^[7]。蛋白微粒的体外释放最常用的是透析方法,通过离心使药物从载体中释放,但这种方法的转运会在很大程度上影响释放速率。试验时微球会沉淀在试管的底部,这会改变聚合物的物理特性,尤其是聚合物的降解,这会加速聚合物降解,使蛋白更快地变性和释放,可以通过减小离心速度来减小这方面的影响,且低速离心的体外释放数据和体内释放速率更具有相关性。同时释放介质的体积也会影响释放速率, Kim 等^[8]研究发现重组人生长激素(rhGH)的 *s/o/w* 型 PLGA 微球释放液体积增大,释放度也就越大,这可能受 rhGH 的聚集和解离的热力学平衡的影响,也可能是释放介质体积增大可以降低 PLGA 降解的酸性产物浓度。总之,透析方法由于设备要求简单且可以通过调整离心速度和缓冲液体积获得较好的体内体外相关性,所以是最常用的方法。

透析膜扩散方法是微球放置在透析袋中释放,酸性降解产物在渗透压作用下通过膜扩散出去,这能使微球在释放期间处在稳定的 pH 值环境中^[9]。但是该方法需要大体积的释放接收液,使得释放出的蛋白在稀释后的浓度更低,增加了蛋白含量检测的难度而限制了该方法的使用范围。

连续流动释放法是通过恒流泵不断的更换释放介质,该方法的酸性降解物质不会对微球的释放有影响,而且这也更好地模拟了人体内流动的生理环境,上文中提到的 rhGH 微球在这样的体系中释放能够得到很好的体内体外相关性。但设备复杂限制了该方法的使用, Aubert 优化改进了恒流体系,能更好的防止蛋白收集时的降解和蛋白在分析前的聚集变性^[10]。

最近研究发现一种更适合微球给药系统的体外测试方法——流通池法^[11]。连续流动测定技术由于采用大量的释放介质稀释了药物浓度,对于小剂量及长效微球制剂的测定有一定的限制。而流通池法的测定原理与连续流动测定技术是相似的,它可以分别模拟微球的两种不同释放机制,扩散机制和溶蚀机制。它更适用于小体积释放介质的连续流动,还可以克服连续流动测定技术中搅拌不充分造成的微球堵塞滤孔的情况,它与上述几种方法比较具有更好的体内体外相关性^[12]。

2 蛋白质稳定方法

2.1 蛋白的化学修饰 蛋白进行聚乙二醇(PEG)化修饰后

可以增加自身在溶液中的稳定性, Diwan 等^[13]研究发现 PEG 化的溶解酶素减小了对空白 PLGA 微球的吸附,而在 PLGA 降解过程中吸附在聚合物表面的蛋白会减少微球内蛋白的释放,所以修饰后的蛋白能加快蛋白的释放速率;在水合溶胀阶段,蛋白会发生二硫键转换的聚集现象造成不完全释放,若将牛血清白蛋白(BSA)进行 PEG 修饰 BSA 的巯醇基与 PEG 的羧甲基反应, BSA 在 28 d 的释放期没有发生聚集,并且能持续释放至 56 d 后达到完全释放^[14]。

2.2 PLGA 降解产物的中性调节 PLGA 的酸性降解产物引起介质的 pH 值不断下降,增加了蛋白的非共价键结合,造成蛋白聚集。因此可以在蛋白的内水相中加入碱性盐如 $Mg(OH)_2$ 中和酸性降解产物,以减小蛋白聚集,而碱性盐在微球孔洞中的扩散能力将会影响蛋白的释放速率。强碱如 $Ca(OH)_2$ 会减小释放时间,而弱碱如 $ZnCO_3$ 却不能减少聚集,调节 pH 的作用也不强,由此可以改用 $MgCO_3$, 其碱性 with $Mg(OH)_2$ 相当,水溶性却增大了 10 倍。已经有研究在 PLGA 微球中加入其他类似的碱性盐如碳酸钙、磷酸钙、醋酸钠等,对微球释放速率的控制有不可忽视的作用^[15]。

2.3 促进蛋白复性重叠 冷冻干燥的固体蛋白微球,其性质稳定,在释放过程中微球弹性因水合作用而增加且对不利环境更敏感,同时微球内部高浓度的蛋白更容易发生聚集。若在内水相加入蛋白解离剂尿素^[16],可以防止溶解酶素聚集且解离后的溶解酶素扩散释放速率增大,而解离变性的蛋白在释放介质中能以正确的构象重叠复性; Lam 等^[17]的研究中神经生长因子(NGF)的 PLGA 微球蛋白中加入添加剂金属 Zn 可以与 NGF 形成不溶且具有可逆性的 NGF-Zn 复合物,能够有效的减少蛋白聚集。尽管金属诱导的蛋白沉淀法要求蛋白应有金属离子的结合位点和特殊的条件以获得可逆性复合物,但是这项研究是很有前景的,如硫酸铵用于这项研究且取得很好的成效,使用喷雾干燥技术,可以制成包裹固体蛋白的微球,将促红细胞生成素(EPO)和硫酸铵制成固体复合物所制备的微球不会因为高浓度蛋白而出现盐析现象,而且能达到缓释效果;另一种方法是将蛋白微粒使用两亲性聚合物如 PEG 制成纳米粒,再制成 PLGA 微球, PEG 能够防止微球水合过程中的蛋白聚集,但含有大量 PEG 的冻干蛋白会导致严重的突释,为此需要适量调整 PEG 的含量^[18]。

2.4 形成粘性微环境 减小蛋白的聚集、减小蛋白与聚合物之间相互作用的最有效方法是使蛋白能够隔离在它的微环境中,这还能提高它的释放度。微球内部使用凝胶、琼脂糖、聚乙烯醇(PVA)、淀粉制备的 PLGA 微球,虽然其释放时间较长,但相对于普通的 PLGA 微球释放更完全, Jiang 等^[19]的研究中发现用 PLGA-淀粉制备的胰岛素微球在 pH=2.8 的释放介质中达到了缓释并且完全释放,且有很好的体内体外相关性。黏性物质在制剂过程中直接加入到水相或是有机相中,在用复乳法(*w/o/w*)制备的微球的内水相中加入泊洛沙姆 407,可以保护尿素稳定并能增加释放度。淀粉、透明质酸也具有此作用,它们可以直接加在内水相与冻干的固体蛋白融合形成微滴,以制备成 *s/w/o/w* 型微球,用此方法制备的溶解酶素、格纳瑞林、rhGH 等微球的释放速率都符合零

级释放。最近,有研究在有机相中加入醋酸-异丁酸蔗糖酯(SAIB)形成黏性的水凝胶,这种高黏度的蔗糖衍生物能使溶解霉素微球的释放期延长至两个月,并且完全释放,同时还能减少突释,使PLGA降解变慢,保护蛋白^[8]。

2.5 使用亲水聚合物 通过增加聚合物的亲水性可以提高蛋白的释放度,使用PLGA(75/25)制备的微球的释放度低于PLGA(50/50)制备的微球^[20],由于聚羟基乙酸(GA)的亲水性强于聚乳酸(LA),因此提高PLGA中LA/GA的比例能够增加PLGA的疏水性;在PLGA的主链上接上枝状的PVA形成毛刷状的聚酯(PLGA-g-PVA),可以适用于更多的药物模型作为载体,PLGA-g-PVA的特性参数如相对分子质量、玻璃化转化温度、亲水性、与蛋白的相容性等的调控自由度增大,使用PLGA-g-PVA制备的微球比PLGA微球的持续释放速率更稳定。

聚合物PLGA和聚环氧乙烷(PEO)形成的嵌段共聚物的理化性质比单体聚合物具备更多的优点,因为三嵌段共聚物的结构和溶胀、溶蚀机制与水凝胶类似,所以此共聚物的吸水性明显强于PLGA微球;大分子药物能在三嵌段共聚物结构中连续释放,该释放速率与药物相对分子质量具有相关性。随着聚合材料技术的不断发展,研发合成了越来越多的共聚物,例如PLGA与PEG的低聚物合成接枝共聚物,也具有类似的水凝胶结构,在这种聚酯的溶胀过程中,BSA可以达到持续和完全释放^[21];另外PLGA和PEG的低聚物能够形成PLGA-PEG-PLGA(M_w 1 500-1 200-1 500)的三嵌段共聚物,制成的胰岛素微球突释量低,能够缓释3周,释放量达到85%以上^[22]。

3 减少影响释放的不利因素

上述蛋白药物的释放过程同时伴随着聚合物的降解,而聚合物降解物质会影响药物蛋白的稳定性,如果在聚合物降解之前释放出蛋白,可以减少造成蛋白不稳定的不利因素,此法可通过对聚合物的定向修饰实现。

3.1 延迟聚合物降解 聚合物降解受水分子进入聚合物酯链的难易程度的影响,聚合物的相对分子质量、共聚物的组成成分比例、结晶度的不同会影响水分子进入酯链的难易程度,说明了蛋白药物的稳定性和控制释放度很大程度上是取决于聚合物降解的动力学,若聚合物的降解延迟,蛋白可以在聚合物降解之前释放完全。

聚合物的降解主要取决于其相对分子质量,对于小分子药物而言,聚合物的分子链越长降解时间越长,小分子药物释放时间延长;而对于大分子药物如蛋白却与之相反,聚合物相对分子质量越大,蛋白药物释放越快,Liu等^[23]研究发现,用两种不同相对分子质量(15 000与87 000)的PLGA(50:50)制备粒径为10 μm 的BSA微球,低相对分子质量制备的微球中的BSA几乎没有突释,在1个月后还没有完全释放,而高相对分子质量PLGA制备的相同微球,突释量大,在15 d后BSA完全释放,这是因为在聚合物的降解过程中低相对分子质量的PLGA会分解更多的离子化羧基,它能够和蛋白的阳离子发生离子间相互作用,使蛋白吸附在聚合物表面更难释放^[24];同时共聚物的组成成分也会影响聚合物的降

解,由于GA具有强亲水性,当PLGA中GA的含量增大,PLGA的降解速度会加快,更多的酯键水解为羟基和羧基,释放介质的pH值下降加快,更容易形成药物蛋白的不完全释放^[2];另外,聚合物的吸水性还与聚合物中晶状体和无定形不同晶形比例有关,一般无定形聚合物更容易发生水合,Kim等^[25]研究发现使用半结晶型、低相对分子质量的PLGA制备的rhGH微球相较于用无定形PLGA制备的微球能够更好的控制释放速率。

3.2 控制微球孔洞 微球载体中存在的孔洞是影响药物释放的重要因素之一。为了增加蛋白在PLGA微球的释放,可以在载体材料中加入泊洛沙姆制备微球,因PLGA与泊洛沙姆之间有氢键作用,可以形成稳定且抗冲刷能力强的复合物。泊洛沙姆401与PLGA一起制备的s/o/o型微球突释时间变短,持续释放时间变长^[26],是因为泊洛沙姆401偏向疏水性且制成的微球表面孔洞少并且微球的粒径增大。最近,Carrasquillo等^[27]研究制备出一种表面孔洞关闭的新式微球,在PLGA中加入孔洞形成剂泊洛沙姆407,并使用能部分溶解PLGA且与水混溶的试剂阻塞微球表面的孔洞,此方法制备的rhGH微球能缓释1个月。

3.3 减小聚合物蛋白的接触面 载体PLGA在微球的释放过程中是阻碍蛋白释放的屏障。如果减少蛋白与聚合物的接触面,可以减少蛋白药物和聚合物之间的相互作用,从而控制释放度使之达到完全释放。Kim等^[25]认为可以采用微囊代替微球来减小蛋白和聚合物之间的相互作用,已经有使用溶剂交换法制备可逆蛋白微囊的详细报道。通过超声雾化器使水相液滴和有机相相互碰撞,形成有机相包裹水相中心的微囊,溶剂挥发固化,该微囊释放的溶解霉素性质不变、突释量小,释放速度取决于微囊的聚合物囊厚度^[28]。

4 小 结

可生物降解的蛋白微粒给药系统受到蛋白不稳定性和不完全释放等因素限制,根据对影响蛋白药物稳定性因素和完全释放机制的研究,总结了增加蛋白稳定性和提高蛋白微粒释放度的方法。这些方法有的通过对微粒制剂中的蛋白、聚合物、添加剂等的调整,也有的通过改变制备方法达到的,可总结为两类:一种是在不利环境中增加蛋白稳定性,另一种方法是减小影响蛋白稳定和完全释放的不利因素。

最好的体外释放方法是保持蛋白在各个释放阶段的稳定活性、突释小、操作简便,且能转化适用于各种蛋白药物,包括活性敏感的蛋白和低载药量蛋白。随着材料合成技术的不断发展,有望研发出性能更好、更易于控制释放的聚合材料。文章中提到的一些方法可以满足这些要求,比如在释放介质中的蛋白复性,使用更强的亲水性聚合物,创造一个高黏性的微环境,这给治疗蛋白给药系统又迎来了新的希望。

5 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] Kokai L E, Ghaznavi A M, Marra K G. Incorporation of double-

- walled microspheres into polymer nerve guides for the sustained delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor[J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 2313-2322.
- [2] Klose D, Siepmann F, Willart J F, Descamps M, Siepmann J. Drug release from PLGA-based microparticles: effects of the “microparticle: bulk fluid” ratio[J]. *Int J Pharm*, 2010, 383(1-2): 123-131.
- [3] Li Z, Li L, Liu Y, Zhang H, Li X, Luo F, et al. Development of interferon alpha-2b microspheres with constant release[J]. *Int J Pharm*, 2011, 410(1-2): 48-53.
- [4] Tse M T, Blatchford C, Oya Alpar H. Evaluation of different buffers on plasmid DNA encapsulation into PLGA microparticles[J]. *Int J Pharm*, 2009, 370(1-2): 33-40.
- [5] Hora M S, Rana R K, Nunberg J H, Tice T R, Gilley R M, Hudson M E. Release of human serum albumin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres[J]. *Pharm Res*, 1990, 7: 1190-1194.
- [6] Yang J, Cleland J L. Factors affecting the *in vitro* release of recombinant human interferon-gamma (rhIFN-gamma) from PLGA microspheres[J]. *J Pharm Sci*, 1997, 86: 908-914.
- [7] Klose D, Delplace C, Siepmann J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles[J]. *Int J Pharm*, 2011, 404(1-2): 75-82.
- [8] Kim H K, Chung H J, Park T G. Biodegradable polymeric microspheres with “open/closed” pores for sustained release of human growth hormone[J]. *J Contr Rel*, 2006, 112: 167-174.
- [9] Elkharraz K, Ahmed A R, Dashevsky A, Bodmeier R. Encapsulation of water-soluble drugs by an o/o/o-solvent extraction microencapsulation method[J]. *Int J Pharm*, 2011, 409(1-2): 89-95.
- [10] Kim H K, Park T G. Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres; morphological effect on protein release[J]. *J Contr Rel*, 2004, 98: 115-125.
- [11] Rastogi R, Sultana Y, Aqil M, Ali A, Kumar S, Chuttani K, et al. Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery[J]. *Int J Pharm*, 2007, 334(1-2): 71-77.
- [12] Dong W Y, Maincent P, Bodmeier R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of carbamazepine-loaded enteric microparticles[J]. *Int J Pharm*, 2007, 331: 84-92.
- [13] Diwan M, Park T G. Stabilization of recombinant interferon-alpha by pegylation for encapsulation in PLGA microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2003, 252(1-2): 111-122.
- [14] Blanco D, Alonso M J. Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres; effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, 45: 285-294.
- [15] Lee J H, Oh J H, Kim M R, Min C K. Evaluation of *in vitro* spermatogenesis using poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based macroporous biodegradable scaffolds[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011, 5: 130-137.
- [16] Orive G, De Castro M, Kong H J, Hernandez R M, Ponce S, Mooney D J, et al. Bioactive cell-hydrogel microcapsules for cell-based drug delivery[J]. *J Contr Rel*, 2009, 135: 203-210.
- [17] Lam X M, Duenas E T, Cleland J L. Encapsulation and stabilization of nerve growth factor into poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres[J]. *J Pharm Sci*, 2001, 90: 1356-1365.
- [18] Nie Y, Zhang Z R, He B, Gu Z. Investigation of PEG-PLGA-PEG Nanoparticles-based Multipolyplexes for IL-18 Gene Delivery[J]. *J Biomater Appl*, 2011, Jan 27. [Epub ahead of print]
- [19] Jiang G, Qiu W, DeLuca P P. Preparation and *in vitro/in vivo* evaluation of insulin-loaded poly(acryloyl-hydroxyethyl starch)-PLGA composite microspheres[J]. *Pharm Res*, 2003, 20: 452-459.
- [20] Wang X, Wenk E, Zhang X, Meinel L, Vunjak-Novakovic G, Kaplan D L. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering[J]. *J Contr Rel*, 2009, 134: 81-90.
- [21] Thomas C, Gupta V, Ahsan F. Influence of surface charge of PLGA particles of recombinant hepatitis B surface antigen in enhancing systemic and mucosal immune responses[J]. *Int J Pharm*, 2009, 379: 41-50.
- [22] Song Z, Feng R, Sun M, Guo C, Gao Y, Li L, et al. Curcumin-loaded PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles: Preparation, pharmacokinetics and distribution in vivo[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2011, 354: 116-123.
- [23] Liu Q, Zhang H, Zhou G, Xie S, Zou H, Yu Y, et al. *In vitro* and *in vivo* study of thymosin alpha1 biodegradable in situ forming poly(lactide-co-glycolide) implants[J]. *Int J Pharm*, 2010, 397(1-2): 122-129.
- [24] Allesio M, Chieng N, Rehder S, Rantanen J, Rades T, Aaltonen J. Enhanced dissolution rate and synchronized release of drugs in binary systems through formulation; amorphous naproxen-cimetidine mixtures prepared by mechanical activation[J]. *J Contr Rel*, 2009, 136: 45-53.
- [25] Kim J H, Park J S, Yang H N, Woo D G, Jeon S Y, Do H J, et al. The use of biodegradable PLGA nanoparticles to mediate SOX9 gene delivery in human mesenchymal stem cells (hMSCs) and induce chondrogenesis[J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 268-278.
- [26] Fuhrmann K, Gauthier M A, Leroux J C. Crosslinkable polymers for nanocrystal stabilization[J]. *J Contr Rel*, 2010, 148: e12-e13.
- [27] Carrasquillo K G, Stanley A M, Aponte-Carro J C, De Jesus P, Costantino H R, Bosques C J, et al. Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein[J]. *J Contr Rel*, 2001, 76: 199-208.
- [28] Grandoso L, Ponce S, Manuel I, Arrue A, Ruiz-Ortega J A, Ulibarri I, et al. Long-term survival of encapsulated GDNF secreting cells implanted within the striatum of parkinsonized rats[J]. *Int J Pharm*, 2007, 343(1-2): 69-78.