

注射用乳酸-羟基乙酸共聚物微球的体内外相关性研究进展

王 珊, 花亚冰, 高 翔, 张 慧, 刘 楠, 高 静*, 郑爱萍*

(军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 注射用乳酸-羟基乙酸共聚物 (polylactide-polyglycolide, PLGA) 微球作为一种储库型释药系统, 自 1989 年第 1 个产品 Lupron depot 获准在美国上市起, 已成功用于多种疾病的治疗, 具备在体内几天到几个月长时间释药的能力, 可显著改善用药安全性, 提升患者顺应性。体内外相关性 (*in vitro-in vivo* correlation, IVIVC) 研究给微球制剂的发展带来更多可能。IVIVC 可以通过微球的体外释放行为阐述体内释药的动态信息, 在表征微球性能的同时减轻各阶段的工作量, 对药物的研发、生产变更和监督管理等具有指导或支持作用。本文将注射用 PLGA 微球的释放机制、体内外释放测定涉及的常用方法和理论进行归纳总结, 重点讨论了 IVIVC 尤其是 A 级 IVIVC 在微球制剂领域的建立及应用, 为进一步的微球体内外相关性研究提供参考。

关键词: 注射用乳酸-羟基乙酸共聚物微球; 体内外相关性; 释放机制; 体外释放度; 体内释放度

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)01-0158-11

Research progress of *in vitro-in vivo* correlation of injectable poly lactide-polyglycolide microspheres

WANG Shan, HUA Ya-bing, GAO Xiang, ZHANG Hui, LIU Nan, GAO Jing*, ZHENG Ai-ping*

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

Abstract: As a depot drug delivery system, injectable poly lactide-polyglycolide (PLGA) sustained-release microspheres have been successfully used to treat many diseases since the first microsphere product Lupron depot was approved for marketing in the United States in 1989. It has the ability of long-term release in the body for several days to several months, which can not only reduce the times of administration, but also reduce the drug blood concentration fluctuations, significantly improve the safety and patient compliance. *In vitro-in vivo* correlation (IVIVC) makes the development of microspheres more possible. It can describe the dynamic information of drug release *in vivo* through the *in vitro* release behavior of microspheres, and can reduce the workload of each stage and shorten the time span while characterizing the performance of microspheres. IVIVC can provide guidance or support for drug development, production changes, supervision and management. This article summarizes the release mechanism of injectable PLGA sustained-release microspheres, common measurement methods and theories of *in vitro* and *in vivo* release. And we also focus on the establishment and application of IVIVC, especially A level IVIVC in the field of microsphere preparations, to provide a reference for further study on *in vitro-in vivo* correlation of microspheres.

Key words: injectable poly lactide-polyglycolide microsphere; *in vitro-in vivo* correlation; release mechanism; *in vitro* release rate; *in vivo* release rate

收稿日期: 2020-07-08; 修回日期: 2020-08-27.

基金项目: 国家重大新药创制专项 (2018ZX09721003-005-009); 中国药学会-以岭生物医药创新基金资助项目 (CPAYLJ201801); 军事医学创新工程专项 (16CXZ032).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-66874665, E-mail: gjsmmu@126.com;

Tel / Fax: 86-10-66931694, E-mail: apzheng@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1151

微球是缓释剂型的研究热点,是指药物分散或被吸附在聚合物基质中形成的微小球状实体,粒径一般在 $1\sim 250\ \mu\text{m}$ ^[1],主要通过皮下或肌肉注射方式给药^[2]。微球制剂制备方法多样,包括常用的溶剂挥发法、喷雾干燥法以及新兴的相分离法、膜乳化法等。缓释微球作为药物长效递送系统,能够在减少给药次数的基础上提供治疗所需的稳定药物浓度,同时药物被分散在聚合物材料中可以改善其在人体内所处的微环境,降低毒副作用,用于蛋白多肽类等半衰期较短的药物时,可以提高生物利用度、增强药物效力和稳定性^[3,4]。在制备注射用缓释微球的众多可降解高分子材料中,乳酸-羟基乙酸共聚物 (polylactide-polyglycolide, PLGA) 因具有较高的生物相容性而广受关注^[5]。

近年来,候选药物大幅增加,需要进行的临床研究数量也加倍,导致开发和监管的成本很高。同时,在体内监测 PLGA 微球中药物的释放通常需要较长时间。因此,寻找一些方法预测药物的体内药代动力学是符合现阶段需求且十分有益的。体内外相关性 (*in vitro-in vivo correlation*, IVIVC) 的概念由 Wagner 等^[6]在 1985 年首次提出,是一种用于预测的数学模型,描述了药物的体外溶出行为 (通常是药物溶出速率或程度) 和体内药代动力学过程 (如血药浓度或药物吸收量) 之间的联系。IVIVC 评价体系主要包括药物的体外释放研究、体内释放研究和建立模型的数学处理方法³

方面内容。通过 IVIVC 在体内外释放行为间建立的定量、可靠的联系,测定药物体外释放行为就可以间接得到体内释放结果。

不同制剂类型的释放特点不同,缓控释制剂中药物的释放是体内吸收的限速步骤,所以 IVIVC 在微球的各方面得到了成功的应用^[7]。本文简要地对注射用 PLGA 微球 IVIVC 的评价体系进行归纳总结,并叙述了 IVIVC 在微球制剂领域的应用情况,以期为进一步的微球体内外相关性研究提供参考。

1 注射用 PLGA 缓释微球释放机制

缓释微球作为骨架型缓控释制剂,释放机制主要分为两类:扩散和降解。微球制剂中药物的释放可以是单相、两相或三相^[8],而大多数注射用 PLGA 微球的释放过程如图 1 所示,基本按照初始的表面释放、释放速率近恒定的滞后释放和后期的加速释放 3 个阶段进行。

在早期,制备过程中分配或吸附到微球表面、存在于孔隙内和近表面的药物迅速释放,形成突释^[9,10]。这一阶段药物释放时间短、速率快,通过控制扩散控制释药。因为药物释放速率与微球直径成反比,所以突释现象可能被尺寸较小微球的释放加剧。传统的制备方法通常会得到一部分直径小于 $5\sim 10\ \mu\text{m}$ 的微球,这些微球释药速度更快。研究人员发现,在去除尺寸较小的微球后,药物初期的突释效应较小或消失^[11,12]。此外,水溶性药物的突释效应可能会更加显著。在微球

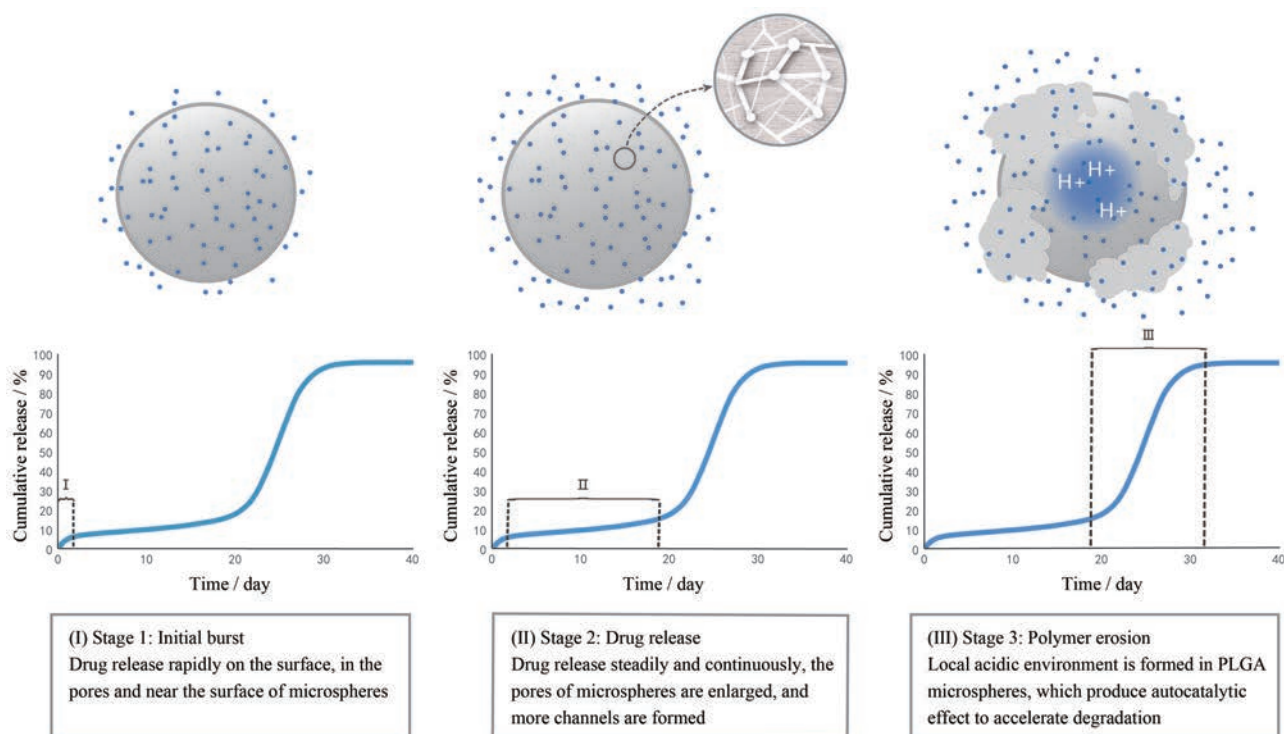


Figure 1 Release process of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres

制备中, 此类药物倾向于从油相分配或扩散到水相中, 有吸附在界面上的趋势, 使得亲水性药物更集中在微球表面^[13,14]。同时, 载药量也影响药物的突释。通常载药量越大, 药物的突释程度越大。

突释后一段的释放过程较为平稳。此时, 聚合物发生溶胀, 孔隙增大, 形成较多的孔道, 被包裹在聚合物内部的药物借助孔道向外缓慢释放^[15]。这段时间内, 微球表面及近表面的药物已基本溶出, 能够进入微球的释放介质有限, 可能使微球内部的药物浓度饱和。同时, 外部释放介质中药物浓度近似于零, 使得内外形成一定的浓度梯度, 符合漏槽条件, 药物释放速率近似恒定^[8]。

最后溶蚀阶段微球的释药速率较快, 受聚合物降解速率控制^[16]。实际上, 聚合物的降解伴随在微球释放的整个过程中, 只是在药物释放的尾声, 聚合物链的快速水解断裂加快了释放进程, 并与聚合物的组成、分子量、结晶度和端基等特征相关^[5,17]。降解使聚合物长链变为短链, 增加了微球的孔隙率和亲水性, 有利于介质进入, 微球形成相互交联的药物释放通道, 最终不再具有整球形态^[8]。对于以 PLGA 等聚酯材料为骨架的微球, 聚合物降解主要是酯键的水解, 偏酸或偏碱都能加速水解。同时水解过程中产生了酸性降解产物, 且这些酸的生成速率高于扩散和被中和的速率, 使微球内部生成局部酸性环境, 自催化加速降解^[13,18]。与较小尺寸的微球相比, 较大微球因为扩散距离的增加, 自催化效果更明显^[19]。

2 微球体外释放研究

体外释放行为是药物开发时必须考察的性质^[18]。同时, 微球制剂也需要测定体外释放来指导药物的体

内释放研究和体内外相关性的预测^[20]。在许多情况下, 没有得到预测能力可靠的 IVIVC 是因为使用的体外释放度方法对释药特征不同的微球处方不具备较好的区分能力。当测定方法更加准确地反映了释药行为, IVIVC 创建成功的可能性就会增加^[21]。所以, 注射用 PLGA 微球体外释放度测定条件和的选择, 既要考虑药物自身的性质, 也要着眼于与体内药代动力学参数有较好的相关性上。

影响微球体外测定的因素主要分为两类: 介质条件和试验仪器^[22]。介质大多从药物润湿的角度对释药行为产生作用^[18], 主要有介质体积、pH 值、离子强度、加入的表面活性剂、酶系统和缓冲系统等因素; 试验仪器主要从流体动力学方面影响药物的体外释放测定, 包括温度、试验装置、搅拌速度/流速和搅拌方式等。在实际操作时, 应通过调整释放条件和/或方法来充分表达药物的释放行为。表 1^[17,23-32]列出了美国 FDA 批准上市的注射用微球制剂常用的体外释放方法和释放介质。

2.1 体外长期释放试验

因为微球释放行为的复杂性, 国内外都尚未制定针对微球的统一的体外释放度测定方法^[33,34]。体外长期释放测定的方法和条件一般是模拟体内的真实释药情况。值得注意的是, 测得的释放曲线应该体现完整的释放过程, 不能丢失药物释放的任何片段。

2.1.1 直接释药法 直接释药法应用范围较广, 它是将微球直接置于释放介质中, 采用适当的装置检测药物的释放。该法可以通过恒温水浴振荡法、桨法和摇床法进行。释放介质的体积从几毫升到几百毫升不等, 满足漏槽条件即可。某些情况下, 为了降低药物降

Table 1 Examples of *in vitro* release methods of injectable PLGA microspheres approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). a: Active pharmaceutical ingredient; b: Phosphate buffered saline; c: Dissolution methods database of FDA

API ^a	Method	Condition	Reference
Leuprolide acetate	Sample and separate	PBS ^b (33 mmol·L ⁻¹ , pH 7.4, 1 mL) with 0.02% (v/v) Tween 20 and 0.02% (w/v) sodium azide, 100 r·min ⁻¹ and at 37 °C	[23,24]
Octreotide acetate	Dialysis	Sodium acetate buffer (50 mmol·L ⁻¹ , pH 4.0, 10 mL), 100 r·min ⁻¹ and at 37 °C	[25]
Somatotropin (rDNA origin)	Sample and separate	PBS, 2 r·min ⁻¹ and at 37 °C	[26]
Triptorelin pamoate	Paddle	Water-methanol (95:5, 500/1 000 mL), 200/75 r·min ⁻¹ and at 37 °C	FDA ^c
Lanreotide	Sample and separate	PBS (pH 7.4, 20 mL), 60 r·min ⁻¹ and at 37 °C	[27]
Minocycline HCl	Dialysis	PBS (pH 7.8, 8 mL) and at 37 °C	[28]
Risperidone	Flow-through cell	PBS (10 mmol·L ⁻¹ , pH 7.4, 250 mL) with 0.01% (w/v) sodium azide at 37 °C and pump flow rate is 8 mL·min ⁻¹	[24,29]
Naltrexone	Flow-through cell	PBS (pH 7.4, 50 mL) with 0.02% (v/v) Tween 20 and 0.02% (w/v) sodium azide at 37 °C and pump flow rate is 8 mL·min ⁻¹	FDA,[30]
Exenatide	Sample and separate	PBS (pH 7.4, 1 mL), 100 r·min ⁻¹ and at 37 °C	[31,32]
Pasireotide	Paddle	Cetyltrimethylammonium bromide solution (0.2%, pH 2, 500 mL), 50 r·min ⁻¹ and at 45 °C	FDA
Triamcinolone acetoamide	Flow-through cell	PBS (10 mmol·L ⁻¹ , pH 7.2, medium volume is 15 times solubility volume) with 0.1% (w/v) SDS and 0.01% (w/v) sodium azide at 35 °C and pump flow rate is 8 mL·min ⁻¹	[17]

解产物在介质中积累产生的影响,需要对缓冲液进行更换^[35,36]。该测定法简单直接、结果较准确且易实现高通量。直接释药法的主要缺点有:微球易漂浮在释放介质表面,易在介质中聚集;取样和介质替换过程中样品的损失不可避免,尤其是当释放介质体积较小时,损失是不可忽视的^[35]。

Chen 等^[37]将 PLGA 复合 CaSiO_3 阿司匹林微球和 CaSiO_3 阿司匹林微球分别置于 1 mL 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 中,在 37 °C 下利用直接释药法测定释放曲线。结果与 CaSiO_3 微球相比,PLGA 复合 CaSiO_3 阿司匹林微球持续释放超过 40 天,释药时间明显延长,体外缓释现象明显。Pervaiz 等^[38]制备了一种新的基于不同聚合物比例的奥氮平微球,并采用恒温水浴振荡法对不同处方微球的体外释放行为进行考察。将样品置于 PBS (pH 7.4) 中,在 37 °C 下水浴振荡 (100 r·min⁻¹)。结果表明,其中 PLGA (75:25) 和 PLGA (85:15) 的微球释放周期大于 30 天,具备稳定、长效的释药能力。

2.1.2 动态透析法 动态透析法是将微球置于含有释放介质的透析装置内,随后被放入含有大量相同介质的容器中进行试验,从外容器中取样检测。透析膜可以将测试环境分为两个腔室。因为皮下或肌肉注射给药时微球会在组织内缓慢扩散,所以膜透析仪器中非漏槽条件的膜内部分可以对应给药部位,符合漏槽条件的外部对应体内的血液循环。此法较好地模拟了体内真实释药条件,且取样和更换介质的简便性更好^[2,39]。设置测定条件时,透析仪器的内容积应至少比外部容积小 6~10 倍,以获得足够的动力使药物被输送到膜外^[5]。如果药物与透析膜相互作用,则应考虑其他方法进行测定。该方法的局限性在于透析膜内微球可能会聚集;装置中透析膜的扩散系数不会完全一致,而且在时间的作用下,同一透析膜的扩散系数也会改变^[5,40]。Kaiharu 等^[39]采用浆法和动态透析结合的方法对他克莫司微球的体外释放行为进行评价。结果显示,透析法结合内搅拌的浆法得到的微球体外 28 天释放度为 (92.3 ± 13.4) %, 并与体内行为的相关性最好,表明该法是一种适合预测他克莫司微球体内释药的体外方法。

2.1.3 流通池法 流通池装置具备更好的动态模拟人体体液循环的能力,在国外广受认可^[41],且已收录入 2020 版《中国药典》四部附录 0931“溶出度与释放度测定法”项下。流通池装置分为循环式和开放式两种,前者是封闭式系统,对于后者的开放式系统来说,始终以新鲜释放介质通过样品,和其他方法相比与人体环境更加接近。目前研究人员常加入比例适当的玻璃微珠

来形成层流并防止微球的聚集,适于难溶性药物的测定^[42-44]。并且该装置可将样品固定阻止漂浮,释放介质的 pH 值、体积和流速也可随需要进行调整,具有灵活性^[45]。

Rawat 等^[46]制备了牛血清白蛋白 PLGA 微球,并同时采用流通池法与恒温水浴振荡法进行体外释放度检测。因为减少了取样时样品的损失,流通池法与恒温水浴振荡法相比,具有更高的累计释放百分比 (高约 12%)。所以针对该类蛋白质 PLGA 微球,流通池法可以大限度地减少差异,更符合真实释药现象。Zuo 等^[47]在含 0.1 mol·L⁻¹ 十二烷基硫酸钠的 PBS (pH 7.4) 中分别用摇床法和流通池法对罗替戈汀微球的体外释放过程进行实时测定,并将体内外释放行为相关。结果表明,两法的体外释放曲线相似,得到的体内外相关性均较好,相关系数均大于 0.99,但流通池法检测到该微球初期的突释,更好地描述了体外的释药情况。

2.2 体外加速释放试验

由于微球的长效缓释特性,在体外模拟生理条件下药物的释放需要很长时间,给各阶段所必需的测定工作带来不便^[2]。所以,体外加速释放试验被用于提高药物释放效率,缩短释药周期,给微球的体外释放提供快速、有效的评估途径。目前可通过添加/调整温度、pH 值、有机溶剂、表面活性剂、酶和搅拌速率等方法进行微球的体外加速释放,其中应用较多的是升温 and 调节 pH 值^[21,48]。

初期微球的突释速度非常快,加速条件下该阶段释放的时间更会缩短,所以进行加速试验时可能会发现释药曲线上的突释阶段难以辨别或丢失,这时可以进行部分长期释放研究来得到药物的突释特征^[5,44]。值得注意的是,理想情况下同一处方的加速和长期释放试验会遵循相同的释放机制^[49],但微球在较剧烈的条件下释放机制有可能改变。总之,因为是针对 IVIVC 研究的体外加速试验,所以得到的体外加速结果要与体外长期释放或体内释药情况相关。

提高温度既能通过增强基质分子的迁移性加速药物扩散,也能加速基质的水合作用和降解来加速溶蚀^[5,49]。聚合物玻璃化温度 (glass transition temperature, Tg) 是影响微球释放的关键温度点,多作为选择试验温度的依据。温度在聚合物 Tg 以上时,药物的扩散系数可能成倍增加,有效地加速了微球的释药^[50,51]。Andhariya 等^[30]分别考察了高温 (45 °C) 和不同 pH 值 (4.5、6.0 和 9.0) 条件对纳曲酮 PLGA 微球加速释放的影响。结果表明,升高或降低 pH 值后药物变得不稳定。在 45 °C 并加入抗氧化剂的条件下,药物稳定且在短时间内释放完全,得到的加速释放曲线与长期释放曲线拟合较

好,可预测该微球的长期释药行为。Chen等^[52]开发了基于恒温水浴振荡法的加速方法,在50℃条件下得到了20(S)-原人参二醇PLGA微球的加速释放曲线,并与长期释放结果比较。经拟合发现,长期与加速试验的相关性较好,可用加速试验替代长期释放试验对药物进行评价。

pH值通过影响聚合物的水解动力学来提高降解速率,加速效果较升温法温和^[48]。Zolnik等^[53]在pH 7.4的长期释放和pH 2.4的加速条件下对不同分子量PLGA微球(25 K和70 K)的体外释放行为进行考察。结果表明,两种微球处方在酸性和中性条件下都表现出三相释放,降低pH值没有改变微球释放机制,低pH值条件只在最后阶段加快了释放,前两阶段与长期条件下微球的表现相似。在pH 2.4时,低和高分子量的PLGA微球分别于19和52天释放完全,而常释条件下药物完全释放需要30和84天。虽然该加速条件的效果不是很显著,不适于释放周期长的处方,但类似的加速条件可能对体内外相关性的研究起到帮助。

另外,也可以同时考察多个参数来寻找较优的体外加速试验条件。Xie等^[54]在释放介质中加入乙醇和Tween 80,同时采用程序升温(0~1 h: 40℃、1~6 h: 45℃和6~30 h: 50℃)法对胸腺五肽微球进行加速试验。结果3种分子量微球的体外加速结果与体内释药曲线的相关系数均大于0.97,相关性好,可采用加速释放方法模拟体内释药。Hu等^[55]考察pH值、温度、渗透压和乙醇浓度对不同分子量的利培酮微球释放的影响,寻找最佳体外加速释放条件并建立IVIVC对相关性的评价。最终确定条件:释放介质为含20%(v/v)乙醇的PBS(pH 7.0, 0.1 mol·L⁻¹),温度为45℃时,体外加速释放与体内释放结果有较好的相关性,可用来快速评价该微球的释药特性。

总之,不论是体外长期试验还是加速试验,都应生物相关性作为重点指导依据^[56]。释放度测定的条件和方法越接近体内正常的生理状态,就越有可能得到好的体内外相关性结果。

虽然微球的体外释放试验模拟了体内释药环境,但人体对PLGA微球的反应是一个复杂的过程,药物的释放受很多因素影响,如药物在注射部位的分配、该部位可用液体量和肌肉注射时肌肉的运动情况等^[57]。同时,也包括酶、脂质、自由基、过氧化物和吞噬细胞等生物活性物质对微球的影响^[58]。其中脂质等可充当增塑剂,增加PLGA的流动性,有利于水进入微球;机体引发异物反应产生的酸性产物、自由基等也可能加快聚合物的降解^[59,60],因此,在大多数情况下,微球在体内的释放和降解会倾向快于体外。

3 微球体内释放研究

探究药物体内的释放特征非常重要,因为体内释放行为最为直观地展现了药物的临床性能,为研究人员提供全面的药物信息。同时,微球制剂通常携带大剂量的药物,应该通过监测药物在体内的行为评价复杂环境中药物是否保持平稳释放,以保障用药最基本的安全性。

另外,因为动物和人在物种上的差异性,动物模型得到的结果不能完全推论到人体内。药物开发时,动物模型描述的体内释药行为可以用来构建体内外相关性,但在监管中只有在人体进行的研究可以作为证明生物等效性(bioequivalence, BE)或生物利用度的依据^[21,44]。与体外研究相比,体内测定方法较统一,目前微球体内释药研究主要采用以下两种方法:血药浓度法和体内滞留法。

3.1 血药浓度法

该法是在给药后定时从动物模型或人体取血,测定血浆样品中药物的浓度,得到血药浓度-时间曲线以评价体内的药物释放行为。Yang等^[61]制备了盐酸帕洛诺司琼PLGA微球,并定时从大鼠眼眶后穿刺采血,用超高效液相色谱-串联质谱系统检测得到药代动力学数据并与静脉内注射盐酸帕洛诺司琼溶液比较。体内研究表明,盐酸帕洛诺司琼PLGA微球与纯药物相比,半衰期延长,体内消除延缓,显示出稳定的血药浓度水平(0.207~1.238 ng·mL⁻¹),达到了对药物缓释的期望。Zhang等^[62]采用固-微胶囊化工艺制备了恩替卡韦微球,并从大鼠眶静脉丛采集血样,通过高效液相色谱-串联质谱法进行分析得到血药浓度-时间曲线。研究人员发现该药物体内释放前期突释不明显,血药浓度较稳定,可持续释放42天,表明制备的微球在维持有效药物浓度的前提下,延长了恩替卡韦在体内的作用时间,可满足药物长期治疗的需求。

3.2 体内滞留法

体内滞留法是定时取出给药部位残留的微球,选用适宜方法测定药物的残留量,再进一步得出药物体内释放度的一种方法。Liu等^[63]通过体内滞留法测定醋酸曲普瑞林微球在体内的释放情况,以确定该处方体内和体外加速释放的关系。结果显示,微球在体内30天内的累积释放量为88.32%,体外加速释药曲线与体内释放数据具有很好的相关性($R^2 = 0.9938$)。Zolnik等^[57]给大鼠分别注射不同分子量(13 K和28 K)的地塞米松微球,按时将包含微球的皮下组织从注射部位取出,利用高效液相色谱分析后计算释药量。体内释放曲线显示,13 K和28 K微球的初始突释量分别约为48%和15%,并分别在释放的第8天和第12天

达平台期, 体内与体外释放百分数也具有相关关系。

4 注射用 PLGA 微球体内外相关性的建立

探究可能的 IVIVC 是寻找药物体内外释放关系的关键。事实上, 一个成功建立的 IVIVC 在微球药物的整个生命周期中都能发挥积极的意义。

4.1 体内外相关性分类

2020 版《中国药典》将体内外相关性归纳为 3 类^[64]: A 级: 体外释放曲线与体内吸收曲线上对应的时间点具有点对点的关系。在 A 级 IVIVC 下, 两条曲线可以重合或通过添加换算因子后重合, 获得的信息量最大; B 级: 应用统计矩原理将体外平均释放时间与体内平均释放时间或平均滞留时间进行比较。不能依靠 B 级 IVIVC 预测血药浓度曲线; C 级: 是特定时间点的释放度(如 $t_{50\%}$ 、4 h 内的释放百分比)与单个药代动力学参数(如 C_{max} 、AUC 或 t_{max})相关联。只能说明部分相关, 缺乏预测能力。

4.2 A 级 IVIVC 建立步骤

A 级 IVIVC 被认为是体外释放度和体内药代动力学数据相关关系最有力的证明。同时, A 级相关也是监管机构认可的用于替代 BE 研究的唯一相关性^[65,66]。所以在微球制剂的研究中只有 A 级相关才有指导体内的实际意义和预测体内释放的能力, 研究人员多致力于 A 级相关性的开发, 对 B 和 C 级别的 IVIVC 研究相对较少。如图 2 所示, 一般微球制剂 A 级 IVIVC 的建立步骤为: ① 选用不少于两种释放速率的处方, 获得体外释放度数据(最少检测 3 个时间点以涵盖释放曲线的早期、中期和晚期)和体内血浆浓度数据。对于释放与条件无关的药物, 可以选择一种速率的处方; ② 对血药浓度-时间曲线选择合适的数据处理方法, 将其转换为体内释放百分比-时间的曲线; ③ 判断各时间点体内释放百分比与对应体外释放百分比的相关程度。通常采用最小二乘法进行线性回归。

IVIVC 必须采用具有不同释放速率(以溶解百分比衡量具有 $\geq 10\%$ 的差异)的处方建立, 以获取更可靠、牢固的体内外相关性, 同时在外部预测能力评估中也可能获得更好的结果^[67]。最终得到的 IVIVC 可以是线性, 也可以是非线性的, 这些结果都可能对药物的释放行为有较好的指示作用^[68-70]。

在创建 IVIVC 时, 有大量数据需要处理, 目前 GastroPlus[®]、Simcyp Simulator[®]和 WinNonlin Phoenix[®]等软件工具可简化繁琐的计算步骤, 被用来快速、准确地得到 IVIVC 模型和预测能力的评估结果^[67]。

4.3 体内释放数据处理方法

体内外相关性的高低既与体外和体内测定的方法有关, 也受体内释放结果处理方法的影响。IVIVC 建

立的关键在于如何从微球的药代动力学数据得到体内释放度与时间的信息。

4.3.1 模型依赖法 传统的依赖于隔室模型的瓦格纳-纳尔逊 (Wagner-Nelson) 法和卢-里格尔曼 (Loo-Riegelman) 法出现较早, 但仍是目前研究体内数据的常用方法^[71]。这两种方法被认为是反卷积法的特例, 与反卷积法的理论依据相同。如果给药后具有明显的一室模型特征, 可利用 Wagner-Nelson 法得到药物体内释放曲线; 如给药后体内的药代动力学符合二室模型特征, 应使用 Loo-Riegelman 法。Shen 等^[29]用直接释药法和流通池法对不同工艺制得的利培酮微球体外释放行为进行测定, 并将家兔实验得到的药时曲线用 Loo-Riegelman 法反卷积, 建立 IVIVC 对药物体内释放参数进行预测。结果得到了 A 级 IVIVC 且模型拟合较好。经过验证, C_{max} 的内部预测性是不确定的, 但外部可预测性符合要求。同时发现利培酮市售制剂 Risperdal[®]的预测与实际 AUC 值差异仅为 0.08%, 证明了建立的 IVIVC 不仅可用于预测处方相同制备工艺不同的利培酮微球的体内性能, 还可用于预测载药量相似但组成不同的微球的体内行为, 以指导微球药物处方或生产工艺的变化。

4.3.2 反卷积法 作为一种推导体内“释放度-时间曲线”的数学方法, 反卷积法支持通过血药浓度-时间曲线得到药物体内释放度数据, 也支持由体内释放度-时间曲线推导血药浓度数据。该法的应用不受模型限制, 适于模型化困难药物的研究, 且拟合结果准确可靠^[72]。Li 等^[73]尝试分别采用反卷积法和基于药代动力学 (pharmacokinetics, PK) 模型的模拟方法得到艾塞那肽双壁微球的 IVIVC, 利用直接释药法得到体外累积释放量, 并从大鼠眼眶静脉中取血分析得出药代动力学参数。结果表明, 通过反卷积和模拟计算得出的微球初始突释分别约为 1.1% 和 1.2%, 得到 A 级 IVIVC 且模型拟合良好(反卷积和模拟方法的 R^2 分别为 0.982 和 0.984)。

4.3.3 其他方法 分数 AUC 法、直接测量法^[67]、基于 PK 模型的模拟方法^[73]等也被提出用于得到体内释放度数据。分数 AUC 法不涉及消除速率常数, 在数据处理上更加简便^[74]。Wang 等^[75]采用恒温水浴振荡法测定 3 种 PLGA 分子量的醋酸戈舍瑞林微球体外的释放行为, 用分数 AUC 法处理药代动力学数据, 并将不同释放速率的微球分别组合, 建立 3 个 IVIVC 模型。结果得到 A 级体内外相关性, 同时对模型的外部预测能力进行评估, 发现预测与实际的累积释放曲线基本重合, 说明建立的 IVIVC 模型具备可预测性。D'Souza 等^[76]对 4 种不同释放速率的奥氮平微球用动态透析法

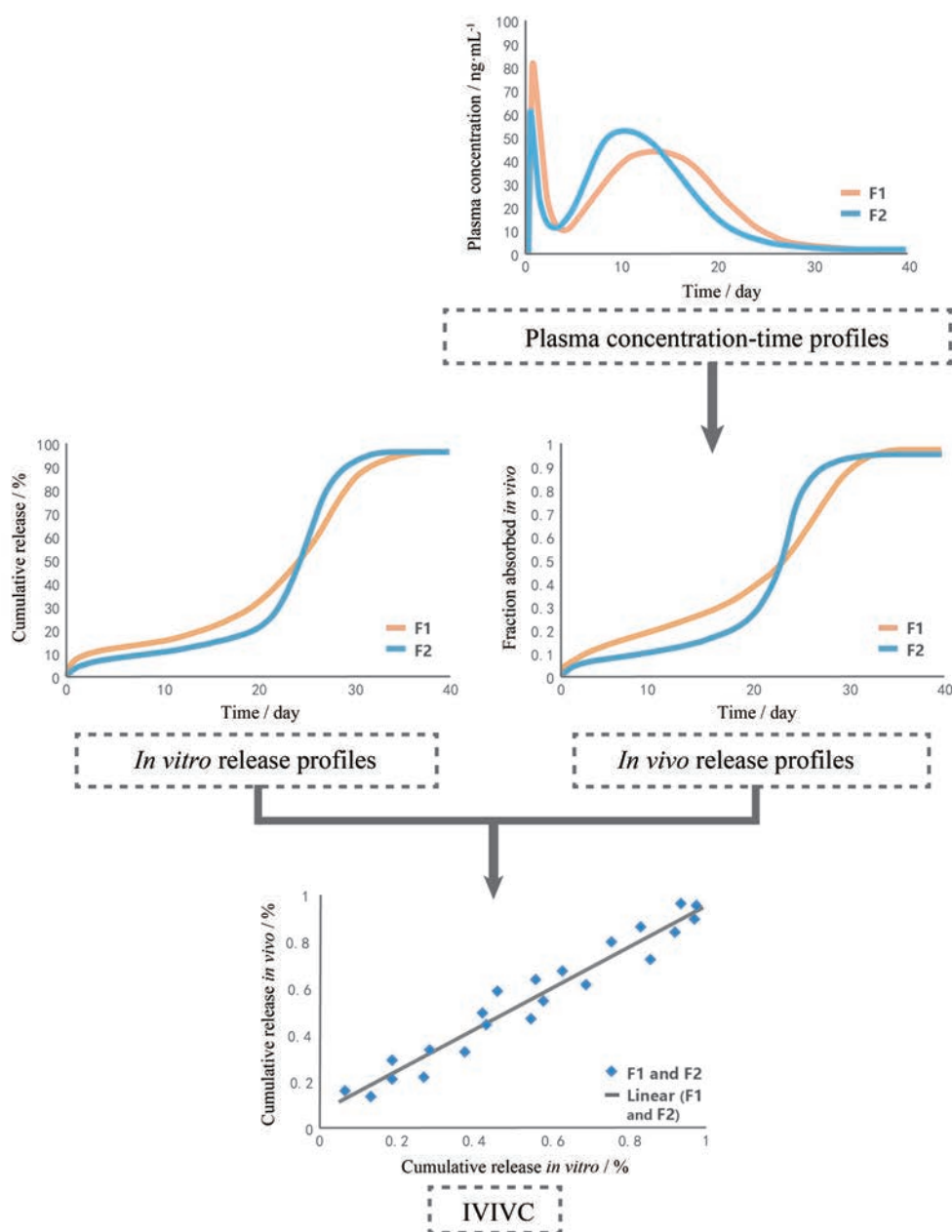


Figure 2 Development of *in vitro-in vivo* correlation of PLGA microspheres. F₁: Formulation 1; F₂: Formulation 2

表征体外释放行为,用 Nelson-Wagner 法和分数 AUC 法处理体内吸收数据,并建立 A 级 IVIVC,发现采用 Nelson-Wagner 法和分数 AUC 法测定 4 种处方的体内释放曲线无明显差异,同时不论是 4 种处方分别建模还是建立 1 个 A 级 IVIVC,这两种方法得到的体内释放曲线都与体外释放行为表现出良好的相关性, R^2 在 0.95 到 0.99 之间。

需要注意的是,IVIVC 仅对当前研究的或相似的药物处方的工作是有效的^[77]。例如,可使用同一 IVIVC 的处方需要与建模使用的处方具有相同的释放机制和给药途径,具有大致相同的生产工艺和处方组

成等。

5 体内外相关性模型的评价

5.1 内部预测能力评估和外部预测能力评估

具备高度的预测能力是建立 IVIVC 的目标^[65,78]。所以,在使用建成的 IVIVC 之前的最后一步是对其预测能力进行评价。证明 IVIVC 模型的可预测性就是将某一体外释放数据通过模型拟合获得体内数据的预测值与观测值进行比较,得到预测误差的百分比 (%PE) 并分析是否超限。评价方法包括内部预测能力评估和外部预测能力评估。

评估内部可预测性是用建模的初始数据进行; 验

证外部可预测性则应用非建模的体外数据。相比较而言,可以知道外部预测能力是更可靠的,因为基于新的数据对IVIVC模型进行评估。通常,除治疗指数窄的药物的模型和仅用两种释放速率处方建立的模型必须进行外部验证外,其他模型经评价确认具有内部预测能力可认为是有效的^[77,78]。

5.2 内、外部预测能力的评估指标

IVIVC通过预测体内生物利用度的误差大小来被评价^[21]。因此,目前将AUC和 C_{\max} 的预测误差百分比作为评估指标。

内部预测能力要求单个处方AUC和 C_{\max} 的%PE $\leq 15\%$,且%PE的绝对平均值不大于10%;如果得到的结果不满足要求,需要进一步评估外部预测能力作为IVIVC是否有效的最终确定。外部可预测性的标准规定AUC和 C_{\max} 的%PE $\leq 10\%$;如%PE在10%~20%之间,还需使用额外数据进行研究;若%PE高于20%,通常表示可预测性不足^[78]。

Andhariya等^[23]制备了4种生产工艺不同的醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate, LA)微球,使用Loo-Riegelman法处理微球的体内药代动力学数据,并将制剂组合建立两个IVIVC模型,同时进行内部和外部预测。结果显示,两个组合都得到了A级体内相关性($r > 0.97$)。IVIVC 1的 C_{\max} 外部%PE符合要求,但AUC的外部%PE为-10.85%,不在规定范围内,说明该IVIVC模型可预测性不足。IVIVC 2的内部AUC平均%PE超限,进而借助外部数据进行验证。外部AUC和 C_{\max} 的%PE分别为1.52%和2.83%,表明IVIVC 2的外部预测能力较好。此外,还研究了IVIVC 2对微球产品Lupron Depot®的预测性。结果AUC和 C_{\max} 的%PE均在可认同范围内,证实建立的IVIVC 2不仅可用于预测成分等效制备工艺不同的LA处方的体内行为,也可对成分不等效的LA制剂进行预测。

若检验结果在可接受范围边缘,那么可以通过重建IVIVC模型、重新进行内外部预测能力评估、更改评估时选用的处方或优化体外释放度的测定过程等方法再次评价^[68]。预测能力的评估是判断建立IVIVC是否成功的唯一准则,相关系数的显著性检验结果较优只能表明在该模型中体内释放行为的相关关系好,并不能代表IVIVC预测能力的高低^[78]。

6 体内相关性在注射用PLGA微球研究中的应用

体内相关性研究正逐渐成为微球制剂开发和监管中关键的一步。目前IVIVC在PLGA微球研究中主要有3方面的应用:生物等效性的替代、释放度质量标准的制定和处方开发的指导^[24]。

在药物开发和监管中常利用BE等指标来验证药

物的一致性^[21,65]。因为药物的BE结果用药代动力学数据表示,所以建立的IVIVC如果被接受,那么就允许体外释放度结果作为复杂耗时的PK研究的替代,既满足研究和监管中对BE的需求,又不需要大量的人体试验^[79,80]。体内研究的减免,不仅可以节约资源,而且加快了新处方合理性验证、新药申请、仿制药开发和生产变更等进程。

释放度是重要的药物特征,可作为定义产品规格、显示批间的变化或一致性、评估制造工艺中任何变化的依据。释放度标准通常是依照进行临床或生物利用度试验批次药物的性质建立^[79]。利用连接体内研究IVIVC制定的释放度标准不仅可以作为质控的工具,还可以被授予体内释放相关性。这样,释放度检查就可以预测体内PK参数,大大降低了通过检验的微球制剂在体内释放出现问题的几率。

处方可以在组成、制造工艺和制造设备等方面进行优化。在最初的处方探索阶段,IVIVC可以体现各种因素的变化对药物释放行为的影响,动物实验的次數被大量地减少,并有益于筛选出更理想的处方。

IVIVC可用来帮助识别与上市药物临床试验结果可能相似的仿制药处方。在Somayaji等^[81]的一项研究中,建立了一种新型A级IVIVC用于筛选仿制药处方。与传统的A级IVIVC创建步骤不同,他们将3种候选处方(1、2和3)的体外释放数据直接与参考上市药物(reference listed drug, RLD)的体内释放相关联,同时假设与RLD相关的曲线斜率接近45°的处方有更高的 R^2 值。结果显示,处方2位于可接受的误差界限内,与RLD数据有较好的相关性,表明利用改进的IVIVC筛选候选的长效微球处方将提高进行BE评估的资格,即进一步对符合体内释放试验的候选仿制药处方进行筛选,可以减少临床试验数量,加速仿制药的开发。

7 结语

负载药物的PLGA微球已经成为缓控释制剂研究的一个主流方向,在临床治疗上拥有很大的优势,极具应用潜力。同时微球也是一种复杂的药物剂型,有很多影响其稳定性的因素,如载药量、包封率和骨架材料等。即使制备时加入等量的药物、聚合物和辅料,生产工艺中的一些微小改变也会在产品特征上体现,因此加倍了药物的评价工作。随着IVIVC的发展,这种局面得到了改善。

另外,体内相关性研究强调了体外释放度的重要性。得到的体外结果被期望尽可能地复制体内释药行为,所以没有准确、重复性好的体外测定方法在一定程度上阻碍了IVIVC的发展。目前看来,微球体外释放度方法仍有很多值得思考的地方,可以从药物释放

机制和仿生溶出系统等方面进行更深入的探讨。

建立IVIVC前,需要评估建模的可行性,正确理解药物的性质和体内药代动力学行为,以及选择可较好预测体内的体外测试条件;建立模型后,也需要对IVIVC的预测能力进行客观的分析。这是一项需要统筹规划的工作,涉及的内容较多,但得到的可靠的体内外相关性结果将积极地推动微球制剂的后续发展。总之,当下研究者努力的方向是在保证药物性能的前提下改革常规程序,减少动物和人体试验,更有效地进行药物的研究和监管。所以,科学的IVIVC对临床前研究中处方的早期筛选和优化、已上市药物的生产扩大或批准后的任何变化都起到了简化的作用,为复杂的评价方法找到了新途径。

可以相信,体内外相关性研究会得到更深入和广泛的探索,将在注射用PLGA微球的整个生命周期中发挥更积极的指导和规范作用。

作者贡献:王珊负责相关文献查阅、文章撰写及修改;花亚冰负责文章撰写及修改;高翔、张慧、刘楠负责文章指导和修改;高静、郑爱萍负责文章选题、指导和校审。

利益冲突:文章涉及内容无任何利益冲突。

References

- [1] Fang L. Pharmaceutics [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016: 319.
- [2] Xu XM, Tao Y, Chen YY, et al. Advanced studies in the preparation techniques of sustained-release microsphere [J]. Prog Mod Biomed (现代生物医学进展), 2017, 17: 3772-3775.
- [3] D'Souza S, Faraj JA, Giovagnoli S. *In vitro* - *in vivo* correlation from lactide-co-glycolide polymeric dosage forms [J]. Prog Biomater, 2014, 3: 131-142.
- [4] Mitra A, Wu YH. Use of *in vitro*-*in vivo* correlation (IVIVC) to facilitate the development of polymer-based controlled release injectable formulation [J]. Recent Pat Drug Deliv Formul, 2010, 4: 94-104.
- [5] Shen J, Burgess DJ. Accelerated *in-vitro* release testing methods for extended-release parenteral dosage forms [J]. J Pharm Pharmacol, 2012, 64: 986-996.
- [6] Wagner JG, Veldkamp W, Long S. Correlation of *in vivo* with *in vitro* disintegration times of enteric coated tablets [J]. J Am Pharm Assoc, 1958, 47: 681-685.
- [7] Zhao YQ, Zhou SH, Liu WJ, et al. Discussion of development and validation of dissolution methods for solid oral dosage forms [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 202-209.
- [8] Gasmı H, Siepmann F, Hamoudi MC, et al. Towards a better understanding of the different release phases from PLGA microparticles: dexamethasone-loaded systems [J]. Int J Pharm, 2016, 514: 189-199.
- [9] Gao Y, Wang X, Wan M, et al. Preparation of chitosan microspheres and its application in drug carriers [J]. J Funct Mater (功能材料), 2015, 46: 2007-2012, 2018.
- [10] Wang F, Tu JS, Zhang JS, et al. Study on initial burst release in PLGA microspheres controlled delivery systems [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2003, 27: 142-146.
- [11] D'Souza S, Faraj J, DeLuca P. Microsphere delivery of risperidone as an alternative to combination therapy [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2013, 85: 631-639.
- [12] Berkland C, Kim K, Pack DW. PLG Microsphere size controls drug release rate through several competing factors [J]. Pharm Res, 2003, 20: 1055-1062.
- [13] Berkland C, Pollauf E, Raman C, et al. Macromolecule release from monodisperse PLG microspheres: control of release rates and investigation of release mechanism [J]. J Pharm Sci, 2007, 96: 1176-1191.
- [14] Wright JC, Burgess DJ. Long Acting Injections and Implants [M]. Boston: Springer, 2012: 167-194.
- [15] Tamani F, Bassand C, Hamoudi MC, et al. Mechanistic explanation of the (up to) 3 release phases of PLGA microparticles: diprophylline dispersions [J]. Int J Pharm, 2019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118819.
- [16] Batycky RP, Hanes J, Langer R, et al. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres [J]. J Pharm Sci, 1997, 86: 1464-1477.
- [17] Tipnis NP, Shen J, Jackson D, et al. Flow-through cell-based *in vitro* release method for triamcinolone acetonide poly (lactico-glycolic) acid microspheres [J]. Int J Pharm, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119130.
- [18] Gao P, Ding PT, Chen DW, et al. Research progress on *in vitro* release characteristics of long-acting microspheres for injection [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2005, 3: 105-108.
- [19] Siepmann J, Elkharraz K, Siepmann F, et al. How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: a quantitative treatment [J]. Biomacromolecules, 2005, 6: 2312-2319.
- [20] Burgess DJ, Crommelin DJA, Hussain AS, et al. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals [J]. Eur J Pharm Sci, 2004, 21: 679-690.
- [21] Marroum P. Role of *in vitro*-*in vivo* correlations in drug development [J]. Dissolution Technol, 2015. DOI: 10.14227/DT220215P50.
- [22] Gao Y, Huang Q, Ma YN. *In vivo*-*in vitro* correlation of extended release oral dosage forms [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2010, 19: 20-24.
- [23] Andhariya JV, Jog R, Shen J, et al. Development of level A *in vitro*-*in vivo* correlations for peptide loaded PLGA microspheres [J]. J Control Release, 2019, 308: 1-13.
- [24] Andhariya JV, Jog R, Shen J, et al. *In vitro*-*in vivo* correlation of parenteral PLGA microspheres: effect of variable burst release

- [J]. *J Control Release*, 2019, 314: 25-37.
- [25] Wang J, Wang BM, Schwendeman SP. Mechanistic evaluation of the glucose-induced reduction in initial burst release of octreotide acetate from poly (*D, L*-lactide-*co*-glycolide) microspheres [J]. *Biomaterials*, 2004, 25: 1919-1927.
- [26] Kakizawa Y, Nishio R, Hirano T, et al. Controlled release of protein drugs from newly developed amphiphilic polymer-based microparticles composed of nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2010, 142: 8-13.
- [27] Wang S, Wu M, Li D, et al. Preparation, characterization and related *in vivo* release, safety and toxicity studies of long acting lanreotide microspheres [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35: 1898-1906.
- [28] Jia R, Wang HJ, Chang J, et al. Preparation and performance of minocycline hydrochloride composite microspheres [J]. *Chin J Conserv Dent (牙体牙髓牙周病学杂志)*, 2010, 20: 382-385.
- [29] Shen J, Choi S, Qu W, et al. *In vitro-in vivo* correlation of parenteral risperidone polymeric microspheres [J]. *J Control Release*, 2015, 218: 2-12.
- [30] Andhariya JV, Choi S, Wang Y, et al. Accelerated *in vitro* release testing method for naltrexone loaded PLGA microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2017, 520: 79-85.
- [31] Zhu C, Peng T, Huang D, et al. Formation mechanism, *in vitro* and *in vivo* evaluation of dimpled exenatide loaded PLGA microparticles prepared by ultra-fine particle processing system [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2019, 20: 64-73.
- [32] Dong N, Zhu C, Jiang J, et al. Development of composite PLGA microspheres containing exenatide-encapsulated lecithin nanoparticles for sustained drug release [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2020, 15: 347-355.
- [33] Shen J, Lee K, Choi S, et al. A reproducible accelerated *in vitro* release testing method for PLGA microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2016, 498: 274-282.
- [34] Guo NZ, Xin ZS, Yang HX. Research progress in quality control of microspheres [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2015, 24: 2115-2121.
- [35] D'Souza SS, Deluca PP. Methods to assess *in vitro* drug release from injectable polymeric particulate systems [J]. *Pharm Res*, 2006, 23: 460-474.
- [36] Murty SB, Goodman J, Thanoo BC, et al. Identification of chemically modified peptide from poly (*D, L*-lactide-*co*-glycolide) microspheres under *in vitro* release conditions [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2003, 4: 392-405.
- [37] Chen Y, Liu ZN, Yi B, et al. Preparation of aspirin sustained-release microsphere and its *in vitro* releasing property [J]. *J Peking Univ (Health Sci) [北京大学学报 (医学版)]*, 2019, 51: 907-912.
- [38] Pervaiz F, Ahmad M, Li LH, et al. Development and characterization of olanzapine loaded poly(lactide-*co*-glycolide) microspheres for depot injection: *in vitro* and *in vivo* release profiles [J]. *Curr Drug Deliv*, 2019, 16: 375-383.
- [39] Kaihara M, Hojo K, Tajiri T, et al. Novel dissolution approach for tacrolimus-loaded microspheres using a dialysis membrane for *in vitro-in vivo* correlation [J]. *Chem Pharm Bull*, 2019, 67: 467-475.
- [40] Bai HJ, Ding Y. Study on the release rate of peptide microsphere preparations [J]. *Tianjin Pharm (天津药学)*, 2014, 26: 57-60.
- [41] McCarthy CA, Faisal W, O'Shea JP, et al. *In vitro* dissolution models for the prediction of *in vivo* performance of an oral mesoporous silica formulation [J]. *J Control Release*, 2017, 250: 86-95.
- [42] Hou PG, Lv CH. Research progress in the application of dissolution test methods of flow cells in China [J]. *Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志)*, 2013, 33: 1971-1974.
- [43] Sun Y. Flow-through cell dissolution test for release control of preparations *in vivo-in vitro* correlation of results and prospect of application [J]. *Tianjin Pharm (天津药学)*, 2010, 22: 53-57.
- [44] Andhariya JV, Burgess DJ. Recent advances in testing of microsphere drug delivery systems [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13: 593-608.
- [45] Tang SF. Research progress on dissolution determination and *in vitro-in vivo* correlation of insoluble drugs in oral solid preparations [J]. *Tianjin Pharm (天津药学)*, 2007, 19: 58-61.
- [46] Rawat A, Burgess DJ. USP apparatus 4 method for *in vitro* release testing of protein loaded microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2011, 409: 178-184.
- [47] Zuo PL, Wang AP, Liu WH. Method for *in vitro* release of rotigotine microspheres [J]. *Chin J Spectrosc Lab (光谱实验室)*, 2011, 28: 2025-2027.
- [48] Lin Y. A summary of *in vitro* accelerated approaches for controlled release parenteral drug delivery system [J]. *Pharm Biotechnol (药物生物技术)*, 2019, 26: 182-185.
- [49] Zolnik BS, Leary PE, Burgess DJ. Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres [J]. *J Control Release*, 2006, 112: 293-300.
- [50] Aso Y, Yoshioka S, Po ALW, et al. Effect of temperature on mechanisms of drug release and matrix degradation of poly(*d, l*-lactide) microspheres [J]. *J Control Release*, 1994, 31: 33-39.
- [51] Gao KP, Chen QH. Research of method for accelerated *in vitro* drug release from poly-estermicrosphere injection [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2009, 18: 614-617, 622.
- [52] Chen YX, Pu YQ, Wang B, et al. Studies on release mechanism *in vitro* and pharmacokinetics *in vivo* of PPD-PLGA microspheres [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2018, 36: 609-612.
- [53] Zolnik BS, Burgess DJ. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release [J]. *J Control Release*, 2007, 122: 338-344.
- [54] Xie XY, Yang Y, Zhang H, et al. An *in vitro* accelerated approach based on *in vivo* release to assess thymopentin release from

- PLGA microspheres [J]. *J Int Pharm Res (国际药学研究杂志)*, 2014, 41: 672-679.
- [55] Hu XQ, Zhang JW, Tang XM, et al. An accelerated release method of risperidone loaded PLGA microspheres with good IVIVC [J]. *Curr Drug Deliv*, 2018, 15: 87-96.
- [56] Martinez M, Rathbone M, Burgess D, et al. *In vitro* and *in vivo* considerations associated with parenteral sustained release products: a review based upon information presented and points expressed at the 2007 Controlled Release Society Annual Meeting [J]. *J Control Release*, 2008, 129: 79-87.
- [57] Zolnik BS, Burgess DJ. Evaluation of *in vivo* - *in vitro* release of dexamethasone from PLGA microspheres [J]. *J Control Release*, 2008, 127: 137-145.
- [58] Ali SAM, Doherty PJ, Williams DF. Molecular biointeractions of biomedical polymers with extracellular exudate and inflammatory cells and their effects on the biocompatibility, *in vivo* [J]. *Biomaterials*, 1994, 15: 779-785.
- [59] Hirota K, Doty AC, Ackermann R, et al. Characterizing release mechanisms of leuprolide acetate-loaded PLGA microspheres for IVIVC development I: *In vitro* evaluation [J]. *J Control Release*, 2016, 244: 302-313.
- [60] Tracy MA, Ward KL, Firouzabadian L, et al. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres *in vivo* and *in vitro* [J]. *Biomaterials*, 1999, 20: 1057-1062.
- [61] Yang ZY, Liu L, Su LL, et al. Design of a zero-order sustained release PLGA microspheres for palonosetron hydrochloride with high encapsulation efficiency [J]. *Int J Pharm*, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.119006.
- [62] Zhang CY, Wang AP, Wang HY, et al. Entecavir-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for long-term therapy of chronic hepatitis-B: preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2019, 560: 27-34.
- [63] Liu C, Mei L, Hu XQ, et al. *In vitro* accelerated release of triptorelin acetate microspheres and the *in vivo/in vitro* correlation [J]. *J Int Pharm Res (国际药学研究杂志)*, 2017, 44: 622-628.
- [64] National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 474.
- [65] Gonzalez MA, Smith DF. Use of IVIVC in the development of oral extended-release formulations: a personal perspective [J]. *Dissolution Technol*, 2015, 22: 35-42.
- [66] Kazi M, Amri RA, Alanazi FK, et al. *In vitro* methods for *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC) for poorly water soluble drugs: lipid based formulation perspective [J]. *Curr Drug Deliv*, 2018, 15: 918-929.
- [67] González-García I, Mangas-Sanjuán V, Merino-Sanjuán M, et al. *In vitro-in vivo* correlations: general concepts, methodologies and regulatory applications [J]. *Drug Dev Commun*, 2015, 41: 1935-1947.
- [68] Buskirk GAV, Shah V, Yacobi A, et al. PQRI workshop report: application of IVIVC in formulation development [J]. *Dissolut Technol*, 2014, 21: 51-58.
- [69] Cardot JM, Beyssac E, Alric M. *In vitro-in vivo* correlation: importance of dissolution in IVIVC [J]. *Dissolut Technol*, 2007, 14: 15-19.
- [70] Emami J. *In vitro-in vivo* correlation: from theory to applications [J]. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2006, 9: 169-189.
- [71] Margolskee A, Darwich AS, Galetin A, et al. Deconvolution and IVIVC: exploring the role of rate-limiting conditions [J]. *AAPS J*, 2016, 18: 321-332.
- [72] Li J, Su Q, Zhao G. Research progress on *in vitro* and *in vivo* correlation of biodegradable microsphere preparations [J]. *Chin Med Biotechnol (中国医药生物技术)*, 2011, 6: 47-49.
- [73] Li XG, Li L, Wang XP, et al. Application of model-based methods to characterize exenatide-loaded double-walled microspheres: *in vivo* release, pharmacokinetic/ pharmacodynamic model, and *in vitro* and *in vivo* correlation [J]. *J Pharm Sci*, 2012, 101: 3946-3961.
- [74] Pu CG, Wang Q, Zhang HJ, et al. *In vitro-in vivo* relationship of amorphous insoluble API (progesterone) in PLGA microspheres [J]. *Pharm Res*, 2017, 34: 2787-2797.
- [75] Wang MD, Xue Y, Leng GY, et al. *In vitro-in vivo* correlation of goserelin acetate microspheres [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 159-165.
- [76] D'Souza S, Faraj JA, Giovagnoli S, et al. IVIVC from long acting olanzapine microspheres [J]. *Int J Biomater*, 2014. DOI: 10.1155/2014/407065.
- [77] Cardot JM, Tomic I. *In vitro in vivo* correlation basis and application to slow release injectable formulation, a review [J]. *Farmacia*, 2015, 63: 781-791.
- [78] Huang Q, Ma YN. *In vitro* and *in vivo* correlation of drugs from the perspective of technical review [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学)*, 2007, 12: 961-964.
- [79] FDA. Guidance for Industry: Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation and Application of *In Vitro/In Vivo* Correlations [S]. US: Center for Drug Evaluation and Research, 1997.
- [80] Shen J, Burgess DJ. *In vitro-in vivo* correlation for complex non-oral drug products: where do we stand? [J]. *J Control Release*, 2015, 219: 644-651.
- [81] Somayaji MR, Das D, Przekwas A. A new level A type IVIVC for the rational design of clinical trials toward regulatory approval of generic polymeric long-acting injectables [J]. *Clin Pharmacokinetics*, 2016, 55: 1179-1190.