PLGA 微球用于蛋白/多肽类药物缓释递送的优化策略

郭作娟[1]，梁荣财[1,2]*

（1. 烟台大学药学院，新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心，分子药理和药物评价教育部重点实验室（烟台大学），山东烟台 264005；2. 山东绿叶制药有限公司，长效和靶向制剂国家重点实验室，山东烟台 264003）

摘要：传统的蛋白 / 多肽类药物微球存在突释、迟滞释放和不完全释放等缺陷，而利用可生物降解的聚丙交酯 - 乙交酯（PLGA）微球递送蛋白 / 多肽类药物能实现缓释给药，提高患者依从性。该文首先分析了影响微球释药性能的各种因素，然后从载体材料和制备工艺方面总结了多种改进策略，特别是对乳化溶剂挥发法中内水相的改造方法。此外，还介绍了微流控、超临界流体和自愈包封等新制备技术的应用，以及核壳结构微球控释系统的发展，以期为蛋白 / 多肽类药物微球的制备提供新思路。

关键词：微球；PLGA；蛋白；多肽；核壳结构

中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)03-0312-08

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.03.003

Optimization Strategy of PLGA Microspheres for Sustained-release Delivery of Protein/Polypeptide Drugs

GUO Zuojuan[1], LIANG Rongcai[1,2]*

(*1. Key Lab. of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005; 2. State Key Lab. of Long-Acting and Targeting Drug Delivery System, Shandong Luye Pharmaceutical Co., Ltd., Yantai 264003*)

ABSTRACT: Traditional microspheres loaded with protein/polypeptide drugs have some shortcomings, such as burst release, delayed release, and incomplete release of protein/peptide drugs. However, microspheres with poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) as carriers can achieve sustained release delivery of protein/polypeptide drugs and improve patient compliance. This paper analyzes the various factors that affect drug release performance of microspheres, and summarizes a variety of improvement strategies from the aspects of carrier materials and preparation technology, especially the remolding methods on the internal water phase in the emulsion-solvent evaporation method. Besides, the application of new technology, such as microfluidic, supercritical fluid, self-healing encapsulation, and the development of core-shell microspheres controlled-release drug delivery systems are also introduced to provide new ideas for the preparation of protein/polypeptide microspheres.

Key Words: microsphere; PLGA; protein; polypeptide; core-shell structure

蛋白质 / 多肽药物是由氨基酸组成的具有生物活性的分子，与受体结合力强，不良反应小[1]；拥有广阔的市场，在 2021 年全球市场达到 2 650 亿美元[2]。然而，蛋白 / 多肽类药物相对分子质量较大，且由于水解、酶解和药物表面电荷作用，胃肠道穿透性和稳定性较差、半衰期短，所以大多需要频繁注射，增加了患者的痛苦[3—4]。因此，研究者一直致力于蛋白 / 多肽类药物长效化的研究。其中，通过改变剂型实现长效化给药可减少成本、缩短药物开发周期[4]，是长效化研究的重要方向。

微球能实现蛋白 / 多肽药物的靶向和口服给药，

收稿日期：2022-07-08

作者简介：郭作娟（1996—），女，硕士研究生，专业方向：工业药学。

通信作者：梁荣财（1972—），男，副教授，博士，从事长效缓控释微球制剂研究与开发。

E-mail：liangrongcai@luye.com

并且通过载体材料和制备工艺的选择，还能控制药物的释放时长和释放行为，因而得到广泛应用[5—6]。利用可生物降解材料为载体制备的微球产品，在体内可实现长达几个月的释放，显著减少给药频率，提高患者依从性。然而，蛋白 / 多肽类药物微球制剂开发的主要障碍在于，因蛋白 / 多肽类药物的不稳定性、亲水性和较大尺寸，其微球制剂易出现突释、滞后释放、释放不完全和活性丧失等现象，导致血药浓度波动，从而间接或直接引起不良反应[7]。本综述总结了蛋白 / 多肽类药物微球制剂开发的影响因素，并从载体材料和制备工艺上综述了各种改进策略，以期为蛋白 / 多肽类药物微球产品的开发提供新思路。

1 存在的障碍

1.1 突释

药物从聚丙交酯 - 乙交酯（PLGA）微球中的释放会受到 PLGA 的吸水、水解、侵蚀以及药物与水的扩散等多种因素的共同影响[8—9]。因此，微球中药物的释放通常会经历突释、释放滞后和快速释放的过程[9—10]。药物的突释除了受以上因素影响外，还与微球粒径、聚合物相对分子质量、孔隙率、药物性质、干燥方式等因素有关[8,11]。突释不仅会引起血药浓度的波动，而且药物过度释放可能会导致血药浓度超过治疗窗，引发严重不良反应。此外，大量药物在初期释放也会缩短药物疗效的整体持续时间[8]。

1.2 滞后期

滞后是指药物从制剂中缓慢释放或完全不释放的现象，通常在突释或最初释放后的一段时间出现。推测滞后出现的原因是聚合物链过度缠结，形成了玻璃态，因而呈现出高流动性和低吸水性的特点，导致聚合物微球中的扩散孔道减少，药物释放困难[12]。PLGA 的相对分子质量越高、疏水性越强，则溶液渗透进入聚合物的速率越慢，因此滞后期会更长，此时可通过增加微球中的孔道以缩短滞后期[13]。

1.3 不完全释放

微球中的蛋白 / 多肽类药物释放不完全是普遍存在的现象，主要与蛋白 / 多肽类药物的降解、构象改变与聚集以及载体材料的吸附有关。

1.3.1 蛋白 / 多肽类药物的降解、构象改变与聚集

蛋白 / 多肽类药物的稳定性易受外界环境影响，制备过程中的剪切应力、界面应力[14]、脱水应力[15]等都会导致其降解，影响活性。当蛋白 / 多肽类药物暴露于油 / 水或水 / 空气界面，或与交联剂接触时，其构象都有可能发生变化，并自发聚集。据报道[16—17]，分子间具有反向平行 β- 折叠片段的多肽和蛋白质易在油 / 水界面聚集，进而导致药物疗效降低、引发抗体反应等后果。例如，用来治疗贫血的促红细胞生成素在微球化过程中易形成导致贫血的聚集体，治疗药物反而转变为致病因素[18]。为了抑制聚集，微球制备过程中可使用稳定剂或较亲水的油相、采用水包油包固（S/O/W）乳化法等[16,18]。

1.3.2 与载体材料的吸附和酰化

蛋白 / 多肽会通过非特异性吸附和离子相互作用与已降解或未降解的聚合物结合，从而导致药物释放不完全[14]。多肽会与 PLGA 或其降解产物发生酰化副反应，形成肽 -PLGA 肽酰加合物[19]。据报道[20]，在 PLGA 中加入 Ca^{2+}、Mn^{2+} 等二价阳离子，可竞争性抑制多肽与 PLGA 的吸附反应。

2 载体材料的修饰

PLGA 因优异的机械强度、生物相容性，被美国 FDA 批准用于蛋白 / 多肽类药物微球的制备[21]，但其固有的疏水性不利于与细胞相互作用。此外，PLGA 降解产生的乳酸也会诱发炎症反应，并影响蛋白 / 多肽类药物的稳定性[22]。因此，通过修饰来改善 PLGA 的疏水性，可以提高药物递送效率。

2.1 共聚修饰

通过与其他高分子聚合，PLGA 的结构和性质会发生改变，有可能满足不同的释药需求[23]。不过这类聚合物载体的代谢途径、载体与药物之间的相互作用机制尚不明确，需要进一步研究。

例如，PLGA 可以同聚乙二醇（PEG）、泊洛沙姆等亲水性材料共聚，形成二嵌段、三嵌段等线性或非线性的多嵌段共聚物，极性片段的增加可增强共聚物的亲水性，有利于维持蛋白 / 多肽类药物的稳定性[24—25]。PLGA 也可同聚己内酯（PCL）等疏

水性材料共聚，己内酯单元的引入能降低聚合物主链受到酸性降解产物影响的程度[26]。与 PLGA 微球相比，引入己内酯单元的共聚物微球释放周期更长，且释药速率可控。

2.2　共混修饰

相较于通过共聚反应形成新的共聚物，将 PLGA 与其他材料混合来制备微球就简便得多。环糊精、壳聚糖、聚乙烯亚胺等亲水性材料，可作为外源性致孔剂与 PLGA 共混，以调节微球的释放[27]。此外，不同相对分子质量、不同规格的 PLGA 混合后也可制备微球[12]。低分子 PLGA 会在释放阶段快速降解，产生并累积的酸性降解产物可作为内源性致孔剂，加速高分子 PLGA 的降解。

3　制备技术的改进

乳化溶剂挥发法是蛋白 / 多肽类药物微球制备的常用方法。蛋白 / 多肽类药物可溶于水溶液中作为内水相（W_1），也可以固体粉末的形式作为内固相（S）；再将 W_1 或 S 与溶有 PLGA 的油相经均质形成初乳；所得初乳在高速剪切下注入到外水相中，就能形成 $W_1/O/W_2$ 型或 S/O/W 型复乳，最终挥除有机溶剂、固化得到微球[5,21]。但在制备过程中，蛋白 / 多肽易受油 / 水界面和剪切力的影响，因此可考虑采取将蛋白 / 多肽预先包封的策略。

3.1　内水相凝胶

有研究[28]报道亲和水凝胶能以恒定速度释放蛋白类药物。在微球制备过程中使用载药的温敏凝胶（低于胶凝温度时，温敏凝胶以胶束形式包裹药物；高于胶凝温度时，分子链间相互缠结形成凝胶）作为内水相不仅可以避免有机溶剂和剧烈剪切等恶劣环境对蛋白 / 多肽类药物的破坏，还可增加内水相黏度，防止药物泄漏[29]。QI 等[30]在制备戈舍瑞林（GOS）微球时采用由泊洛沙姆凝胶组成的内水相，由于黏度增加，包封率得以提高。在释放的初始阶段，水渗入微球并扩散到内水相，冻干的凝胶与水接触并重组为凝胶，黏稠的水凝胶阻滞了 GOS 的扩散，减缓了突释效应。与内水相不含凝胶的微球相比，该凝胶微球的整体释放速率减慢，释放时长由 60 d 延长至 110 d，且圆二色谱法结果显示释放的 GOS 构象基本没有变化，活性保持良好。但在凝胶和 PLGA 的双重作用下，微球的滞后期延长；在内水相添加乙酸能加快 PLGA 降解，从而抵消这一作用。

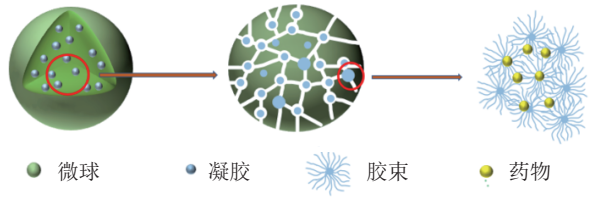


图 1　内水相凝胶微球的结构示意图[30]

Fig.1　Schematic Structure of Internal Aqueous Gel Microspheres[30]

3.2　内水相脂质体

脂质体具有高度的生物相容性、表面可修饰性，但脂质体膜较易破裂。有研究[31—32]将脂质体包裹在坚硬的 PLGA 微球中，构建了新型药物递送系统脂质体微球（liposomes-in-microspheres，LIM），实现了二者的优势互补，被认为在保护蛋白 / 多肽类药物生物活性、促进靶向递送等方面拥有良好前景。GUO 等[33]采用薄膜 - 挤压法制备了载有普萘洛尔和表面修饰 CD133 适配体的单层脂质体，将其与壳聚糖水溶液混合，使脂质体表面包覆壳聚糖层，然后将其作为内水相，采用 $W_1/O/W_2$ 型乳化法制备 LIM。结果表明，该微球体系可实现普萘洛尔的靶向、缓慢释放。

进一步研究显示，LIM 中药物的释放机制受到脂质体和微球的双重控制：释放初期，微球中的脂质体通过孔道扩散，脂质体尺寸越大，扩散速率越慢；之后随着聚合物基质的降解，水溶性通道扩张，脂质体持续释放；最后是药物从脂质体中的释放[32—33]。考虑到 $W_1/O/W_2$ 型乳化法制备过程中超声对脂质体完整性的不利影响，LIM 的乳化一般采用温和的涡旋混合法，同时材料也会选择更加亲水的 PLGA-PEG-PLGA 和乙酸乙酯[31]。

3.3　内水相胶束

胶束在溶液中可自组装形成核壳结构，将蛋白

质包裹在胶束中能增强其稳定性[34]。WANG 等[35]合成了具有生物可降解性的胆酸 -PLGA-*b*-（聚乙烯亚胺 - 聚乙二醇）[CA-PLGA-*b*-(PEI-PEG)] 的共聚物，该共聚物能自组装形成阳离子胶束，并可通过静电作用装载胰岛素。再将该胰岛素胶束作为内水相，通过 $W_1/O/W_2$ 型乳化法制备微球。与不含胶束的胰岛素微球相比，该胰岛素胶束微球的突释降低、生物利用度提高、降糖作用更持久，且胶束的质子缓冲能力可保护胰岛素免受 PLGA 降解所引起的酸性微环境的影响。

3.4 内固相固体分散体

在固体分散体中，药物能以无定形、分子或微晶形式存在，并保持高度分散状态[36]。REN 等[37]采用热熔挤出法制备了含 GOS 的 PLGA 固体分散体，然后将该固体分散体与空白 PLGA 混合，再溶于二氯甲烷（DCM）形成油相。这种方法制得的油相澄清，而且直接将 GOS 与 PLGA 的物理混合物溶于油相中，会出现 GOS 聚集的现象。分子动力学模拟结果表明，以固体分散体为内固相制得的微球中，GOS、PLGA、DCM 之间没有相互作用，GOS 的空间结构和生物活性得以保留。相较于 S/O/W 型乳化法制备的普通微球，该固体分散体微球生物利用度提高、突释效应减弱。

3.5 内固相冻干复合物

蛋白 / 多肽类药物还可与其他分子混合后冻干，形成复合物。据报道[38]，将 GOS 与泊洛沙姆或 PEG 共同溶解并冷冻干燥，再将冻干复合物作为内固相制备微球，可大幅提高 GOS 的包封率和生物利用度。陈卫等[39]利用溶剂沉淀的方式制备醋酸奥曲肽和葡聚糖硫酸钠（DSS）的离子对复合物，经冷冻干燥后作为内固相，制备成微球。结果显示，该微球的药物包封率较高，原因可能是药物与 DSS 络合形成的离子对复合物具有疏水性，逆转了奥曲肽的高水溶性，防止药物在制备过程中泄露。此外，离子对复合物在纯水中几乎不会解离，而处于生理状态下的反离子溶液中则可完全解离，不会影响药物释放。

3.6 有机溶剂的选择

微球快速固化有助于提高药物的包封率，缩短蛋白 / 多肽类药物与油 / 水界面的接触，减少药物活性的损失，因此建议采用高挥发性的有机溶剂[17]。DCM 易挥发，对 PLGA 有良好的溶解能力，被广泛用于制备微球；但 DCM 有致癌性，在制备中应严格控制残留量。乙酸乙酯毒性较低，被认为是 DCM 的替代品；但乙酸乙酯对 PLGA 的溶解能力较弱，可能会形成 PLGA 纤维状聚集体，造成包封率降低[40]。SHIM 等[41]认为甲酸乙酯也可以作为 DCM 的代替品，且使用效果优于乙酸乙酯。甲酸乙酯毒性低，相较于乙酸乙酯有更低的沸点和更高的水溶性，可有效去除滞留在乳液中的溶剂。然而，基于乙酸乙酯和甲酸乙酯制备的微球会出现塌陷情况。SHIM 等[41]认为这可能是由于它们具有高水溶性，乳化时会从油相中迅速扩散到外水相，使聚合物形成凝聚体而不是乳滴。针对这一情况，他们采取了预固化的方式，即形成初乳后先加入少量的外水相形成半固体乳滴，然后将其转入大量的外水相中至完全固化。这种策略有助于抑制有机溶剂迅速扩散到外水相，能制得表面光滑的球形微球。

3.7 外水相的修饰

一般，外水相渗透压升高会抑制水扩散进入微球内部，同时也能阻碍药物向外水相扩散，减少微球内孔道的形成，从而使制品具有较高的包封率和光滑无孔的表面。蛋白 / 多肽类药物在等电点时溶解度低，可根据这一特征来调节外水相的 pH 值。ZHANG 等[42]在制备醋酸曲普瑞林微球的外水相中添加了乙酸钠，观察到包封率从 16%增加到 63%，包封效果优于加入氯化钠的方法：推测除了 pH 值的影响，乙酸根离子的同离子效应进一步降低了药物在外水相的溶解度。

4 制备新技术

4.1 微流控技术

乳化溶剂挥发和喷雾干燥制备的微球粒径不均匀，需要进一步筛分，而微流控技术则可实现对多种流体的精确控制，得到粒径均匀、变异系数小、结构可调的微球[43]。在大规模生产中，微流控技术的重现性良好，但生产效率较难满足需求，目前主要用于实验室研究[5,16]。微流控技术所得的微球粒径均一、释放较集中，可用于脉冲给药。VAN

DER KOOIJ 等[44]利用这一特点开发了疫苗助推剂，以避免疫苗需要多次注射的缺陷。结果显示，微球在释药前期是基本无药物释放的滞后期，3 周后出现集中的大量释放，且可通过调节 PLGA 单体的比例，将滞后期控制在 3 ～ 7 周。

4.2　超临界流体（SCF）技术

微球的制备通常需要较长时间的相态转变，以去除有机溶剂，而较慢的溶剂去除速度可能会导致药物扩散至外水相，使药物聚集在微球表面，造成突释和低包封率。SCF 技术具有高效的传质能力，能快速去除有机溶剂，过程温和，无需加热，有机溶剂残留量低[45]，可有效改善上述问题。KAMALI 等[46]对使用乳化溶剂挥发法制备的利培酮微球进行 SCF 技术处理后，DCM 含量从 4 612 μg/mL 降至 <21.93 μg/mL，且孔隙率提高，药物在基质中的分布更均匀。由于过程温和，SCF 被认为是生物药物微球化的首选方法，发展前景优良，但因较高的成本和复杂的工艺条件，商业化进程较慢[45]。

4.3　自愈包封技术

自愈包封是指将预先制备的空白多孔微球与药物溶液混合，使药物自发扩散进入微球内部，然后升高温度到聚合物的玻璃化转变温度之上或使用封闭溶剂将微球的孔道闭合[47—48]（图 2）。自愈包封能够减小蛋白 / 多肽类药物受到剪切应力和暴露于油 / 水界面的影响，而且装载药物之前，可对微球进行灭菌，以避免蛋白 / 多肽类药物暴露于灭菌过程而丧失活性[47]。因此自愈包封技术对敏感的生物分子十分友好，制备工艺也较为简单，唯一的不足就是负载量偏低。但通过调控微球孔隙率、开 / 闭孔情况、药物溶液浓度、封闭条件等工艺参数也可达到较好的包封效果。有研究[48]表明，空白湿微球有更好的负载量，相较于干微球 15.1 μg/mg 的负载量，湿微球可达 68 μg/mg。

5　核壳双控释系统

5.1　核壳结构微球

普通微球只有单层聚合物包裹药物，而具有核壳结构的微球是在单层聚合物的核心外再包裹一层聚合物，形成明显的核壳结构，能减少突释，实现

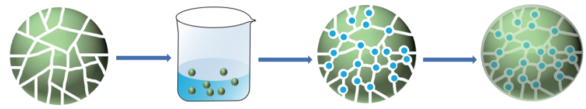
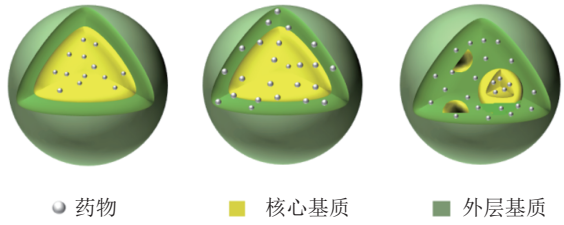


图 2　自愈包封过程示意图

Fig.2　Schematic Diagram of Self-healing Encapsulation Process

脉冲释药和双重药物负载，装载或未装载药物的壳层可以包裹一个或多个核心[49—50]，其结构如图 3 所示。$W_1/O_1/O_2/W_2$ 型乳化法[50]、$S/O_1/O_2/W$ 型乳化法[51]、电喷雾法[52]、微流控技术[53]等都可制备具有核壳结构的微球。XIA 等[54]还通过相分离和微流控技术制备了层数可控的多层微球，内相为聚乙二醇二丙烯酸酯 700（PEGDA 700）、PEGDA 250 和海藻酸钠水溶液组成的相分离体系，外相为聚乙烯醇水溶液，当内相液滴与外相接触而形成乳滴时，PEGDA 700 会迅速从乳滴内转移到外部水相，发生传质诱导的相分离，形成具有一层、两层和三层结构的液滴。在相分离的不同阶段，可通过紫外光固化形成层数不同的固体微球，层数越多、释放速率越慢。



A—药物仅分布在核中；B—药物分布在核和外层基质中；C—药物分布在核、外层基质中，且外层基质中包封了多个内核。

图 3　不同核壳结构的微球

Fig.3　Microspheres with Different Core-shell Structures

5.2　微球 - 凝胶复合系统

微球可分散在温敏凝胶中形成一种复合体系。温敏凝胶在常温下具有良好的流动性，不影响注射，在体温下则可形成具有缓释功能的凝胶，阻滞微球表面药物的释放，减少突释。在滞后期，凝胶骨架中截留的药物仍可持续释放，抵消一部分滞后期无

药物释放的影响，释放时长也可通过调节 PLGA 的相对分子质量来控制[55]。因为水凝胶具有稳定的流变性、生物相容性、组织黏附性等优异性能，所以非常适合用于伤口处理和组织工程材料，微球-凝胶也有同样的应用前景[56]。

6 总结与展望

虽然蛋白 / 多肽类药物微球面临药物释放、活性保持等诸多挑战，但研究表明，通过对载体材料的修饰和制备工艺的改进，微球可实现更好的调控释放，甚至是零级释放，蛋白 / 多肽类药物的活性也能更好地保留，具有核壳结构的微球还可根据壳层的数量和性质实现对药物释放速率的控制。近年来，微流控、超临界流体、自愈包封等新技术在蛋白 / 多肽类药物微球的制备中也表现出良好的应用前景。值得注意的是，这些策略不能一概而论，具体开发时还需要综合考虑药物、载体材料、制备技术、工艺参数等多方面，以满足临床使用需求。

参考文献：

[1] 庞丽然, 贺 丞, 魏敬双, 等. 蛋白多肽类药物长效化技术研究策略[J]. 生物技术进展, 2021, **11**(3): 304-310.

[2] BUSINESS WIRE. Global protein drugs market (2021 to 2026) - featuring Abbvie, Amgen and CSL among others [R/OL]. (2021-08-24)[2022-05-01]. https://www.businesswire.com/news/home/20210824005462/en/Global-Protein-Drugs-Market-2021-to-2026---Featuring-Abbvie-Amgen-and-CSL-Among-Others---ResearchAndMarkets.com.

[3] BROWN T D, WHITEHEAD K A, MITRAGOTRI S. Materials for oral delivery of proteins and peptides [J]. *Nat Rev Mater*, 2020, **5**(2): 127-148.

[4] IBEANU N, EGBU R, ONYEKURU L, *et al*. Injectables and depots to prolong drug action of proteins and peptides [J]. *Pharmaceutics*, 2020, **12**(10): 999.

[5] 李 想, 孙考祥, 李又欣. 长效微球制剂产业化研究进展[J]. 中国药学杂志, 2019, **54**(21): 1729-1733.

[6] WONG C Y, AL-SALAMI H, DASS C R. Microparticles, microcapsules and microspheres: a review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin [J]. *Int J Pharm*, 2018, **537**(1/2): 223-244.

[7] ANDHARIYA J V, 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.

[8] YOO J, WON Y Y. Phenomenology of the initial burst release of drugs from PLGA microparticles [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, **6**(11): 6053-6062.

[9] LI T H, CHANDRASHEKAR A, BEIG A, *et al*. Characterization of attributes and *in vitro* performance of exenatide-loaded PLGA long-acting release microspheres [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2021, **158**: 401-409.

[10] LIU J W, REN H, XU Y, *et al*. Mechanistic evaluation of the opposite effects on initial burst induced by two similar hydrophilic additives from octreotide acetateeloaded PLGA microspheres [J]. *J Pharm Sci*, 2019, **108**(7): 2367-2376.

[11] WU Z Y, ZHAO M Q, ZHANG W, *et al*. Influence of drying processes on the structures, morphology and *in vitro* release profiles of risperidone-loaded PLGA microspheres [J]. *J Microencapsul*, 2019, **36**(1): 21-31.

[12] XIAO P F, QI P, CHEN J, *et al*. The effect of polymer blends on initial release regulation and *in vitro-in vivo* relationship of peptides loaded PLGA-hydrogel microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2020, **591**: 119964.

[13] WANG T T, XUE P, WANG A P, *et al*. Pore change during degradation of octreotide acetate-loaded PLGA microspheres: the effect of polymer blends [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, **138**: 104990.

[14] PARK H, HA E S, KIM M S. Complexation of exenatide and cyclodextrin: an approach for the stabilization and sustained release of exenatide in PLGA microsphere [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, **266**: 1-10.

[15] ARSICCIO A, PISANO R. Stability of proteins in carbohydrates and other additives during freezing: the human growth hormone as a case study [J]. *J PHYS CHEM B*, 2017, **121**(37): 8652-8660.

[16] ZHANG C Q, YANG L, WAN F, *et al*. Quality by design thinking in the development of long-acting injectable PLGA/PLA-based microspheres for peptide and protein drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2020, **585**: 119441.

[17] SVILENOV H, WINTER G. The ReFOLD assay for protein formulation studies and prediction of protein aggregation during long-term storage [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, **137**: 131-139.

[18] GENG Y, YUAN W E, WU F, *et al*. Formulating erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation [J]. *J Control Release*, 2008, **130**(3): 259-265.

[19] GUO N Z, ZHANG Q, SUN Y, *et al*. Separation and identification of acylated leuprorelin inside PLGA microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2019, **560**: 273-281.

[20] LIU J W, XU Y, WANG Y L, *et al*. Proton oriented-"smart depot" for responsive release of Ca^{2+} to inhibit peptide acylation in PLGA microspheres [J]. *Pharm Res*, 2019, **36**(8): 119.

[21] YANG Y Y, CHEN Q L, LIN J Y, *et al*. Recent advance in polymer based microspheric systems for controlled protein and peptide delivery [J]. *Curr Med Chem*, 2019, **26**(13): 2285-2296.

[22] LING B S, HAMID Z A, JAAFAR M, *et al*. Approaches to improve therapeutic efficacy of biodegradable PLA/PLGA microspheres: a review [J]. *Polym Rev*, 2018, **58**(3): 495-536.

[23] 张文君, 王　晴, 吴梦婷, 等. 聚合物 PEG-PLGA 在纳米给药系统中的应用研究进展[J]. 药学研究, 2019, **38**(9): 532-538.

[24] 余勇波, 唐　健, 张桂龙, 等. 载 *BDNF* 基因 PEG-PLGA 纳米微球的制备及其转染外源性神经干细胞的研究[J]. 临床神经外科杂志, 2019, **16**(2): 109-114.

[25] RMAIDI A, ZELZER M, SINDJI L, *et al*. Impact of the physico-chemical properties of polymeric microspheres functionalized with cell adhesion molecules on the behavior of mesenchymal stromal cells [J]. *Mater Sci Eng C*, 2021, **121**: 111852.

[26] YI M L, ZHOU Z H, LIU W J, *et al*. *In vitro* degradation behaviors of poly(L-lactide-*co*-glycolide-*co*-ε-caprolactone) microspheres [J]. *J Macromol Sci Part B*, 2021, **60**(7): 521-529.

[27] 冯世森, 王文喜, 郑彩虹. PLGA 微球的修饰及其应用[J]. 中国现代应用药学, 2016, **33**(6): 830-836.

[28] ABUNE L, WANG Y. Affinity hydrogels for protein delivery [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2021, **42**(4): 300-312.

[29] LIU Z X, BU R X, ZHAO L X, *et al*. Hydrogel-containing PLGA microspheres of palonosetron hydrochloride for achieving dual-depot sustained release [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2021, **65**: 102775.

[30] QI P, BU R X, ZHANG H, *et al*. Goserelin acetate loaded poloxamer hydrogel in PLGA microspheres: core-shell Di-depot intramuscular sustained release delivery system [J]. *Mol Pharm*, 2019, **16**(8): 3502-3513.

[31] ZHU X S, GUO X N, LIU D K, *et al*. Significant inhibition of infantile hemangioma growth by sustained delivery of urea from liposomes-in-microspheres [J]. *Oncol Rep*, 2018, **39**(1): 109-118.

[32] FENG S S, RUAN G, LI Q T. Fabrication and characterizations of a novel drug delivery device liposomes-in-microsphere(LIM) [J]. *Biomaterials*, 2004, **25**(21): 5181-5189.

[33] GUO X N, DONG C X, LIU Q Y, *et al*. The sustained and targeted treatment of hemangiomas by propranolol-loaded CD133 aptamers conjugated liposomes-in-microsphere [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, **114**: 108823.

[34] TAO A Q, HUANG G L, IGARASHI K, *et al*. Polymeric micelles loading proteins through concurrent ion complexation and pH-cleavable covalent bonding for *in vivo* delivery [J]. *Macromol Biosci*, 2020, **20**(1): e1900161.

[35] WANG J, LI S Y, CHEN T T, *et al*. Nanoscale cationic micelles of amphiphilic copolymers based on star-shaped PLGA and PEI cross-linked PEG for protein delivery application [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2019, **30**(8): 93.

[36] 孙嘉慧, 唐　海, 杨美青, 等. 固体分散体技术提高难溶性药物溶解度研究进展[J]. 化工与医药工程, 2021, **42**(5): 38-43.

[37] REN T Y, CHEN J, QI P, *et al*. Goserelin/PLGA solid dispersion used to prepare long-acting microspheres with reduced initial release and reduced fluctuation of drug serum concentration *in vivo* [J]. *Int J Pharm*, 2022, **615**: 121474.

[38] SUN W, ZHANG X M, WANG T, *et al*. Pharmaceutical compositions of goserelin sustained release microspheres: US, 10258572B2 [P]. 2018-02-08.

[39] 陈　卫, 刘吉伟, 李学明. 高水溶性药物在微球制备工艺中关键工艺的优化[J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(5): 669-676.

[40] BUTREDDY A, GADDAM R P, KOMMINENI N, *et al*. PLGA/PLA-based long-acting injectable depot microspheres in clinical use: production and characterization overview for protein/peptide delivery [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(16): 8884.

[41] SHIM H, SAH H. Qualification of non-halogenated organic solvents applied to microsphere manufacturing process [J]. *Pharmaceutics*, 2020, **12**(5): 425.

[42] ZHANG C Q, WU L, TAO A J, *et al*. Formulation and *in vitro* characterization of long-acting PLGA injectable microspheres encapsulating a peptide analog of LHRH [J]. *J Mater Sci Technol*, 2021, **63**: 133-144.

[43] SHEVCHENKO N, PANKOVA G, IAKOBSON O, *et al*. Microfluidic synthesis of monodisperse porous polystyrene microspheres for sorption of bovine serum albumin [J]. *J Microencapsul*, 2020, **37**(6): 457-465.

[44] VAN DER KOOIJ R S, STEENDAM R, ZUIDEMA J, *et al*. Microfluidic production of polymeric core-shell microspheres for the delayed pulsatile release of bovine serum albumin as a model antigen [J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(11): 1845.

[45] PARK H, KIM J S, KIM S, *et al*. Pharmaceutical applications of supercritical fluid extraction of emulsions for micro-/nanoparticle formation [J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(11): 1928.

[46] KAMALI H, ATAMANESH M, KAFFASH E, *et al*. Elimination of residual solvent from PLGA microspheres containing risperidone using supercritical carbon dioxide [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2020, **57**: 101702.

[47] SCHEINER K C, MAAS-BAKKER R F, VAN STEENBERGEN M J, *et al*. Post-loading of proangiogenic growth factors in PLGA microspheres [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2021, **158**: 1-10.

[48] KIM Y, SAH H. Protein loading into spongelike PLGA microspheres [J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(2): 137.

[49] VAN DER KOOIJ R S, STEENDAM R, FRIJLINK H W, *et al*. An overview of the production methods for core-shell microspheres for parenteral controlled drug delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022, **170**: 24-42.

[50] 王晓丹, 景晓燕, 李茹民. 负载双抗癌药的双层微球设计及药物释放[J]. 哈尔滨工程大学学报, 2017, **38**(11): 1817-1822.

[51] KELMENDI-DOKO A, RUBIN J P, KLETT K, *et al*. Controlled dexamethasone delivery via double-walled microspheres to enhance long-term adipose tissue retention [J]. *J Tissue Eng*, 2017, **8**: 2041731417735402.

[52] ZHANG M G, KIRATIWONGWAN T, SHEN W. Oxygen-releasing polycaprolactone/calcium peroxide composite microspheres [J]. *J Biomed Mater Res*, 2020, **108**(3): 1097-1106.

[53] HUANG L, ZHOU J H, CHEN Y, *et al*. Engineering microcapsules for simultaneous delivery of combinational therapeutics [J]. *Adv Mater Technol*, 2020, **5**(11): 2000623.

[54] XIA H, LI A, MAN J, *et al*. Fabrication of multi-layered microspheres based on phase separation for drug delivery [J]. *Micromachines* (Basel), 2021, **12**(6): 723.

[55] WANG T T, ZHANG C Y, ZHONG W, *et al*. Modification of three-phase drug release mode of octreotide PLGA microspheres by microsphere-gel composite system [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2019, **20**(6): 228.

[56] LIN S J, CHAN Y C, SU Z C, *et al*. Growth factor-loaded microspheres in mPEG-polypeptide hydrogel system for articular cartilage repair [J]. *J Biomed Mater Res*, 2021, **109**(12): 2516-2526.