

缓释微球制剂的研究进展

李勋¹ 韦玮^{1*} 马光辉¹ 胡琳琳^{1,2}

(1. 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190;

2. 江苏科技大学 冶金与材料工程学院, 江苏 张家港 215600)

摘要: 由于具有广阔的应用前景和市场价值,近年来高分子微球作为新型的药物输送系统得到了广泛研究。本文从可生物降解微球材料的选择、制备方法以及质量评价的角度展开,综述了缓释微球制剂的研究应用进展。最后回顾了临床应用中的商品化缓释微球制剂应用现状,并对未来的发展方向提出了展望。

关键词: 缓释; 微球; 制备方法; 质量评价

中图分类号: Q9444.5 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2017.06.001

引言

缓释微球(microspheres, MS)是指药物溶解或分散在聚合物材料基质中形成的粒径尺寸大小分布在5~250 μm之间的球状实体。在现有的众多缓释制剂中,微球制剂由于其特有的优点诸如给药后微球降解逐渐释放药物、可避免出现血药浓度峰谷现象减小毒副作用、大大减少治疗周期的给药剂量、可提高药物的生物利用度与病人的顺应性等,从而逐渐成为现代药剂学中热门的研究内容^[1]。利用缓释微球开发新型的给药系统逐渐成为科学界及工业界关注的焦点。

缓释微球技术由若干学科交叉而成,不但需要对所装载的药物(小分子化合物类、多肽、蛋白、中药组分等)的理化性质有深度的了解,还需要掌握聚合物材料的性质以及乳化工艺技术。因此可以说理想的缓释微球制剂的性质由活性物质、乳化技术以及聚合物材料三者共同决定。目前,包封于微球中的药物多数为多肽、蛋白类等大分子药物^[2-3],这类药物在胃蛋白酶或胃肠道的酸性条件下易失活,同时药物的亲水性导致其难以透过消化道黏膜,所以口服给药的生物利用度极低。而采取皮下、肌肉

甚至血管给药,由于其半衰期短,不得不频繁注射给药,给患者带来不适。缓释微球制剂的出现解决了蛋白、多肽类传统剂型半衰期短、生物利用度低的问题,近年来已有众多商品化的载药微球进入市场,为广大患者提供了便利。而随着生物大分子类药物缓释微球制剂技术的成熟,学者们也逐渐把目光投向了化学小分子药物缓释微球制剂的研究。

本文从载药微球骨架材料的选择、制备乳化方法、质量标准控制和已有上市产品出发,系统地回顾了近年来微球技术的发展趋势与研究进展,并对缓释微球技术中存在的难点进行了总结,最后对未来发展提出了展望。

1 缓释微球制剂材料的选择

可生物降解材料由于可以逐渐降解为人体可吸收代谢的物质,解决了辅料残留物带来毒性或在体内滞留的问题^[4]从而广泛应用于微球制剂。目前微球制剂材料可大体分为两类:天然来源的聚合物和人工化学合成的聚合物。天然来源的聚合物价格低廉且来源广泛,可分为多糖和蛋白质类等,如葡聚糖^[5]、壳聚糖^[6]、海藻酸盐^[7]、淀粉^[8]、明胶^[9]、白蛋白^[10]等。天然来源的聚合物对纯化有着较高的要求,当作为微球辅料用于大批量生产时较难保持批次间严格的质量标准。常用的化学合成聚合物可分为聚酯^[11]、聚酸酐^[12]、聚磷腈^[13]、聚酰胺^[14]、聚磷酸酯^[15]等。相比之下,这些合成的聚合物材料可以通过人为控制聚合制备工艺,从而保证药用辅料级别的质量,并且当作为载药微球的骨架材料时,可以通过改变黏度及分子量等参数,进而灵活地控制载

收稿日期: 2017-06-30

基金项目: 北京市科委生命科学领域前沿技术培育项目(Z141100000214007)

第一作者: 男, 1989年生, 博士生

* 通讯联系人

E-mail: ywei@ipe.ac.cn

药微球的降解速度,以调节所包埋药物的释放速率。因此,化学合成的可生物降解聚合物是微球研究及生产原料的主要来源。在选择材料时,常常要根据所包埋药物的理化性质不同选择合适的高分子材料。例如本课题组选用紫杉醇作为模型药物时,保持处方以及制备工艺不变,分别考察了聚乳酸-羟乙酸、聚乳酸-聚乙二醇-聚乳酸3种亲疏水性不同的高分子材料作为载体时对疏水性药物紫杉醇的包埋以及释放的影响^[16]。结果表明,由于3种材料具有不同的亲疏水性,导致制备的微球中紫杉醇的分布和晶型状态不同,进而引起包封率与体外释放行为的差异。分析原因是由于疏水性药物紫杉醇在疏水性聚乳酸溶液中均匀分布,随溶剂二氯甲烷的挥发,聚乳酸与紫杉醇原位析出,药物颗粒随即也固定在微球中;而随着材料亲水性增加,二氯甲烷挥发后,聚合物材料与药物间的相分离作用逐渐增强,从而导致药物聚集成片状。聚乳酸-羟基乙酸的包封率最高,释放周期介于聚乳酸和聚乙二醇-聚乳酸之间,并且具有最高的抗肿瘤活性而成为优选材料。

根据适应症所选择的给药途径不同,微球所处人体内环境也就有所差异。当所选用材料的性质发生变化时,载药微球的功能性也会发生相应的改变,因此也可以对聚合物材料或微球表面进行特异性修饰,如通过特异性的抗原抗体修饰、环境响应基团修饰等使微球具有主动靶向性,特异性地到达病灶区域或改变释放行为。本课题组使用壳聚糖季铵盐对聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)进行镀层修饰改性^[17],微球表面电性由负性 -14.8 mV 转变为正性 $+36.7\text{ mV}$;由于细胞膜带有负电,微球表面电性的改变大大提高了微球与肿瘤细胞的吸附能力,增强了药物的细胞摄取;体外细胞毒性试验表明,与修饰前的PLGA载药微球相比,肿瘤细胞的内吞量可由5.6倍提高至9.7倍。

2 缓释微球制剂的制备方法

对于缓释微球的制备方法不能一概而论,要根据所装载药物与高分子聚合物的理化性质综合考虑,最终选择合适的制备方法。例如,载水溶性药物与载脂溶性药物的制备方法不同^[18-19],载化学药物与载蛋白、多肽类药物的溶剂组成系统不同^[20-21],以及目标治疗释放周期的长短不同所需要的高分子聚合物材料以及微球粒径也有所不同。因此在新型缓释微球系统的开发前,要通过查阅资料对药物性

质以及临床适应症需求作深度了解,根据释放周期、所需微球粒径大小、药物性质、微球进入人体内环境等选择最合适的制备方法。目前普遍的制备方法有以下几种。

2.1 乳化-溶剂挥发法

乳化-溶剂挥发法是指先将含有微球骨架材料与药物的有机溶剂分散在与之互不相溶的另一相液体中形成乳剂,再除去分散相中的挥发性溶剂,使骨架材料逐渐析出固化成微球的方法。根据制备过程中的乳液类型体系,可分为单乳(O/W型和O/O型)法和复乳(W/O/W型和S/O/W型)法。实际制备过程中,要具体情况作具体分析,根据所包封药物的性质如脂水分配系数、分子量、化学结构和稳定性等,灵活地选择不同的方法以获得更好的效果。

2.1.1 单乳法

(O/W)单乳法—水相包油相体系。当所包封药物是疏水性药物或微溶于水时,利用药物易溶于有机溶剂的特点,可选用水包油体系(O/W)单乳法进行制备。在制备过程中,将高分子聚合物和药物共同溶解或混悬于有机溶剂中,然后与不相溶的连续相(水相)乳化形成O/W型乳液,当有机溶剂挥发后,聚合物包载药物固化形成载药微球。单乳法制备过程简单,但同样需要对制备工艺参数以及固化方式进行考察优化,目的是使药物能在制备过程中均匀分散在微球内部,降低药物结晶在微球表面的吸附,减少过高的突释,达到稳定均匀地释放^[22-23]。

Zhang等^[24]选用单乳法制备布比卡因聚乳酸-羟基乙酸缓释微球。布比卡因分子量为288,属于化学小分子类药物,而临床使用的原料药是盐酸盐形式的布比卡因,易溶于水,所以当采用复乳法进行制备时,布比卡因会逃逸至外水相。作者预先用氨水等碱性溶液处理布比卡因盐酸盐,得到脂溶性的布比卡因游离碱,使之溶于有机溶剂,再利用单乳法进行制备。结果表明单乳法制备的载药微球包封率可以达到80%,远远高于复乳法。

Makino等^[19]选用利福平作为模型药物,制备了不同释放周期的载药微球。由于利福平易溶于有机溶剂,采用单乳法进行制备,考察不同分子量的聚乳酸-聚羟基乙酸对于包封率的影响。得到结论为,分子量越低的聚乳酸-羟基乙酸(PLGA),包封率越高。分析其原因,是由于利用单乳法制备时,原料药利福平与PLGA共同溶解于油相中,在乳化的过程

中,更容易由于静电作用发生吸附,分子量越低的PLGA具有更多的端基,更易于与原料药发生静电吸附或形成氢键。

(W/O)单乳法—油相包水相体系。当所包封药物是水溶性药物时,利用药物易溶解于水不溶解于有机溶剂的特点,可选用油包水体系(W/O)单乳法进行制备。(W/O)单乳法早期曾经得到广泛的应用,后来逐渐演变成引入外水相形成复乳法(W/O/W)。但是近年来仍有学者通过对水相进行调节,利用油包水体系以获取最佳的包埋效果。本课题组从胰岛素良好的亲水性出发,通过改良的油包水体系(W/O)单乳法制备载胰岛素壳聚糖微球^[25]。首先将壳聚糖和胰岛素溶解于pH4.03的乙酸钠-乙酸缓冲液中,石油醚与液体石蜡混合作为油相,经过膜乳化得到均匀的乳液,最后通过两步固化法,使用戊二醛作为固化剂,得到粒径均一的壳聚糖微球。

(O/O)单乳法—双油相无水体系。当所包封药物是亲水性药物时,利用药物在有机溶剂中难以溶解的特点,还可以选用油包油体系即(O/O)单乳法。首先将药物与高分子聚合物溶解或以混悬状态存在于上述有机溶剂,然后与不相混溶的有机连续相乳化形成O/O型乳液,最后经过溶剂挥发形成载药微球。在该方法中,由于并无水相的引入,大大减少了制备过程中亲水性药物分子的扩散逃逸^[26]。然而在单乳(O/O)法中,药物需要长时间处于有机溶剂的环境中,所以对药物在有机溶剂中的稳定性有较高要求。化学小分子类药物可采用这种方法,易失活的多肽、蛋白类药物少见使用此法。

2.1.2 复乳法

(1)(W₁/O/W₂)复乳法—外水相包油相包内水相体系。水包油包水体系(W₁/O/W₂)复乳法是在油相包水相体系(W/O)单乳法基础上发展而来的,通过引入含有一定渗透压的外水相制备复乳液以提高乳液在固化过程中的稳定性。当所包封的药物是易溶于水的多肽、蛋白类药物时,常采用复乳法进行制备。通过制备过程中的工艺调整或在内水相中引入稳定剂,可以有效提高多肽、蛋白类药物的稳定性,防止药物失活。在制备过程中,药物溶解或混悬于小体积水溶液中作为内水相(W₁),高分子聚合物溶解于有机溶剂中作为油相(O),内水相与油相乳化形成W/O初乳,初乳再与含表面活性剂的水溶液(W₂)乳化成W₁/O/W₂复乳,当油相逐渐移

除后,即可固化生成载药微球。

在复乳法中,初乳的制备方式以及初乳液的稳定性均对微球的载药量和释放行为有较大影响,因此如何选择合适的初乳制备工艺也是复乳法的主要难点之一。本课题组选择亲水性药物艾塞那肽作为模型药物,通过均质和超声两种不同的初乳制备方式,利用复乳法制备艾塞那肽缓释微球,并分析这两种初乳制备方法对微球释放行为、降解过程和体内药理学的影响^[27]。结果表明,两种初乳制备方式对微球的结构有较大影响,经过扫描电子显微镜以及激光共聚焦显微镜观察,超声制备的微球内部孔小、基质结构紧密,而均质制备的微球孔多且大、结构疏松。结构进而影响了释放行为,超声制备的微球内部结构致密,导致大量降解产物在微球内部积累,形成较大的空腔,所以药物初期释放缓慢,但后期加快,而均质制备的微球内部结构疏松多孔,所以整个释过程较快。

在水包油包水(W/O/W)体系中,通过对制备工艺的调整,可以制备具有不同结构的微球。本课题组通过复乳法开发了一种新型的制备多孔微球的方法^[28]。选用聚乙二醇修饰的聚乳酸-羟基乙酸(PEG-PLGA)和聚乙二醇修饰的聚乳酸(PEG-PLA)两种双亲性高分子聚合物作为载体材料,鲑鱼降钙素作为模型药物,乙酸乙酯作为孔闭合剂,通过制备工艺的控制,在不添加致孔剂的条件下制备多孔微球,以达到包载药物的目的。

(2)(S/O/W)复乳法—水相包油相包粉末体系。此法与单乳(O/W)法类似,为了简化工艺流程,在不引入内水相的前提下,可以将药物固体粉末均匀混悬于油相形成混悬液(S/O),再将混悬液转移至含有表面活性剂的外水相中,制备复乳(S/O/W)^[29]。

2.2 喷雾干燥法

将高分子聚合物材料溶解于低沸点的有机溶剂中,同样将药物通过溶解或以小颗粒的方式分散在聚合物溶液中,组成单相或多相的胶体,然后将溶液用雾化器喷雾,同时用向上流动的氮气干燥。过程中通过对干燥室进出口温度调整可以制备不同形态的微球^[30-31]。喷雾干燥法减少了人为操作的误差,简化了过程中的灭菌工艺,适合于工业上大规模的放大生产。目前已有公司采用喷雾干燥法成功制备了长效溴隐亭(Parlodol)以及醋酸曲普瑞林(triptorelin)载药微球。

对于在水中难溶或微溶的药物,为了简化制备工艺,常常选择喷雾干燥法。Blanco 等^[32]选择喷雾干燥法制备布比卡因聚己内酯微球,布比卡因属于小分子药物,当通过乳化法制备时,药物逃逸现象较明显,为了增加包埋率需要用饱和的布比卡因水溶液作为外水相,增加了生产成本。而使用喷雾干燥法制备布比卡因微球,制备过程简单,包封率高达90%以上,载药微球结构致密,释放周期可长达15天。

2.3 相分离法

相分离法应用广泛,可以将不同特性的药物包埋进微球。在载药微球的制备中,应用较为广泛的是溶剂-非溶剂法,即在聚合物溶液中加入一种对此聚合物不溶的溶剂,在引起相分离的同时将药物包裹成微球的方法。药物可以以固体或液体形式存在,稳定溶解或混悬于有机溶剂中,高分子聚合物载体材料同样溶解于有机溶剂中,然后加入可与有机溶剂互溶但不能溶解高分子载体材料和药物的非溶剂,使高分子聚合物因溶解度降低迅速发生凝聚,实现固液分离,最后去除有机溶剂即可得到载药微球^[33-34]。

2.4 超临界流体沉积法

超临界流体沉积法是指在超临界流体存在的环境下快速吸收溶液中的有机溶剂,使高分子载体材料过饱和而快速成球。与传统制备方法相比,超临界流体沉积法制备工艺条件温和,微球形成时间短、包封率高、有机溶剂残留量少,适合热敏性药物以及挥发性药物微球的制备。张严之等^[35]利用超临界流体技术,以二氯甲烷与二甲亚砷作为共溶剂,采用单因素考察工艺制备了复合5-氟尿嘧啶和吡哆美辛的聚乳酸微球。颜庭轩等^[36]利用超临界流体技术制备辛伐他汀的PEG-PLLA微球,考察了PEG的浓度、温度以及压力等因素对粒径分布和包埋率、载药率的影响,并通过差示扫描量热法验证了辛伐他汀以无定型形式存在于微球中。

2.5 快速膜乳化法

值得一提的是,以上传统的缓释微球制备方法对于微球粒径的大小及均一程度还较难控制,而当进行到缓释微球制剂的逐级放大阶段,微球粒径的均一性难以得到保障,势必会引起批次间的性质出现差异。为了解决这个问题,学者们也提出了很多种方案。例如,可以在微球固化形成后通过一定尺寸的筛网进行筛分,得到粒径大小形状类似的微球。

但是筛网的后期清洁以及再生毫无疑问会增加制备的成本。近年来,本课题组通过自主研发的快速膜乳化技术成功地解决了这个问题^[3,18,21,27]。快速膜乳化器的工作原理是通过乳化法制备粒径大于膜孔孔径的预乳液,随后利用外部压力将预乳液快速通过尺寸大小可选择的微孔膜,形成粒径均一的乳液;一般重复操作3~5次后,即可得到粒径均一的乳液,乳液固化后即可得到粒径均一可控的载药微球(图1)。快速膜乳化技术耗能低,条件温和,易于放大,近年来已应用于缓释微球制剂的研发上并得到了广泛的认可。膜乳化器分为快速膜乳化器和常规膜乳化器,可以满足工厂与实验室制备的不同需求(图2)。本课题组通过快速膜乳化技术制备了粒度分布系数span值在0.7~0.8之间的载重组人生长激素的微球^[18],批次间重复性良好,并以此为保障成功建立了体内体外释放行为规律的相关性,解决了由于粒径不均一导致的释放规律重复性差的问题,为后续重组人生长激素微球的研究与开发奠定了基础。

3 缓释微球制剂的质量评价

缓释微球制剂在临床上的释药周期往往长达数周,甚至数月,一旦不能保证产品的质量(如突释过高,释放周期难以控制,载体材料的安全性等方面),会导致发生毒副作用甚至威胁患者的生命,所以对于微球制剂应该具有比常规制剂更加严格的质量要求和批次间的重复性要求。目前,各国药典采取指导原则的形式对微球制剂的质量评价提出了要求和规定,如在2015版《中国药典》中提出了“微粒制剂指导原则”,对国内进行缓释微球开发的药企提出了质量控制的导向。对于可生物降解的微球,常规的质量评价项目如表1所示。

3.1 微球的物理特性评价

微球的物理特性评价包括形态、粒径及分布、有机溶剂残留、聚合物玻璃化转变温度与晶型改变等。

3.1.1 形态

通过扫描电子显微镜(SEM)或者透射电子显微镜(TEM)观察微球的形态,如形状(圆形或类圆形)、表面面貌(光滑或粗糙)、骨架结构(多孔或实心)(图3)。微球形态与结构的不同对微球的载药量以及释放行为有显著影响。表面粗糙的微球易吸附药物结晶,往往会导致高突释。通过对微球形态进行观测,总结形态与处方工艺之间的关系,不但可

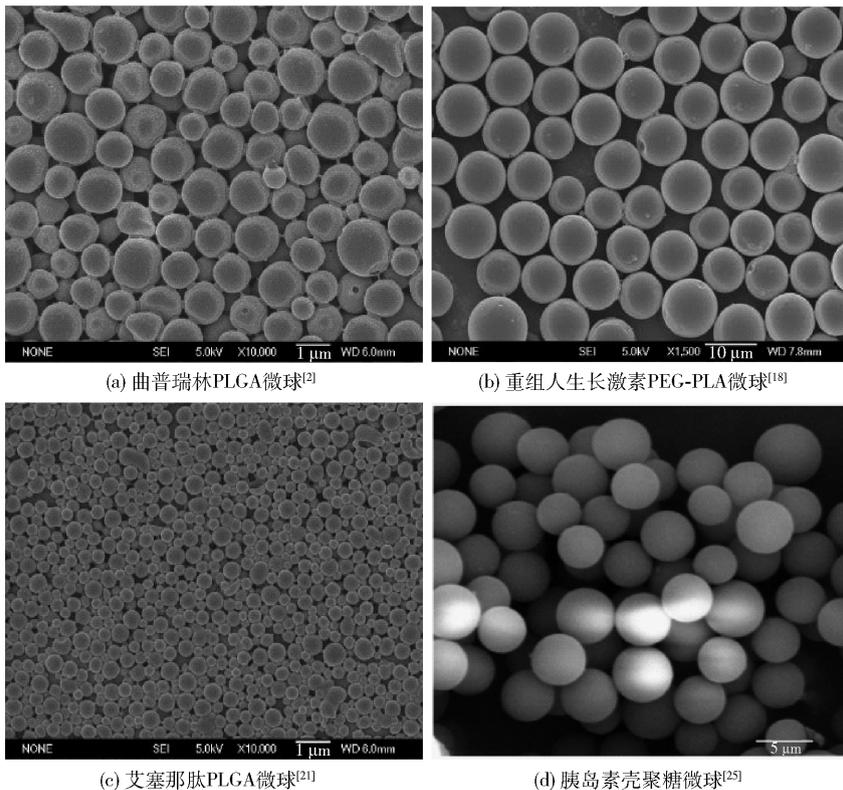


图 1 膜乳化技术制备的尺寸均一微球

Fig. 1 Uniform size microspheres prepared by the membrane emulsification technique



图 2 膜乳化装置

Fig. 2 Equipment for membrane emulsification

表 1 缓释微球注射剂的质量评价表

Table 1 Quality evaluation of biodegradable microsphere release by injection

物理性质评价	药剂学评价
形态	载药量/包封率
粒径及分布	释放行为(体内与体外相关性)
有机溶剂残留	材料降解试验(佐证释放行为)
高分子聚合物的玻璃转化温度与晶型改变	微生物检查(内毒素与无菌)

以对微球的制备机理进行探索,还可以对释放行为进行优化。

本课题组选取奥曲肽作为模型药物,磷酸缓冲液(PBS)作为变形引发剂,通过快速膜乳化技术制备了不同形态、尺寸均一可控的载药微粒,粒径分布系数 span 值在 0.9 左右,并考察了 pH 值、聚乙烯醇浓度以及搅拌速率对微粒形状的影响^[11]。当 PBS 为 5 mmol/L,聚乙烯醇质量分数为 0.1% 时,可以制备表面粗糙的微球,包封率达到 36.52%。当不加入 PBS,聚乙烯醇质量分数在 0.5% 时,可以制备表面光滑的微球,包封率仅为 1.08%。当 PBS 为 5 mmol/L,聚乙烯醇质量分数在 0.5% 时,可以制备表面粗糙的椭圆形微球,包封率可达到 42.10%。结

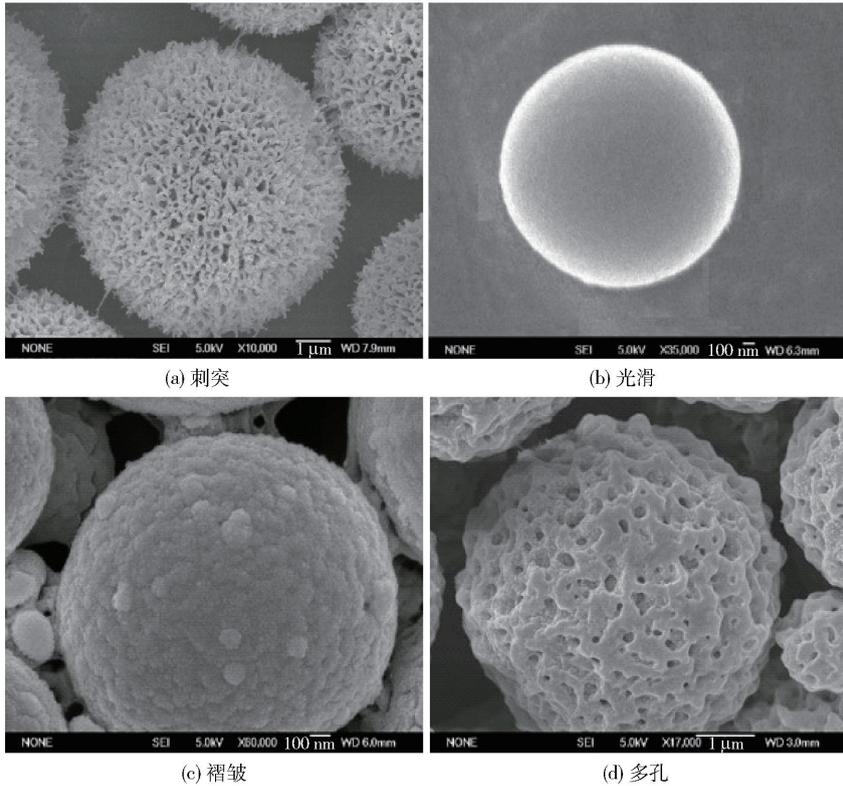


图3 电镜下不同形态的微球

Fig. 3 SEM images of microspheres with different morphology

果表明,表面形貌以及形状对于微球的载药率和包封率有着显著影响。

本课题组以牛血清蛋白(BSA)作为模型药物,分别考察了戊二醛、对苯二甲酸、N-[(2-羟基-3-三甲基胺)丙基]作为交联剂时对壳聚糖微球结构的影响^[37]。结果表明,交联剂的不同对于微球结构以及微球比表面积有着显著影响,从而影响壳聚糖微球的载药量和释放行为。

3.1.2 粒径及分布

粒径大小及其分布对缓释微球的包封率、释放行为模式、降解速率都有一定影响,因此粒径大小及分布是质量控制中一个很重要的指标。随着检测手段的进步,粒径大小及其分布测定由传统的光学显微镜视野测定发展到电子显微镜的逐一统计再发展到近年来应用广泛的激光粒度仪绘制粒径大小分布图,可以在制备过程中的每一步工艺里对粒径大小及分布进行追踪检测进而得到目标微球^[38]。本课题组选择聚乙二醇-聚乳酸共聚物(PELA)作为载体材料,首次通过快速膜乳化技术制备载乙肝疫苗粒径分布变量系数(CV值)为18.9%的微球,在疫苗佐剂上实现了粒径的均一可控^[39],并考察了油水比对于包封率的影响,为制备工艺及初乳稳定性的

研究提供了保障。

3.1.3 有机溶剂残留

制备过程中引入的油相(有机溶剂)在固化的过程中会存在未能完全除去的问题,诸如丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷等的残留不仅影响微球储存的稳定性,还会在注射后引起人体的副作用,因此每个国家的药典都对微球的有机溶剂残留量有着严格的要求。例如,我国2015版药典规定制剂以及微球工艺的二氯甲烷的限度为0.06%,乙酸乙酯与丙酮的限度都为0.5%。不同的有机溶剂毒性不同,限度也有所不同,目前常规使用气相色谱法进行残留有机溶剂的检测。

3.1.4 高分子聚合物的玻璃化转变温度与晶型改变

在 高 分 子 聚 合 物 材 料 析 出 形 成 微 球 后, 聚 合 物 的 玻 璃 化 转 变 温 度 (T_g) 会 发 生 改 变。 因 为 当 聚 合 物 和 药 物 或 溶 剂 共 同 存 在 时, 易 产 生 共 价 键 吸 引 力, 使 得 聚 合 物 的 T_g 降 低。 比 较 常 用 的 T_g 检 测 方 法 是 差 示 热 分 析 法 和 差 示 扫 描 量 热 法。 高 分 子 聚 合 物 的 晶 型 与 结 晶 度 的 变 化 可 以 从 侧 面 反 映 药 物 的 释 放 速 率 和 微 球 的 降 解 速 度。 可 利 用 X 射 线 衍 射 法 检 测 聚 合 物 结 晶 度 从 而 佐 证 载 药 微 球 的 释 放 行 为 与 规 律^[40]。 Izumikawa 等^[22] 通 过 常 压 和 减 压 法 制 备 孕

激素 PLA 微球,经过 X 射线衍射发现,常压法制备的孕激素 PLA 微球存在药物结晶峰以及 PLA 结晶峰,而减压法制备的微球并不存在这两种特征峰,说明减压制备的微球中药物均匀分散在 PLA 无定形骨架内,也解释了减压制备的微球突释低、释放过程保持匀速的现象。

3.2 微球的药剂学评价

微球的药剂学评价包括载药量/包封率、释放行为、材料降解实验和微生物检查等。

3.2.1 载药量/包封率

载药量是指微球制剂中所含药物的质量分数,而包封率是指微球制剂中包封的药量占微球制剂中包封与未包封总药量的比值,二者是衡量制备工艺和成本的重要指标。其检测方法一般是先采用合适的有机溶剂将微球高分子材料骨架溶解,再根据药物的性质选择不同的方法将药物分离或提取出来,进行含量测定。

3.2.2 释放行为

释放行为是根据临床适应症需求和高分子聚合物材料性质共同决定的。选择合适的高分子聚合物材料与工艺制备不同结构的载药微球,使活性成分按照预期的药代动力学模型释放。对于可生物降解材料,溶胀和溶蚀机制也是控制药物释放的主要因素。释放介质的组成、pH 值、离子强度、渗透压和温度等都会对释放速率产生影响。在载药微球的研发阶段,应确定好合适的体外释放条件,并根据体内释放条件建立体内、体外相关性。对于释放周期较长的载药微球,可以建立加快释放试验的方法,预测模拟常规释放行为^[41]。建立加速释放的条件要遵循相关性原则,使加速释放曲线尽量拟合常规释放曲线,得到准确的相关性。同时需要注意的是载药微球的突释效应,由于微球表面吸附的药物大量释放,短时间内使局部药物浓度快速升高,极易引起副作用。2015 版《中国药典》明确规定载药微球在前 0.5 h 内释放的药物含量要低于 40%。而对于缓释微球制剂的体外释放方法,目前并没有统一的标准要求,实验室科研阶段常采取透析法或离心法进行体外释放行为的评价,而工厂研发阶段多数采取摇床法或流通池法进行评价。

Klose 等^[42]以利多卡因作为模型药物制备一系列的 PLGA 载药微球,考察了 PLGA 分子量、载药微球内部的孔洞大小以及微球粒径对于释放行为的影响。结果表明,对于小分子类药物的包埋,PLGA 分

子量对释放有着显著影响;同等条件下微球粒径越小,比表面积越大,体外释放越快。通过释放过程的电镜观察发现,粒径越小的微球在释放过程中会产生较多的孔洞,酸性产物积累越多,越促进 PLGA 降解,加快药物释放。

3.2.3 材料降解实验考察分子量

在微球药物的释放过程中,药物的释放伴随着聚合物骨架的水解。聚合物降解的速率决定药物释放的速率。因此可以在释放过程中观察微球的形态,并通过凝胶渗透色谱法(GPC)检测不同时刻高分子聚合物载体的分子量,通过形态及分子量的变化监控微球降解释放过程。这些信息对于筛选骨架材料、优化制备工艺有着重要意义。

3.2.4 微生物检查

缓释微球的微生物检查比一般冻干制剂要求更加严格。这是因为在微球的制备和生产过程中,众多环节很有可能引入微生物,而微球的尺寸以及高分子材料的特性使微生物更易吸附在其表面,也可以被包裹在骨架内部,所以要在微球的内部以及外部根据不同的制备条件对内毒素和无菌作系统全面的筛查。目前,针对已上市微球,可以利用一定浓度的二甲基亚砷溶解破坏微球,随后接种至培养基中,在显微镜下培养,观察检测。

4 缓释微球制剂的应用现状

一直以来,在药物新剂型的研发方面,国内外制药公司都投入了大量的资金与人力开发具有自主知识产权的创新技术平台,而随着设备智能化与自动化的进步,微球化技术的蓬勃发展,药品监管机构对微球制剂的粒径、体外释放、工艺稳定性、残留溶剂、生物利用度等方面的要求也越来越严格。目前,经过美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市的微球品种和国外制药公司/药物研发公司开发出的成熟微球化技术平台如表 2 所示。

5 发展前景

除了将临床上应用的药物进行包埋,制备成微球缓释制剂提高释放周期与稳定性外,近年来学者们逐渐把目光投向了微球制剂的免疫学应用。由于微球属于“外来物质”,进入体内会引起一系列的免疫反应,将微球作为免疫增强剂与抗原一起注射入体内,将会增强机体对抗原的免疫应答反应或改变产生的抗体类型。实验表明,微球作为免疫佐剂有

表2 微球化技术平台
Table 2 Examples of microspherification technology

商品名	FDA 批准时间	装载药物	上市公司	给药途径与释放周期	治疗领域
Bydureon™	2012	艾塞那肽	Lilly	肌注,1个月	II型糖尿病
Vivitrol	2006	纳曲酮	Cephalon	肌注,1个月	酗酒,戒毒
Risperdal - Consta 恒德	2003	利培酮	Johnson&Johnson 制药	肌注,两周	精神分裂症
Suprefact - Depot	1998	布舍瑞林	Sanofi - Aventis 制药	皮下埋植,1个月	前列腺癌,乳腺癌
Embogold	2001	丙烯酸酯	Biosphere	注射/植入	子宫纤维瘤,富血管性肿瘤
Lurpon Depot ®抑那通	1989	亮丙瑞林	武田制药	肌注,1或3或4或6个月	前列腺癌,乳腺癌
Depo - Provera	1982	醋酸甲羟孕酮与雌二醇	Pfizer 制药	肌注,3个月	避孕
Arestin	2001	盐酸米诺环素	Orapharma	植入	广谱抗菌
Deflux	2001	透明质酸-聚糖苷	Q - Med AB	注射	膀胱输尿管回流
Bead Block	2003	聚乙烯醇	Biocompatibles Intl	栓塞剂	超血管瘤,动静脉畸形
Duralease	2003	苯钾酸雌二醇	PR Pharmaceuticals	植入,5个月	促进发育(牛类等动物)
Decapeptyl ®达菲林	2011	曲普瑞林	Ipsen, Waston 等	肌注,3个月	前列腺癌,子宫内 膜异位症,子宫肌瘤
Sandotatin LAR ®善龙	1998	奥曲肽	Novartis 制药	肌注,1个月	肌端肥大,子宫内 膜异位症,神经内 分泌肿瘤
Plenaxis™	2003	Abarelix	Praecis 生物技术公司	肌注,1个月	前列腺癌
Zoladex ®诺雷德	1990	戈舍瑞林	Astra - Zeneca 制药	皮下埋植,1至3个月	前列腺癌,乳腺癌
Nutropin Depot ®(撒市)	1999	生长激素	Gentech 公司	肌注,1个月	生长激素缺乏
somatuline	2007	兰瑞肽	Ipsen	肌注,14天	肢端肥大、类癌综合征

助于用药早期产生较高的抗体滴度,并借助缓释产生连续的抗原刺激作用。Chen 等^[43]首次选用阳离子 PLA 微球作为佐剂,装载病毒性乙型肝炎表面抗原(HBsAg),在皮下、肌肉内、腹膜内分别进行免疫诱导实验。结果表明,与传统铝佐剂相比,PLA 微球佐剂可以显著增加树突状细胞的激活和上调,并增加 CD40 和 CD80 的表达和 IL-12 的产生;不同部位的免疫效果也不同;此外,使用基于微球佐剂的疫苗增加了机体免疫系统对于颗粒酶 B、Th1 型细胞因子(IL-2、IL-12、IFN- γ)和 Th2 细胞因子 IL-4 的分泌。因此微球作为新型疫苗佐剂具有更好的诱导细胞与体液免疫的能力。Feng 等^[44]通过不同比例型号的 PLGA 进行乙肝疫苗的负载,比较载药量和体外释放行为发现,当乳酸与羟基乙酸比例为 75:25 时 PLGA 载药率最高,而 50/50COOH 型号的 PLGA 释放最快;通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)进行动物实验,检测不同佐剂产生的 Anti-HBS,结果显示,混合佐剂产生激发抗体的效果最好。Saini 等^[45]利用 PLGA 装载病毒性乙型肝炎表面抗原

(HBsAg),皮下注射,测定干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-2(IL-2)和一氧化氮等以反映特异性细胞介导的免疫应答并与市售疫苗制剂进行对比。结果表明:与市售乙肝疫苗相比,单次注射 PLGA 微球可以产生更好的细胞免疫,以减少感染的发生。目前关于微球制剂在免疫学上的应用大部分停留在理论研究阶段,由于体内免疫反应是一个复杂的过程,因此对微球制剂的安全性及免疫应答的机理还需要进一步的研究。

总而言之,与其他传统剂型相比,注射用缓释微球制剂在药物制剂和临床诊断/治疗领域商品化速度相对缓慢,并且微球制剂从实验室阶段的初期研发走向临床应用需要经历漫长的过程,主要有以下几个瓶颈需要解决:(1)各国药品监督评审机构并没有针对缓释微球制剂推出专门的监管和评审要求;(2)微球制剂的放大生产受到设备自动化的制约,难以大规模、大批量制备,导致成本过高,并且重复性较差;(3)FDA 批准用于临床的生物可降解高分子聚合物的种类及规格有限;(4)载药微球进入

人体后,降解释放以及与组织间发生作用的机制机理尚不清晰明确,毒性和安全性评价还需进一步验证。近年来,新型给药系统研究与开发的投入和支持逐年增加,对于蛋白及多肽类药物的新型缓释/控释注射给药系统的研究也成为热门。而从实验室技术取得成功到逐级放大生产发展到产业化规模,其间须逾越层层障碍。如何在保持基础研究成果的条件下,降低成本,逐步扩大产量,直至产业化生产也是接下来发展新型给药系统中紧迫而又重要的任务。另外,缓释微球技术长期以来被发达国家的药企垄断,直到近十几年,国内各大药企才投入大量的人力与资金开展对微球制剂的研究。目前已有亮丙瑞林微球成功上市,利培酮微球正在临床试验中,相信在不久的将来,会有越来越多的微球制剂产品成功走向市场^[46]。

参考文献:

- [1] Sanders L M, McRae G I, Vitale K M, et al. Controlled delivery of an Lhrh analogue from biodegradable injectable microspheres [J]. *Journal of Controlled Release*, 1985, 2: 187-195.
- [2] 王宁, 王玉霞, 秦培勇, 等. 快速膜乳化法制备载醋酸曲普瑞林 PLGA 微球[J]. *过程工程学报*, 2013, 13(5): 862-869.
Wang N, Wang Y X, Qin P Y, et al. Preparation of triptorelin acetate-loaded PLGA microspheres by premix membrane emulsification [J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2013, 13(5): 862-869. (in Chinese)
- [3] Wei Y, Wang Y X, Kang A J, et al. A novel sustained-release formulation of recombinant human growth hormone and its pharmacokinetic, pharmacodynamic and safety profiles [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(7): 2039-2048.
- [4] Xia Y J, Pack D W. Uniform biodegradable microparticle systems for controlled release [J]. *Chemical Engineering Science*, 2015, 125: 129-143.
- [5] Kenari H S, Alinejad Z, Imani M, et al. Effective parameters in determining cross-linked dextran microsphere characteristics: screening by Plackett-Burman design-of-experiments [J]. *J Microencapsul*, 2013, 30(6): 599-611.
- [6] Jameela S R, Kumary T V, Lal A V, et al. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system [J]. *Journal of Controlled Release*, 1998, 52: 17-24.
- [7] Ørming P, Hoem K S, Coron A E, et al. Alginate microsphere compositions dictate different mechanisms of complement activation with consequences for cytokine release and leukocyte activation [J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 229: 58-69.
- [8] Sato T, Tanaka T, Nishiofuku H, et al. Pharmacokinetics and histopathological findings of chemoembolization using cisplatin powder mixed with degradable starch microspheres in a rabbit liver tumor model [J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2017, 40(3): 438-444.
- [9] Huda M K, Das P P, Baruah S D, et al. Polycaprolactone-blended gelatin microspheres and their morphological study [J]. *J Polym Res*, 2017, 24(5): 72 .
- [10] Ramaiah B, Nagaraja S H, Kapanigowda U G, et al. High azithromycin concentration in lungs by way of bovine serum albumin microspheres as targeted drug delivery: lung targeting efficiency in albino mice [J]. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 24(1): 14.
- [11] Fan Q Z, Qi F, Miao C Y, et al. Direct and controllable preparation of uniform PLGA particles with various shapes and surface morphologies [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2016, 500: 177-185.
- [12] Ponnurangam S, O'Connell G D, Hung C T, et al. Biocompatibility of polysebacic anhydride microparticles with chondrocytes in engineered cartilage [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 136: 207-213.
- [13] Chen C, Zhu X Y, Gao Q L, et al. Surface modification of cyclomatrix polyphosphazene microsphere by thiol-ene chemistry and lectin recognition [J]. *Applied Surface Science*, 2016, 387: 1029-1036.
- [14] Dencheva N, Denchev Z, Lanceros-Méndez S, et al. One-step in situ synthesis of polyamide microcapsules with inorganic payload and their transformation into responsive thermoplastic composite materials [J]. *Macromol Mater Eng*, 2016, 301(2): 119-124.
- [15] Xu X Y, Yu H, Gao S J, et al. Polyphosphoester microspheres for sustained release of biologically active nerve growth factor [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(17): 3765-3772.
- [16] Wang L Y, Cai M M, Liu Y, et al. Polymer hydrophobicity regulates paclitaxel distribution in microspheres, release profile and cytotoxicity in vitro [J]. *Powder Technology*, 2015, 275: 77-84.
- [17] 蔡明明, 王连艳, 吕丕平, 等. 壳聚糖季铵盐表面修饰对载紫杉醇 PLGA 微球体外药理学的影响 [J]. *过程工程学报*, 2012, 12(3): 86-91.
Cai M M, Wang L Y, Lv P P, et al. Pharmacology efficacy in vitro of PTX - PLGA microspheres and surface modified PTX - PLGA microspheres by quaternized chitosan [J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*,

- 2012, 12(3): 86–91. (in Chinese)
- [18] Wei Y, Wang Y X, Wang W, et al. mPEG–PLA microspheres with narrow size distribution increase the controlled release effect of recombinant human growth hormone [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(34): 12691–12699.
- [19] Makino K, Nakajima T, Shikamura M, et al. Efficient intracellular delivery of rifampicin to alveolar macrophages using rifampicin-loaded PLGA microspheres: effects of molecular weight and composition of PLGA on release of rifampicin [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2004, 36: 35–42.
- [20] Ramazani F, Chen W, Van Nostrum C F, et al. Formulation and characterization of microspheres loaded with imatinib for sustained delivery [J]. *Int J Pharm*, 2015, 482(1/2): 123–130.
- [21] Qi F, Wu J, Fan Q Z, et al. Preparation of uniform-sized exenatide-loaded PLGA microspheres as long-effective release system with high encapsulation efficiency and biostability [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 112: 492–498.
- [22] Izumikawa S, Yoshioka S, Aso Y, et al. Preparation of poly (*l*-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate [J]. *Journal of Controlled Release*, 1991, 15: 133–140.
- [23] 王襄平, 梅兴国. 乳酸/羟基乙酸共聚物的分子量及其单体组成比例对利培酮微球性质的影响[J]. *中国药房*, 2007, 18(1): 38–40.
Wang X P, Mei X G. Effect of molecular weight and monomer ratios of poly(lactic-co-glycolide) on properties of risperidone-loaded microspheres [J]. *China Pharmacy*, 2007, 18(1): 38–40. (in Chinese)
- [24] Zhang H, Lu Y, Zhang G Q, et al. Bupivacaine-loaded biodegradable poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix and modelling of drug release [J]. *Int J Pharm*, 2008, 351(1/2): 244–249.
- [25] Wang L Y, Gu Y H, Zhou Q Z, et al. Preparation and characterization of uniform-sized chitosan microspheres containing insulin by membrane emulsification and a two-step solidification process [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, 50: 126–135.
- [26] 马玉花, 王虹, 张广兴, 等. 载槐定碱 PLGA 微球制备工艺的优化[J]. *中成药*, 2016, 38(4): 781–785.
Ma Y H, Wang H, Zhang G X, et al. Process optimization of sophoridine-loaded PLGA microspheres [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2016, 38(4): 781–785. (in Chinese)
- [27] Qi F, Wu J, Hao D X, et al. Comparative studies on the influences of primary emulsion preparation on properties of uniform-sized exenatide-loaded PLGA microspheres [J]. *Pharm Res*, 2014, 31(6): 1566–1574.
- [28] Wei Y, Wang Y X, Zhang H X, et al. A novel strategy for the preparation of porous microspheres and its application in peptide drug loading [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2016, 478: 46–53.
- [29] 吴杰, 齐珂珂, 徐子伟, 等. 猪胰高血糖素样肽-2 (pGLP-2) 微球的制备及其对结肠炎小鼠肠道损伤修复的研究[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(2): 150–157.
Wu J, Qi K K, Xu Z W, et al. Preparation of porcine (*Sus scrofa*) glucagon-like peptide-2 microspheres (pGLP-2) and its therapeutic effect in a murine (*Mus musculus*) model of colitis [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(2): 150–157. (in Chinese)
- [30] Qu S Q, Dai C C, Qiu M, et al. Preparation and characterization of three types of cefquinome-loaded microspheres [J]. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 2017, 22(3): 256–265.
- [31] 钦富华, 蔡雁, 计竹娃. 喷雾干燥法制备天麻素壳聚糖微球[J]. *广东药学院学报*, 2015, 31(3): 291–295.
Qin F H, Cai Y, Ji Z W. Preparation of gastrodin-chitosan microspheres by spray-drying method [J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2015, 31(3): 291–295. (in Chinese)
- [32] Blanco M D, Bernardo M V, Sastre R L, et al. Preparation of bupivacaine-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres by spray drying: drug release studies and biocompatibility [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 55(2): 229–236.
- [33] 郁晓, 任杰, 任天赋, 等. 两性霉素 B 缓释微球的制备及缓释性能研究[J]. *中国生物医学工程学报*, 2007, 26(3): 445–451.
Yu X, Ren J, Ren T B, et al. Preparation and in vitro release behavior of amphotericin B loaded PLA–PEG microspheres [J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2007, 26(3): 445–451. (in Chinese)
- [34] 查涛, 宋林勇, 周艺峰, 等. 非溶剂/溶剂界面诱导相分离法制备多孔硫化聚苯乙烯微球[J]. *应用化工*, 2015, 44(8): 1445–1448.
Zha T, Song L Y, Zhou Y F, et al. Fabrication of multi-porous sulphonated polystyrene microspheres via nonsolvent/solvent-induced phase separation process [J]. *Applied Chemical Industry*, 2015, 44(8): 1445–1448. (in Chinese)
- [35] 张严之, 李奎锋, 黄婷, 等. 超临界流体技术制备 5-

- 氟尿嘧啶-吡哆美辛-聚乳酸缓释微球[J]. 复合材料学报, 2011, 28(1): 21-25.
- Zhang Y Z, Li K F, Huang T, et al. Preparation of 5-fluorouracil indomethacin poly(L-lactide) microspheres using a novel supercritical fluid technique [J]. Acta Materialiae Compositae Sinica, 2011, 28(1): 21-25. (in Chinese)
- [36] 颜庭轩, 王志祥, 黄德春, 等. 超临界流体技术制备辛伐他汀/PLLA-PEG 缓释复合微球[J]. 高校化学工程学报, 2014, 28(2): 401-406.
- Yan T X, Wang Z X, Huang D C, et al. Preparation of simvastatin/PLLA-PEG sustained-release microspheres by supercritical fluid technology [J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2014, 28(2): 401-406. (in Chinese)
- [37] Wei W, Yuan L, Hu G, et al. Monodisperse chitosan microspheres with interesting structures for protein drug delivery [J]. Adv Mater, 2008, 20(12): 2292-2296.
- [38] 彭巧, 宋宁, 马巍, 等. 影响 PLGA 微球包封率和粒径相关因素研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(29): 5790-5793.
- Peng Q, Song N, Ma W, et al. Advanced studies on influence factors on encapsulation efficiency and particle size of PLGA microspheres [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(29): 5790-5793. (in Chinese)
- [39] Wei Q, Wei W, Tian R, et al. Preparation of uniform-sized PELA microspheres with high encapsulation efficiency of antigen by premix membrane emulsification [J]. J Colloid Interface Sci, 2008, 323(2): 267-273.
- [40] Okada H. Preface [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997, 28: 1-3.
- [41] Park K, Jung G Y, Kim M K, et al. Triptorelin acetate-loaded poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres for controlled drug delivery [J]. Macromol Res, 2012, 20(8): 847-851.
- [42] Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, et al. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles [J]. Int J Pharm, 2006, 314(2): 198-206.
- [43] Chen X M, Wang L Y, Liu Q, et al. Polycation-decorated PLA microspheres induce robust immune responses via commonly used parenteral administration routes [J]. International Immunopharmacology, 2014, 23(2): 592-602.
- [44] Feng L, Qi X R, Zhou X J, et al. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres [J]. Journal of Controlled Release, 2006, 112(1): 35-42.
- [45] Saini V, Jain V, Sudheesh M S, et al. Comparison of humoral and cell-mediated immune responses to cationic PLGA microspheres containing recombinant hepatitis B antigen [J]. Int J Pharm, 2011, 408(1/2): 50-57.
- [46] 梅兴国, 黄似焕, 白承之. 注射用缓释微球的国内外发展现状 [J]. 中国药物评价, 2014, 31(1): 27-28.
- Mei X G, Huang S H, Bai C Z. Worldwide development status of injectable microspheres for sustained release [J]. Chinese Journal of Drug Evaluation, 2014, 31(1): 27-28. (in Chinese)

Recent research and development prospects for sustained-release microspheres

LI Xun¹ WEI Yi^{1*} MA GuangHui¹ HU LinLin^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190;

2. School of Metallurgy and Material Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhangjiagang, Jiangsu 215600, China)

Abstract: Polymer microspheres can be used as a novel drug delivery system and have been extensively studied in the past few years due to their broad application and market value. In this paper, we review recent advances and new applications of these materials, with a main focus on the selection of the biodegradable material, preparation methods and quality evaluation. Furthermore, the current status of clinical applications of commercial microspheres is summarized concisely and their future development prospects are discussed.

Key words: sustain-release; microsphere; preparation method; quality evaluation

(责任编辑:吴万玲)