

载药纳米微粒制备技术

赵 硕 常 津* 卢 剑 原续波

(天津大学材料科学与工程学院 天津 300072)

摘 要 载药纳米微粒作为近年来新型的药物投递载体, 由于其良好的生物相容性、超微小的粒径、良好的体内分布而受到日益广泛的关注。作为包载疫苗、多肽、蛋白和基因等大分子药物的载体, 载药纳米微粒不仅可以增强药物的稳定性、增强疗效、降低毒副作用, 由于其超微小的粒径可以有效地穿越组织间隙, 可通过人体的毛细血管甚至血脑屏障被细胞吸收, 从而更有效地对药物实行靶向和控制释放。本文重点论述了载药纳米微粒系统制备方法的研究进展, 并对其中的影响因素、药物的包载和控制释放进行了讨论; 同时对于载药纳米微粒的发展做出展望。

关键词 纳米粒子 药物载体 制备方法 控制释放

Development on Preparation of Drug-Loaded Nanoparticles

Zhao Shuo, Chang Jin,* Lu Jian, Yuan Xubo

(School of Material Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract As effective drug delivery devices, drug-loaded nanoparticles have generated tremendous interest due to their excellent biocompatibility, biodegradability, and subcellular size. Drug-loaded nanoparticles can not only effectively deliver the drug to target site and thus increase the therapeutic benefit, while minimizing side effects, but also can be absorbed by the cells through the tissue matrix. They can penetrate the capillary vessel without causing trauma, and even be able to cross the blood-brain barrier (BBB). They are made to carry a variety of drug classes such as vaccines, peptides proteins and DNA. In this paper the various traditional and novel techniques of preparing various drug loaded polymer nanoparticles are discussed with emphasis on preparing nanoparticles and the influence factor. Also certain issues about the drug load and drug release are covered.

Key words Nanoparticles, Drug delivery, Method of preparation, Controlled release

载药纳米微粒 (nanoparticles) 一般指粒径在 10~1000nm 的固态高分子载药微粒, 主要包括纳米微球和纳米微囊。近年来, 纳米药物载体系统作为新型的药物投递和控制释放系统, 受到国内外学者的广泛关注。用来制备载药纳米微粒的材料主要分为天然高分子和合成高分子两大类。前者主要是多糖、蛋白质、氨基酸等材料; 后者主要有聚酯类、聚酸酐、聚酰胺类以及聚原酸酯类等, 其中壳聚糖、海藻酸、聚乳酸 (PLA)、聚羟基乙酸 (PGA)、聚己内脂 (PCL) 等为广泛应用。药物可以被溶解、包裹在纳米载体中, 也可连接于载体的表面。这些材料在体

赵 硕 男, 24 岁, 硕士生, 现从事载药纳米微粒系统研究。 *联系人 E-mail: jinchang4@hotmail.com

国家科委基础研究快速反应支持项目 (200151)

2002-04-18 收稿, 2002-07-08 修回

内随着其本身的水解, 变成水溶性片断和人体正常代谢产物后, 随人体循环不断从体内排出; 与此同时, 载药纳米微粒包载的药物也不断地在体内得到释放并发挥药效。

由于载药纳米微粒具有比一般粒子更小的体积, 因此具有很多大粒子不具备的优点。纳米粒子进入体内, 可以有效地减少人体网状内皮系统 (RES) 巨噬细胞的吞噬。作为纳米级的微粒, 其能穿越细胞间隙, 可通过人体最小的毛细血管及血脑屏障 (BBB) 并被细胞组织吸收。载药纳米微粒可以控制药物在靶向部位控制释放、减少药物用量、增强药物疗效并降低药物毒性。同时, 药物载体系统可以避免药物活性丧失, 有利于药物的贮藏和运输。由于载药纳米微粒的诸多优点, 使其成为一种很有前途的药物新剂型。

纳米微粒的释放机理一般认为有以下几种: (1) 吸附或连接于粒子表面的药物与粒子脱离; (2) 粒子内部的药物不断向外扩散; (3) 粒子本身不断被融蚀、分解; (4) 扩散与分解同时发生作用。

药物的释放特性主要依赖于载体系统的特性: 当微粒中药物扩散的速度大于其融蚀分解的速度时, 释放机理主要是扩散; 相反, 当药物扩散速度小于微粒融蚀分解速度时, 释放机理主要为分解。释放过程中经常出现初期的大剂量释放, 称谓“突释现象”, 其原因主要是吸附在微粒表面或通过比较弱的键与微粒连接的药物在较短的时间内脱落而造成的, 而不是载体中包载的药物。在突释现象过后, 随着药物的逐步释放, 一般会有一个指数级的延迟, 接下来的纳米微粒中药物释放一般遵循一级动力学^[1~4]。

近年来, 随着蛋白质、多肽类、免疫调节剂、疫苗等生物大分子药物的广泛应用, 载药纳米微粒系统得到了更广泛的关注。载药纳米微粒对于克服这些生物大分子药物半衰期短、易受酶解、难以通过生物屏障等缺点起到了很好的作用。另外, 在抗肿瘤药物、抗病毒药物、抗菌药物的控制释放和基因载体方面的最新应用为纳米药物载体系统的应用提供了更宽广的舞台^[5~8]。

尽管有很多载药纳米微粒制备技术的报道, 但实际中各种技术的选择仍然依赖于聚合物材料的性质、药物用途以及整个治疗需要持续的时间。应用的具体方法应该具备以下要求: (1) 药物的稳定性和活性在整个制备过程中和最终载体系统产品中不能受到负面影响; (2) 粒子大小及其分布符合要求, 药物包封率要高; (3) 粒子的质量及药物释放特性稳定; (4) 制得的纳米粒子应是自由流动的粉状固体, 不能产生聚集和粘连。

1 溶剂挥发与抽提技术^[8]

溶剂挥发与抽提技术又称液中干燥法、溶剂挥发法。传统的油/水(O/W)单乳制备方法是先将高分子溶于一种不溶于水的挥发性溶剂中(例如二氯甲烷), 将药物加入到聚合物溶液中配制成溶液或药物粒子的分散体系, 再在适当的温度和搅拌条件下加入连续水相中, 产生 O/W 的乳液。将乳液在常压下自由挥发或用真空抽提的方法使溶剂挥发, 在这个过程中小液滴表面聚合物逐渐固化。固化的粒子可以通过洗涤、过滤、离心等方法得到粉状产品。

在产生乳液的过程中经常需要加入一定量的乳化剂, 常用的乳化剂有聚乙烯醇 (PVA)、士温、司盘、Poloxamer-188、F-68、明胶等。乳化剂的选择和用量对于粒子的大小和形态相当重要, 实验中也经常选用两种或两种以上的乳化剂搭配使用, 协调作用。一般来说, 乳化剂浓度对于纳米粒子大小的影响是十分明显的: 提高乳化剂的浓度, 会使粒子粒径变小。

纳米粒子的制备过程中, 工艺条件的影响也是及其重要的。例如搅拌速度对于乳液液滴大

小有明显的影响: 搅拌速度快, 聚合物在溶液中分散较好, 制得的粒子粒径比较小; 相反, 搅拌速度慢, 聚合物聚集不易分散, 得到的粒子粒径相对较大。为了得到纳米级的粒子, 通常采用高速搅拌或超声波振荡。同样, 粒子固化过程中的条件对于粒子表面形态和药物释放将产生不同的影响效果: 溶剂的挥发在常压下进行, 制得的粒子表面光滑、释药过程相对平稳; 采用迅速抽提过程来加速溶剂的挥发, 制得的微球表面呈多孔状, 在药物释放过程中容易出现“突释”现象, 这是符合其释药机理的。

影响纳米粒子的因素还包括聚合物的物化性质: 聚合物的分子量大, 则在形成的溶液中粘度比较大, 不利于液滴的分散, 制得的粒子较大; 相反, 低分子量聚合物溶液粘度低, 在溶液中分散好, 制得的粒子相对小。

粒子制备过程中诸多的影响因素还有: 药物的物化特性、药物/聚合物比值、溶剂类型和水相粘度及连续相/分散相比值等^[9]。

传统的 O/W 或水/油(W/O)方法的一个很大的缺点在于其对酶、多肽、蛋白质、疫苗等水溶性药物的包裹率极低, 原因主要是在纳米粒子乳化的过程中, 水溶性药物从油相中脱离并从粒子内部不断扩散进入水相。这不仅降低药物包裹率, 而且同样会在纳米粒子表面留下许多孔状通道, 使粒子在释药过程产生“突释”效应。很多人在通过各种方式努力改变这一技术上的缺点, 他们通过改变水相的 pH、预先采用药物将水溶液饱和、在水溶液中添加脂肪酸等办法提高水溶性药物的包裹率。Yoshiaka 等^[10]通过改进传统的溶剂挥发技术制得包裹水溶性药物的纳米粒子, 其平均粒径为 250nm, 对于包裹率和释放特性的表征结果也很令人满意。

为了提高水溶性药物的包裹率, 人们更常用复乳技术来实现。所谓复乳技术是将药物溶于水溶液, 在不断搅拌的条件下加入到聚合物的有机溶剂溶液中, 先形成 W/O 初乳, 再将 W/O 体系倒入连续搅拌的水相中形成 W/O/W 复合体系。利用这一技术, 对很多传统药物和激素类、多肽/蛋白类等一系列水溶性药物进行了包载与释放实验, 都已经取得了成功。

复乳本身是一种非稳定状态, 容易向单乳转化, 一般有两种过程导致复乳破裂: 一是复乳间的聚集; 二是复乳本身崩溃。因此研究制备和储藏过程中如何保持其稳定性是十分重要的, 这一点引起了很多学者的极大兴趣。Csoka 等^[11]通过实验对复乳技术进行了深入的研讨, 指出了影响复乳稳定性的最主要因素: 初乳的稳定性, 即制备初乳时乳化剂的选择和用量对整个制备过程起到重要的作用。同时, 实验也表明: 初乳中 W/O 比例越低, 乳化剂浓度越高, 则得到的复乳越稳定, 越不容易破裂。

笔者实验室曾经采用复乳法制备了 W/O/W 型聚原酸酯(POE)载抗癌药物甲氨喋呤(MTX)纳米粒子。结果表明, POE 载药纳米粒子与传统药剂相比, 可大大减少服药次数, 延长药物的活性, 提高药物的疗效, 纳米粒子对于特定的器官还具有靶向作用。除此之外, 可以通过控制 POE 本身降解速度来控制药物的释放速度。

另外, 笔者实验室采用 *O*-羧甲基壳聚糖作为复乳乳化剂制备了明胶-聚乳酸(PLA)载 5-Fu 的纳米微粒, 并分别对乳化剂浓度、内部药物浓度、PLA 分子量与浓度、挥发温度与时间对于药物释放的影响进行了讨论。实验中制得的微粒成球性好, 在药物包封率和释放时间上也取得了满意的结果。

2 纳米沉积技术

纳米沉积技术又称自乳化/溶剂分散技术,实际上是一种改进的溶剂挥发法,但由于其成球机理不同和其在纳米粒子制备过程中的广泛应用,这种方法已经完全独立发展为一种纳米粒子制备技术。典型的一种方法就是采用水溶性溶剂(例如丙酮、乙腈)与一种非水溶性溶剂(例如二氯甲烷)相混合,一同作为油相,将要包载的药物溶于其中,由于水溶性溶剂进入水中后自发性分散,迅速穿透油/水界面,降低界面张力,使液滴不断变小,在水中不能溶解的聚合物向界面迁移、沉积并固化,最终形成纳米级粒子。这种技术的优点是重复性好,药物包载量大,粒径均匀。

实验过程中油相里水溶性溶剂的比例对于粒子大小的影响最为显著,水溶性溶剂的比例越高,制得的粒子粒径越小,这主要是因为水溶性溶剂促进聚合物的分散,容易形成较小的粒子^[13]。Thirumala 等^[14]采用纳米沉积技术成功地合成粒径<210nm 的 PLGA 包裹盐酸普鲁卡因粒子,并对其释药过程和制备过程中的影响因素进行了探讨。

Murakami 等^[15]对纳米沉积技术进行了改进,采用单一的水溶性溶剂作为分散相,并改进了乳化剂的配方,相应简化了反应和分离提纯的步骤。实验表明,改进的纳米沉积技术保持了较高的粒子产率和很好的粒子表面形态,为大规模工业化生产创造了方便。

3 聚合法

聚合法是通过将单体溶于含有乳化剂而无引发剂的水相中,在剧烈的搅拌下形成小液滴,再加入引发剂或通过高能辐射在水相中引发聚合,形成纳米粒子。Couvreur 等^[16]曾报道通过机械聚合法生产纳米微粒(粒径<200nm):在酸性水溶液中,以聚山梨酸酯-20 为表面活性剂,在没有辐射和引发剂的情况下,使分散的甲基或乙基丙烯酸酐酯聚合。将丙烯酸酐单体加入有表面活性剂的水溶液中,在常温条件和剧烈的机械搅拌下聚合成烷基丙烯酸酐酯。药物可以在单体加入前溶于聚合物中或在聚合物反应结束后加入。

由于聚合法的聚合机理遵循阴离子反应机理,反应需要阴离子引发剂引发聚合反应,例如:OH⁻、CH₃O⁻和 CH₃COO⁻,聚合产生的分子量不会很高,这样会使粒子在体内很快降解。为了避免这种情况,获得高分子量和稳定的产物纳米粒子,反应要在酸性环境(pH 1.0~3.5)下进行,并需要加入一定的稳定剂和表面活性剂,反应一般持续 3~5h 以上^[17]。

聚合法是制备纳米粒子的重要方法,但由于其制备过程中引入催化剂及未反应的单体,因此在实际操作中必须考虑到其细胞毒性。

4 盐析法

上述的几种方法都在制备过程中引入了有机溶剂和聚合物单体,这些物质都对人体有一定毒性,FDA 对于注射用胶状体系中有毒有害物质有严格的限制标准。为了避免这些问题,有人通过在溶液中加入盐类或其它非溶剂,改变溶液的电荷和离子强度等因素,使聚合物凝聚来制备纳米粒子^[18,19]。这种方法的优点在于整个过程中没有引入有害的有机溶剂和聚合物单体,不必考虑其安全性。

5 水溶性高分子纳米微粒的制备

近年来,除了关注于一般的合成聚合物,很多的科研工作者正致力于采用水溶性聚合物制备纳米药物载体系统的研究,例如:壳聚糖、海藻酸钠、明胶等。对于这些水溶性聚合物有着不同的制备方法。一些对蛋白质有一定包载能力的载体已经可以利用有机溶剂的方法来制备。Calvo 等报道了一种制备亲水壳聚糖纳米微球的方法:利用两水相混合物的离子凝结,一相含有壳聚糖和氧化乙烯的二嵌段共聚物,另一相含有聚三磷酸钠盐(TPP),阳基的氨基和阴基的 TPP 相互作用形成纳米粒子。可以通过改变壳聚糖和 PEO-PPO 的组成来调整纳米微粒的尺寸(200~1000nm)。这些纳米微粒和牛血浆蛋白、胰岛素、寡核苷酸等蛋白质有很好的结合性^[20,21]。

Mao 等通过一系列复杂的凝聚技术成功地制备了用于口服的 DNA-壳聚糖纳米微球。这种复杂的凝聚法也用于生产 DNA-明胶纳米微球。对于包载免疫抗肿瘤蛋白来说,壳聚糖已经被证明是一种比明胶更好的载体。壳聚糖微球的制备同样也可以用乳液聚合的方法:将壳聚糖与要包载的药物一同溶解于水中,在加入乳化剂的液体石蜡中形成 W/O 微球。在稳定的乳液中,还要加入 NaOH 液态石蜡乳液,当和 NaOH 接触的时候,通过聚合物的聚集作用而形成壳聚糖的纳米微球^[22,23]。

将短链聚酯接枝到 PVA 上或通过硫丁基改性 PVA(SB-PVA)可以得到新型可降解聚酯。活化了的 PVA 和硫丁基基团反应可使主链的性质得到改变。通过调节聚合物中各成分的比例可制得新型水溶性聚酯,这些聚合物经过自组装反应,与一系列的蛋白(例如人血清蛋白)可以形成稳定的复合物而得到纳米微粒,而这种聚合物微粒的制备并不需要溶剂与表面活性剂^[24]。

Campos 等^[25]将三聚磷酸钠(TPP)溶液与壳聚糖溶液在磁力搅拌条件下混合,采用离子凝胶化的方法制得含环孢霉素 A(CyA)的纳米微粒,用于眼外药物的长效释放,其平均粒径为 293nm,微球的包封率和载药率分别达到了 73%和 9%。体外实验发现:包载 CyA 的壳聚糖纳米微球可保持 24h 以上的持续释放;而在家兔的体内实验中发现其在 48h 内都可以有效地保持一定的药物浓度,并且在眼内部结构中没有发现 CyA 的存在。这一结果显示:包载 CyA 的壳聚糖纳米微球用于眼外药物的释放明显好于传统的滴注溶液的方式,是一种在临床上很有前途的眼外药物载体。

Janes 等^[26]制备了包载抗癌药物阿霉素的壳聚糖纳米微球,他们将阿霉素的阳离子基团用硫酸葡聚糖屏蔽起来,使其成为一中性分子,然后采用粒子凝聚的方法制得纳米微球。微球平均粒径为 292 ± 42 nm,包封率达到 4.0%。细胞实验中发现,包载在壳聚糖中的阿霉素在细胞外并没有明显的释放,而是进入细胞内部后将活性成分释放。

笔者实验室在实验中曾经合成聚乳酸-*O*-羧甲基壳聚糖纳米微球携带寡核苷酸转染 TJ905 人脑胶质瘤细胞,进行基因载体实验,并对细胞的转染情况作了一系列的检测,用 MTT 法检测载体对肿瘤细胞的抑制率。实验证明,聚乳酸-*O*-羧甲基壳聚糖纳米微球没有细胞毒性,其对 TJ905 人脑胶质瘤细胞的抑制率与脂质体相似,其它的检测结果也说明该纳米微球作为基因载体可达到的对细胞的转染效果与 Lipofectin 相似,某些检测指标还优于脂质体,但其与 Lipofectin 相比具有更大的价格优势,因而具有更广阔的发展前景。

6 嵌段共聚物纳米胶束的制备

最近, 利用双亲性嵌段共聚物制备纳米胶束作为脂溶性药物和基因的投递和释放载体系统受到了极大的重视。这种方法是将亲水性聚合物与疏水性聚合物嵌段聚合, 得到包含亲水部分和疏水部分的两性产物, 再将这类聚合物在溶液中通过自组装过程形成胶束粒子。聚合物的疏水部分聚集在胶束的内核, 通过化学或物理的作用将药物包裹其中, 而亲水部分则聚集在胶束外表面形成栅栏状结构以保持胶束的稳定。正由于这种稳定的结构, 胶束的释放过程缓慢, 可以保持药物的长效缓释和靶向部位的集中释放。胶束中亲水性核部分的聚集是整个胶束形成的驱动力, 这种驱动力包括: 疏水作用力、静电作用力、金属络合力以及嵌段部分的氢键。在栅栏结构包围中的核结构可作为不同药物包裹的“容器”。

Yokoyama 等^[27]合成了 PEG-聚天冬氨酸嵌段共聚物并制备了包裹阿霉素的纳米胶束粒子(粒径为几十 nm)。PEG 作为亲水基团的“壳”, 聚天冬氨酸则为“核”, 阿霉素的氨基糖苷键与聚天冬氨酸侧链上羟基通过碳化二亚基相连, 将药物连接并包裹于其中, 并具备很高的包封率。实验结果表明: 由于内核结构具有强烈的疏水性, 有将近半数的阿霉素是通过简单的物理作用而包裹于其中的, 而并非完全由化学键连接而成。胶束粒子在动物实验中已经取得了很好的疗效: 降低了阿霉素的泄漏、减少了细胞非特异性吸附, 使药物得以在体内长效循环并在肿瘤表面释放。目前, 这种纳米粒子已经进入一期临床实验阶段。

Kataoka 等^[28]同时合成了 PEG 为亲水基团的一系列嵌段共聚物, 包括 PEG-PLA、PEG-PAMA 等复合体, 并分别对蛋白质药物和反义 DNA 进行包裹实验, 同时也在胶束的外表面亲水分子 PEG 上接枝一些多糖分子来增强微胶束的受体靶向作用, 都取得了很好的效果。

Park 等^[29]将半乳糖苷化的壳聚糖与 PEG 接枝, 用来进行肝细胞靶向, 同时提高水中稳定性和细胞穿透性, 然后将半乳糖苷化的壳聚糖-PEG 复合体(GCP)与 DNA 在 NaCl 的 PBS 溶液中通过自组装方式形成复合体系。GCP/DNA 复合体粒子小于 100nm, 并且其尺寸随 GCP 比例的增大而减小, 最小可达 27nm。一系列的表征和细胞实验发现: DNA 本身构象在与 GCP 连接的过程中并没有发生变化, 其与 GCP 的复合体可以有效地保护 DNA 不被体内酶所降解。实验还发现, GCP/DNA 复合体对于肝细胞具备充足的组织选择性和细胞转染率, 是一种安全有效的肝靶向基因载体。

7 展望

载药纳米微粒可靠的生物安全性、超微小的粒径结构、灵活的成分配比和可控的降解速度, 使其具有广泛的应用前景。目前载药纳米微粒还存在着诸多的问题: (1) 药物包载率过低; (2) 口服纳米微粒的吸收机理尚不完全清楚; (3) 生产过程成本过高、工艺不稳定和制备过程中引入的少量不易去除的有毒物质残留。解决这些难题需要我们不断研制新的生物医用材料, 不断发明、改进新的先进而安全的制备方法。随着分子生物学和细胞生物学研究的不断深入, 人类能够从分子水平认识疾病的发生和发展, 并了解伴随癌症等疾病过程不同层次(如组织、细胞、细胞受体等)的特异性生理变化, 这也为纳米药物载体系统的靶向性研究提供了基础。

随着“人类基因组”计划的完成, 将使人们能够针对个体基因进行药物设计, 这对生物降解药物纳米载体也提出了更高的要求。由于现阶段的病毒载体结构高度复杂, 因此具有潜在的重组合的巨大危险, 这使其应用受到了很大的限制。而纳米药物载体系统作为最有前途的非病毒载体避免了这种危险的同时, 还可以进行充分有效地基因转染。尽管在目前的研究水平下,

每单位纳米粒子的转染效率还低于病毒粒子,但随着对输送核苷酸屏障的详细了解、对于病毒粒子穿越生物膜机理和特性的深入研究并加以利用,必将使载药纳米微粒的基因转染效率大大提高。可以乐观大胆地推测,随着人类对于自身细胞和病毒粒子研究的深入,不断提高纳米粒子作为基因载体的可行性、实用性,必然给基因载体系统的研究提供突破性的进展。在可预见的未来,载药纳米微粒作为高效、安全的药物控制释放载体,必将在为人类健康事业产生深远的影响。

参考文献

- [1] 俞耀庭, 张兴栋. 生物医用材料. 天津: 天津大学出版社, 2000: 50~62.
- [2] Spimath K S, Aminabhavi T M, Kulkarni A R et al. J. of Control. Rel., 2001, 70: 1~20.
- [3] 常 津, 刘海峰, 姚康德. 中国生物医学工程学报, 1999, 19(4): 423~431.
- [4] Jain R A. Biomaterials, 2000, 21: 2475~2490.
- [5] 魏 民, 常 津, 姚康德. 北京生物医学工程, 1999, 18(1): 60~64.
- [6] 邓先模, 李孝红. 高分子通报, 1999, 3: 94~98.
- [7] Gregory L, Elias F, Patrick G et al. Adv. Drug Deliv. Rev., 2001, 47(1): 99~112.
- [8] O'Donnell P B, McGinity J W. Adv. Drug Deliv. Rev., 1997, 28: 25~42.
- [9] Govender T, Riley T, Ehtezazi T et al. Int. J. Pharm., 2000, 199: 95~110.
- [10] Kaw Y, Yama H. Eur. J. Pharm. and Biopharm., 1998, 5: 41~48.
- [11] Cosca I, Eros I. Int. J. Pharm., 1997, 156: 119~123.
- [12] 常 津, 魏 民, 姚康德. 中国生物医学工程学报, 1999, 18(2): 216~221.
- [13] Mura H, Koba M. Powder Tech., 2000, 107: 137~143.
- [14] Govender T, Stolnik S, Garnett M C et al. J. Control. Rel., 1999, 57: 171~185.
- [15] Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H et al. Int. J. Pharm., 1999, 187: 143~152.
- [16] Lherm C, H Muller R, Puisieux F. Int. J. Pharm., 1992, 84: 13~22.
- [17] Behan N, Birkinshaw C, Clark N. Control. Rel. Bioact. Mater., 1999, 26: 1134~1135.
- [18] Allemann E, Gurnay R, Doelker E. Int. J. Pharm., 1992, 87: 247~253.
- [19] Allemann E, Leroux J C, Gurnay R et al. Pharm. Res., 1993, 10: 1732~1737.
- [20] Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato J L et al. J. Appl. Polym. Sci., 1997, 63: 125~132.
- [21] Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato J L et al. Pharm. Res., 1997, 14: 1431~1436.
- [22] Mao H Q, Ray K, Walsh S M et al. Bioact. Mater., 1996, 23: 401~402.
- [23] Ray K, Mao H Q, Lin K Y et al. Bioact. Mater., 1999, 26: 348~349.
- [24] Jung T, Breitenbach A, Kissel T et al. J. Control. Rel., 2000, 67: 157~169.
- [25] De Campos A M, Sanchez A, Alonso M J. Int. J. Pharm., 2001, 224: 159~168.
- [26] Janes K A, Fresneau M P, Marazuela A et al. J. Control. Rel., 2001, 73: 255~267.
- [27] Yokoyama M, Miyauchi M, Yamada N et al. J. Control. Rel., 1990, 11: 269~278.
- [28] Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Adv. Drug Deliv. Rev., 2001, 47: 113~131.
- [29] Park I K, Kim T H, Park Y H et al. J. Control. Rel., 2001, 76: 349~362.