

自从 1965 年脂质体首次发表后已经建立了很多不同的脂质体制备技术,要选择一种方便的制备技术取决于被包裹的物质、脂质组合物和药物剂型。谨记脂质体产品应能在医药工业规模下生产,另外,诸如伸展性、产品稳定性和无菌也是重要因素。

由于多种原因,一种可行的制备技术是将易溶于水(如乙醇)的含脂溶液注射到水相中。这是 Barzri 和 Korn 发表的关于最早不用超声制备单层囊泡的替代法之一。含脂溶液注射到水相缓冲液体系时容易形成“沉降”然后自形成囊泡。形成的囊泡大小取决于脂质浓度、搅拌速度、注射流量和脂质种类。后来 Kremer 等人优化了这种办法,改变了制备条件。结论是他们假定注射乙醇里的脂质浓度是影响脂质体大小的主要因素。此外水相中乙醇浓度限制于大约 7-10 (v/v),用于限制高封装量。此方法的优点是简单性,无潜在的有害化学物,物理处理额,而且还可以放大操作。但是受限于典型的搅拌批次量级,产品很难达到重现性。由于某些脂类在乙醇中的溶解度低,只能产出低浓度的囊泡。而高浓度的情况下脂质体相当大且大小不均匀,反过来需要额外的处理才能达到药物目标。

本研究的目的是基于乙醇注射原理研发一种新的制备方法,这种新的方法应该避免那些已公开方法的缺点。安全性和简易性是应补充的最低要求。

这里我们展示乙醇注射技术的改进,呈现了由发明的交叉注射模块制备的脂质体悬浮液数据。对囊泡形成过程的影响参数进行了大量的实验。研究了注射压力和速度各自的影响,最佳制备工艺的缓冲液流量和脂浓度。此外,我们检查了已经形成的脂质体对进一步形成囊泡的影响。因此我们将包含已形成囊泡的水样悬浮液打入到缓冲液容器中,用连续模式或批次模式——打入第二个容器。

## 原料和方法

### 原料

二棕榈酰磷脂酰胆碱 ( Genzyme pharmaceuticals ); 胆固醇 ( Avanti ); 硬脂酰胺 ( Sigma ); 制作囊泡用的二棕榈酰磷脂酰胆碱、胆固醇和硬脂酰胺的摩尔比是7:2:1。通常使用10 $\mu$ molDPPC/ml脂浓度的水溶液，而有些实验使用20mmolDPPC/ml的缓冲溶液。磷酸盐缓冲盐溶液 ( PBS , PH=7.2-7.4 ) 用作水化缓冲。所有试剂都为分析纯。

### 脂质体制备

用交叉射流技术制备脂质体。如图1所示，制备系统包含交叉射流模块、极相缓冲液罐、一个乙醇/脂类溶液罐和氮气压力装置。本研究中所用交叉射流模块是由两根不锈钢管子焊接而成的十字。模块的连接处代以由火花腐蚀钻出的注射孔 ( 150和250 $\mu$ m钻孔 )。

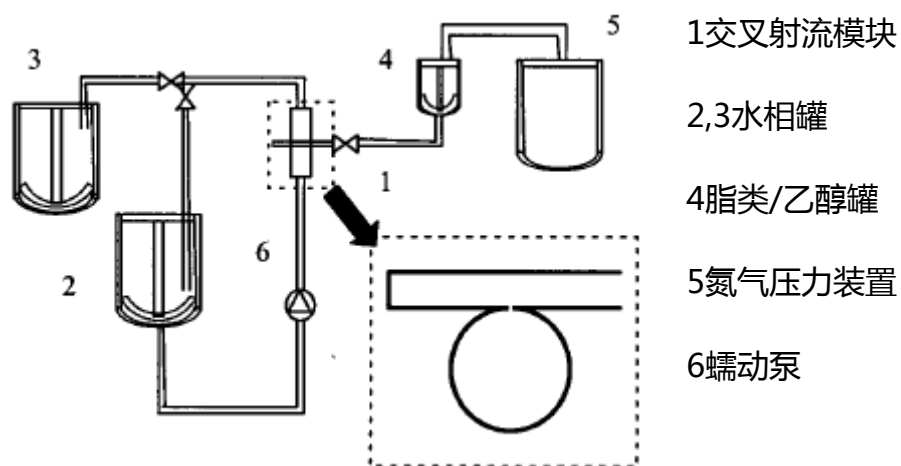


图1 交叉射流系统示意图

脂类混合物在55 $^{\circ}$ C下搅拌溶解于95%的乙醇中，缓冲/蛋白溶液也加热至55 $^{\circ}$ C ,制备量从100ml到2400ml。水相溶液经蠕动泵从罐2打到罐3( 持续模式 ) 或批次模式下打回罐2。当极相通过交叉射流模块时，由氮气压力装置提供不同

压力降乙醇/脂类溶液注射到极相中。

## 脂质体粒径分布

脂质体粒径和粒径分布是用新的流动细胞计数方法,粒径的结果是由装备有一个5W氩激光源的FACS(Becton Dickinson, San Jose, CA)。激光源调到波长488nm,输出为500mW。线性放大中的F11用作阈值参数(700V,增益16)。前散射高度(FSC-H,散射角10°C)和边散射高度(SSC-H,散射角90°C)设置到对数级以便容纳26nm-1um的整个范围。每个样品中测量10,000个颗粒。

## 脂质体观察

用负染色技术或冷冻断裂技术的电子显微镜测量脂质体的构象行为。用Phillips CM 100电子显微镜做细微研究。

## 结果

在恒定脂浓度的情况下制备150ml脂质体悬浮液,实验在1.2bar注射压力下通过150和250um注射孔模块。缓冲液流量保持在2700ml/min,脂质体悬浮液在55°C下制备,明显高于脂类混合物的转换温度。图2中的数据显示在注射压力和缓冲液流量恒定的情况下,注射孔的孔径没有影响到囊泡的尺寸和粒径分布。

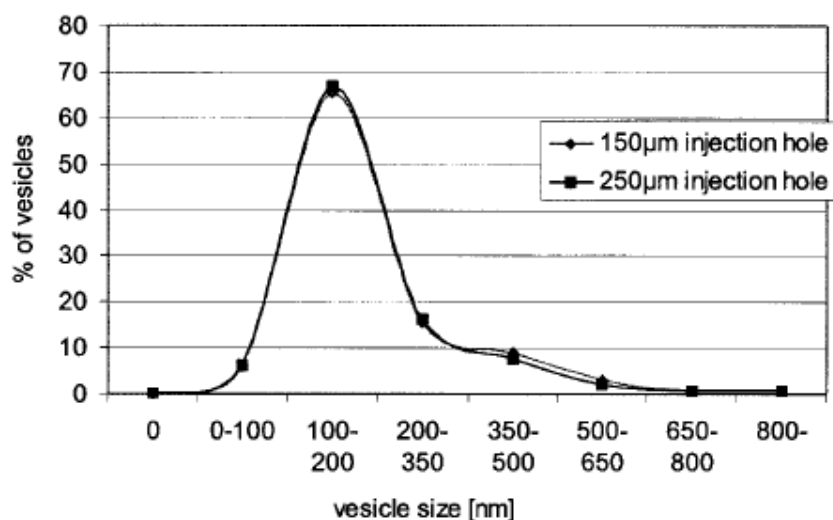


图2 1.2Bar下150和250um交叉注射模块下制备脂质体囊泡对比

## 注射压力变化

注射压力范围是0.3-2.6Bar。所有囊泡批次中每ml缓冲溶液都含有10umol脂类和7.5%的乙醇 (v/v)。所有试验都用150um交叉注射流模块，缓冲液流量保持稳定在2700ml/min。如图3所示，囊泡尺寸和均一度效果随着注射压力增加而增加。当用超过1Bar的压力将脂类/乙醇溶液注射到水相中，85%的囊泡尺寸都小于350nm。2.6Bar条件下制备的脂质体悬浮液的分布最窄，超过70%的囊泡尺寸都在200nm附近，只有5%尺寸超过350nm。

## 缓冲液流量变化

缓冲液流量是由蠕动泵控制的，流量范围500到2700ml/min，研究是在250um交叉注射流模块下进行，脂类浓度和注射压力保持恒定。图4显示最低缓冲液流量下制备的脂质体悬浮液相当不均匀，分布最宽。但是1500和2700ml/min缓冲液流量下制备的脂质体分布差不多。脂质囊泡主要分布在200nm左右，随着缓冲液流量增大200nm处囊泡的百分率增大，意味着形成更多的均质囊泡。

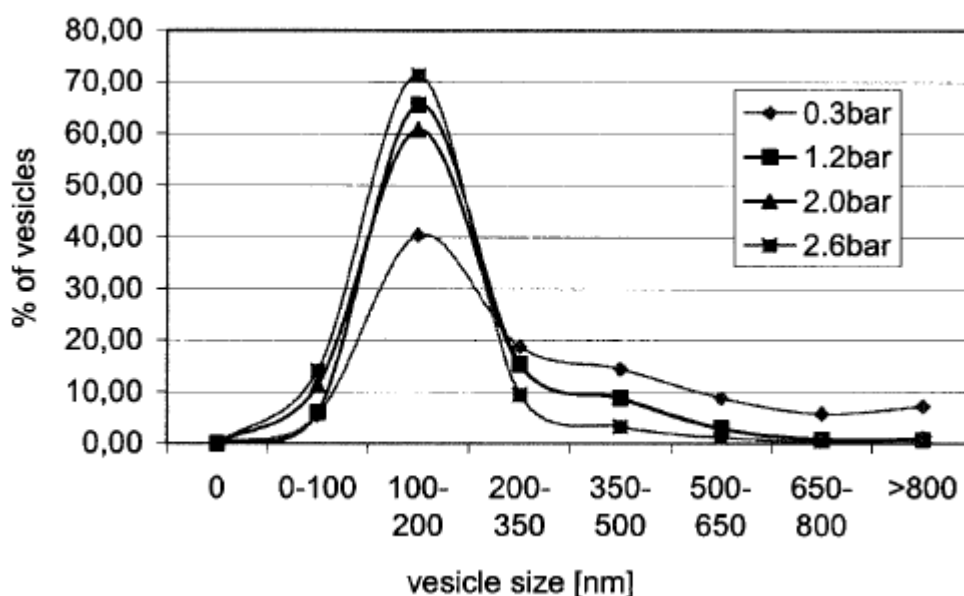


图3 0.3-2.6Bar注射压力下150um交叉注射流模块制备的囊泡分布

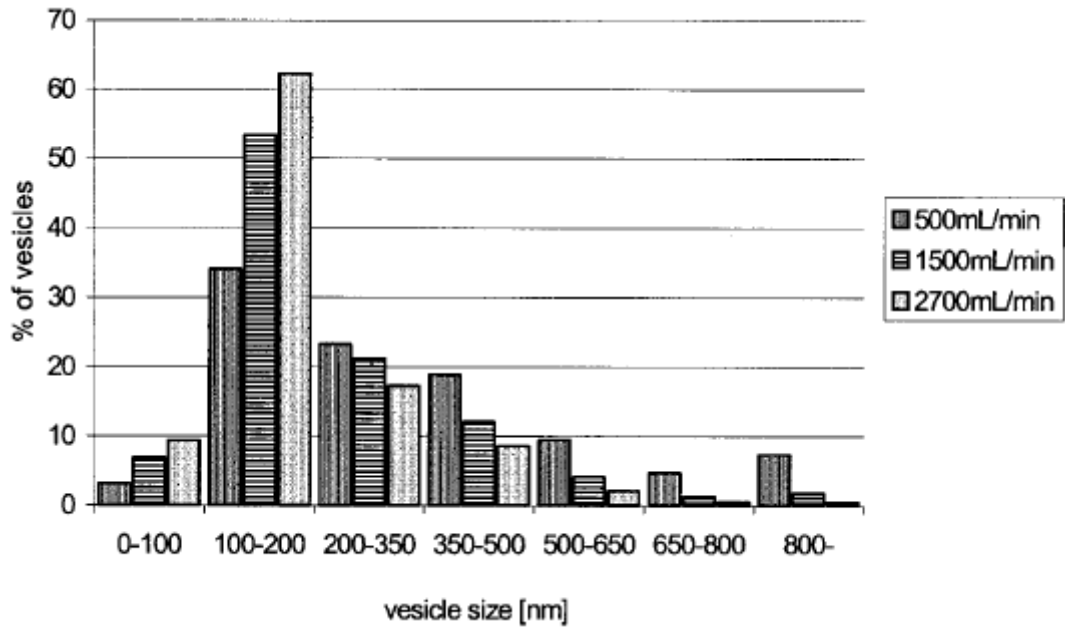


图4 250nm交叉射流模块相同压力不同PBS流量脂质体批次对比

### 系统性能变化

之前所有的试验都是在批次模式下进行的,进一步脂质体配方的囊泡形成影响的估计是通过批次模式和持续模式的比对完成。因此两种试验的缓冲液流量都是900ml/min,都是在1.6Bar压力下注射脂质乙醇溶液通过250um注射孔。如图5显示系统性能的改变没有显著影响囊泡形成过程。两种试验形成的囊泡分布都比较窄,90%的囊泡都小于500nm。

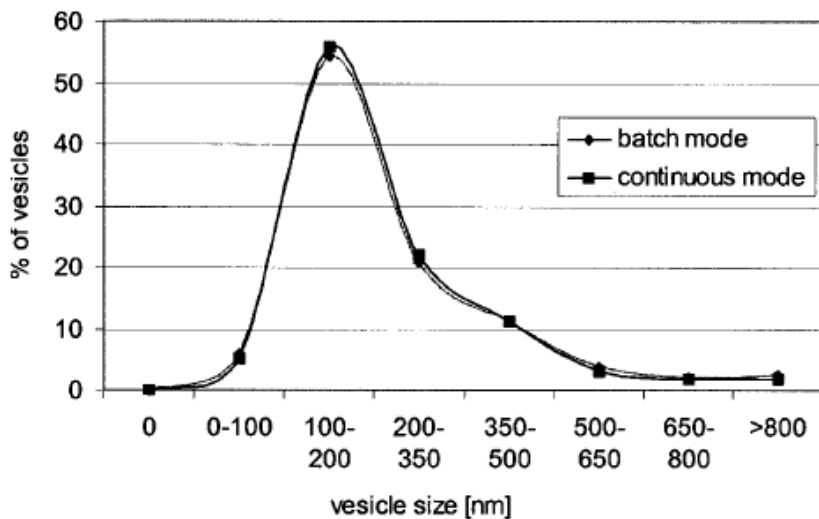


图5不同缓冲液注射模式下制备的脂质体批次对比

## 脂质浓度和注射压力变化

脂质浓度是250um交叉注射模块下优化程序的另一个可变量，选用10或20umolDPPC/ml水相浓度。注射压力在1.2-4.8bar。其他参数都保持不变，图6数据明确显示特别高浓度脂质溶液容易形成宽分布脂质体溶液。但随着注射压力增加，脂质体分布变窄更加均质。

### 再现性

再现性的演示通过在2.4bar下将浓度10umolDPPC/ml脂质/乙醇溶液注射到缓冲液中。三个试验中使用250um交叉注射模块，缓冲液流量保持恒定在2700ml/min。制备量是150到200ml，数据结果显示三个批次囊泡分布一致。

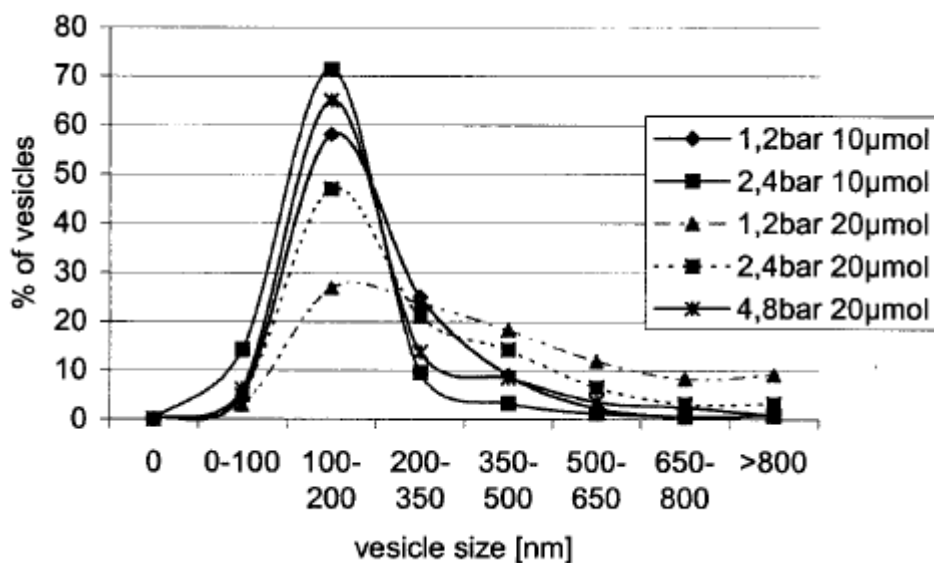


图6 1.2和2.4bar压力下含10和20umolDPPC/ml缓冲液形成囊泡对比

### 产量放大

批次1包含300ml缓冲溶液，批次2是其2倍，批次3是其8倍。所有试验中的缓冲液流量都调整至400ml/min，注射压力均为2.4Bar，图8中的结果显示了该制备程序的重现性和各批次量的不同处。

## 讨论

关于建立可扩展的脂质体制备技术已经做了很多研究,我们的研究致力于建立一种新的基于乙醇注射技术的脂质体制备程序。因此必须要设计一种新的制备设备,并考虑到几个方面例如能定义脂质体悬浮液的制备和重复性条件。此外,制备设备的产量不受无菌囊泡生产影响。完成卫生级设备的建立后,可进行灭菌,然后重点是表征影响囊泡生成过程的参数。

因此我们将试验集中在(1)注射孔直径(2)缓冲液流量(3)注射压力(4)乙醇溶液里的脂质浓度(5)系统模式。

设备的主要项目注射模块,有150和250um两种孔径。为了评估注射孔直径的影响,做了150和250um模块的制备对比。这些试验中缓冲液流量和注射压力保持不变,而注射速度随孔径增大而增大。从图2得出生成的囊泡悬浮液粒径分布相似。基于此得出注射孔直径不是粒径和制备囊泡悬浮液的影响参数,后续采用不同的缓冲液流量和注射速度试验。图4明确显示要想制备小且均匀分布的脂质囊泡,缓冲液流量就需要达到一个最小值。这个假设可以通过多次试验证实。这个事实会引起重视,因为传统的乙醇注射技术中,从涡流中心到容器壁有一个速度梯度变化。这会影响到囊泡的产生过程。这种新的交叉注射流技术允许在蠕动泵控制下的自定缓冲液流量下进行。当需要提高产量时这点尤为重要。

然而,注射压力可能是更加影响形成囊泡的均匀度的参数。为此制备了很多脂质体驯服也来评估注射压力在脂质体配方中的影响。这些试验显示要制备均匀分布的脂质体悬浮液就需要达到一个最低压力。图3显示低于下限的压力(0.8Bar)下制备的囊泡分布极度不均匀。超高压下的批次囊泡分布都比较窄。这在如图6显示的高脂质浓度情况下尤为重要。另外电子显微镜研究显示形成了单层囊泡。

这种现象可以通过Lasic建立的双分子层平面片段 ( BPF ) 理论来解释, 根据这一概念, 小圆盘状胶束在全部囊泡形成过程中作为共用中间体。在乙醇注射技术中通过改变溶解度条件来形成双分子层平面片段。溶解在有机相中的磷脂在相边界上生成水/气泡, 当气泡上升时析出双层膜形成小泡状的BPF。我们认为增加注射压力能影响气泡形成过程, 更高的注射压力能形成更小均匀的气泡和额外的更小BPF。

这可能是由于更高压力的注射将脂质/乙醇溶液分散到更小的气泡。气泡变小后脂质沉淀也变小随后形成双分子层片段。这些片段的囊泡形成狭窄分布的囊泡。增加注射压力的20mmol DPPC/ml脂质体悬浮液的结果显示高注射压力可以形成更均匀分布的囊泡 ( 图6 )。这种现象也需要通过高缓冲液流量来支持, 因为双分子层片段在注射孔传输地越快, 那聚集成大BPF形成大囊泡的可能性就越小。为了理解膜的构象行为, 必须引入一些例如弯曲弹性和曲率的理论概念, 虽然这是一个非常有趣的方面, 但它不是本研究的主题。

我们必须指出试验中所用的脂质浓度比Kremer等人发表的乙醇注射试验数据中所用最高脂质浓度还要高5-10倍。因为脂质浓度是最影响囊泡形成过程的参数, 我们的结果跟以前发表的数据很难做比较。

进一步的试验将集中在系统性能上。图5中的结果显示持续模式和批次模式生成的脂质体粒径没有差别。为表达对Lasic定义的尊敬 ( 持续工艺模式定义为反应物的开始端接在另一个的末端, 形成脂质体的产品链 ), 持续模式对于工业化生成脂质体是很有潜力的工具。做了好几个试验来证实这种制备程序的重现性和产量升级的可靠性。图7显示在相同条件下制作的三个批次脂质体数据的重复性, 所有三个试验数据显示囊泡尺寸和粒径分布都很相似。通过放大实验得到了



相似的结果，并再次证明了这种新型脂质体制备技术的稳定性和成长性。

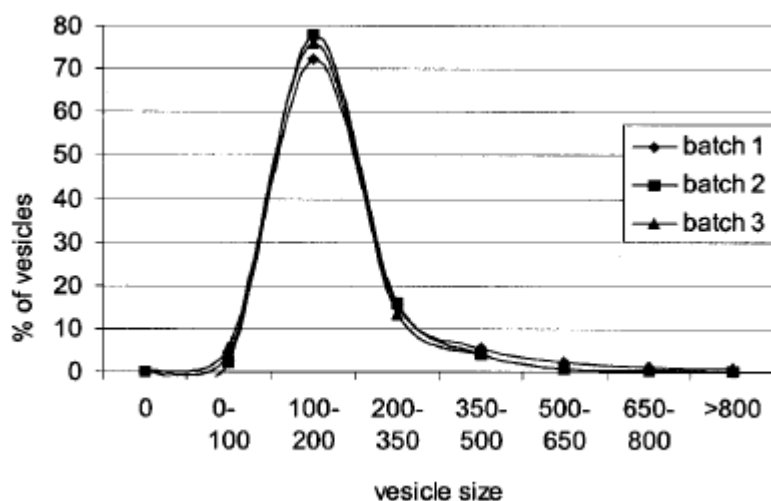


图7 2.4Bar最大缓冲液流量下制备脂质体悬浮液的重复性数据

## 结论

我们在本研究中展现了一种新的可用于持续、升级生产优良脂质体悬浮液的脂质体制备技术，提供了适当溶液里的可选脂质组分和优异的生产参数。对比已发布的脂质体批次生产工艺，我们新的生产程序似乎对于大产量的无菌脂质体悬浮液更为高效。

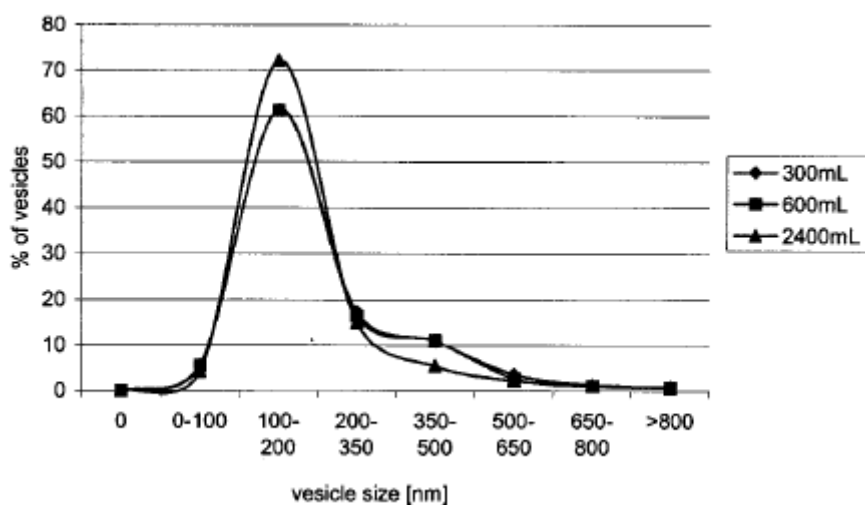


图8 增大制备产量后脂质体悬浮液囊泡的粒径分布