[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
A61K 9/127

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95190971.1

[45]授权公告日 2003 年 1 月 8 日

[11]授权公告号 CN 1098067C

[22]申请日 1995.9.28 [21]申请号 95190971.1

[30]优先权

[32]1994.9.30 [33]EP [31]94810570.5

[86]国际申请 PCT/IB95/00802 1995.9.28

[87]国际公布 WO96/10393 英 1996.4.11

[85]进入国家阶段日期 1996.5.30

[73]专利权人 勃勒柯研究有限公司

地址 瑞士卡鲁日市

[72]发明人 埃尔韦·图尼耶 米歇尔·施奈德尔 克里斯蒂昂·吉约

[56]参考文献

EP0119020A2 1984. 2.14 A61K9/50

US4485054A 1984.11.27 A61K9/50,B01J13/02

US4508703A 1985. 4. 2 B01J13/00,A61K9/42

US4619795A 1986.10.28 B01J13/02,A61K9/50

审查员 田洪扬

[74]专利代理机构 北京三幸商标专利事务所

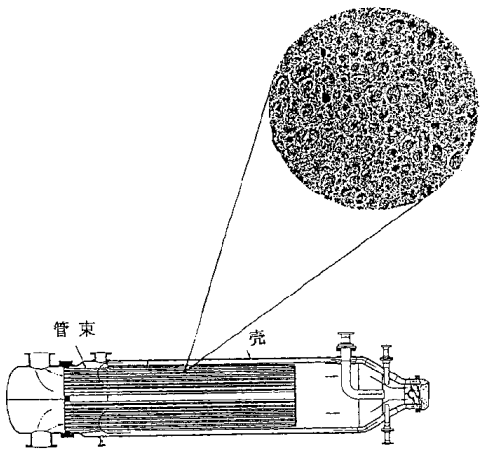
代理人 刘激扬

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 5 页

[54]发明名称 脂质体前体、高效包载力脂质体的制备方法、装置及应用

[57]摘要

本发明涉及作为脂质体泡的前体干的沉淀，是三维展开结构，密度在 0.01 ~0.001 克/立方厘米之间。本发明还涉及高效包载力脂质体的制备方法：在一反应器中至少一种有机溶剂溶解一层或多层形成脂类的薄层形成一种溶液，蒸发有机溶剂形成展开的三维结构多孔性脂类物质，使这些物质与水溶液载体相接触，生产包装了载体相的脂质体。还涉及装置，包括按照本方法生产，作为脂类沉淀的支撑物或介质表面，它们是排列的管材或不溶性材料。



ISSN1008-4274

1. 以干脂沉淀形式的脂质体载体前体物质，是通过以下方法得到的，在一个反应器中，用至少一种有机溶剂中溶解一层或多层的形成脂类的薄层形成一种溶液，所述脂类选自下列磷脂：磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇和这些物质的混合物，通过蒸发溶剂沉淀脂类，使脂类沉淀与水溶液载体相相接触，生产包装载体溶液的脂质体载体；其特征是，通过蒸发溶剂得到的脂类沉淀是干性展开的三维泡状结构，其堆积密度低于 0.1 克/立方厘米。

2. 如权利要求 1 所述的载体前体，其中脂类还包括从以下选择出的物质：磷酸三十二烷、胆固醇、麦角甾醇、植物甾醇、谷甾醇、羊毛甾醇、α－生育酚、硬脂酸、硬脂酰胺和这些化合物的混合物。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的载体前体，其中展开三维脂类沉淀的堆积密度低于 0.08 克/立方厘米。

4. 如权利要求 3 所述的载体前体，其中展开三维脂类沉淀的堆积密度介于 0.05 和 0.001 克/立方厘米之间。

5. 如权利要求 4 所述的载体前体，其中展开三维脂类沉淀的堆积密度介于 0.02 和 0.01 克/立方厘米之间。

6. 如权利要求 1 所述的载体前体，其中展开三维脂类由网络状惰性多孔性填料支撑。

7. 如权利要求 6 所述的载体前体，其中惰性多孔性物质包括管材的排列或惰性填料的排列。

8. 如权利要求 7 所述的载体前体，其中管材内径为 0.5 毫米至 5 毫米之间，壁厚为 0.5 至 2 毫米之间。

9. 如权利要求 7 所述的载体前体，其中可供选择的惰性填料选自：空心玻璃球、网格化碳、网格化透明碳、网格化金属、玻璃或金属棉和玻璃或金属纤维。

10. 制备高效包载力脂质体的方法：在一个反应器中用至少一

种有机溶剂中溶解一层或多层的形成脂类的薄层形成一种溶液，所述脂类选自下列磷脂：磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇和这些物质的混合物，通过蒸发溶剂沉淀脂类，使脂类沉淀与水溶液载体相相接触，生产包装载体溶液的脂质体载体；其特征是，通过蒸发溶剂得到的脂类沉淀是展开的三维泡状结构，其堆积密度低于 0.1 克/立方厘米。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其中堆积密度低于 0.08 克/立方厘米。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其中堆积密度介于 0.05 和 0.001 克/立方厘米之间。

13. 如权利要求 10 所述的方法，其中反应容器包括网络状的惰性多孔物质或填料，充当脂类沉淀的支撑物或介质。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其中填料选自网格化碳、网格化透明碳、网格化金属、玻璃或金属棉和玻璃或金属纤维。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其中惰性多孔性填料为流体化的空心玻璃球。

16. 如权利要求 14 所述的方法，其中惰性填料包括：包装在柱子中作为反应器的拉西环，且脂类溶液从上部以滴加的方式引入。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其中有机溶剂蒸发后，脂类沉淀与水质载体相相接触，从柱子较下部引入。

18. 如权利要求 10 所述的方法，其中蒸发是在高于周围环境温度或在减压状态下进行。

19. 如权利要求 10 或 13 所述的方法，其中蒸发采用吹入空气或一种惰性气体通过反应器来进行。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中蒸发采用吹入氮气通过反应器来进行。

21. 如权利要求 10 或 13 所述的方法，其中有机溶剂可选自：氯仿、石油醚、甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、正丁醇、叔丁醇、戊醇、己醇、戊烷、己烷、庚烷、环己烷和这些物质的混合物。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其中有机溶剂是两种溶剂的共沸混合物。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中有机溶剂是乙醇和环己烷、氯仿和甲醇，或异丙醇和己烷的混合物中的一种。

24. 如权利要求 10 所述的方法，其中干脂三维展开结构的表面积与体积的比值介于 10 到 0.5×10^5 之间。

25. 如权利要求 10 所述的方法，其中水质载体相包含有生物活性物质。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其中活性物质为对照试剂。

27. 如权利要求 26 所述的方法，其中对照试剂为碘化的 X－线对照试剂。

28. 如权利要求 27 所述的方法，其中脂质体载体的碘和脂类的比值至少为 2.75。

29. 包含有分散于载体液体的水化脂类微粒的一种脂质体载体悬浮液，其特征是，所述载体由权利要求 1－7 中所述载体的脂质体载体前体的水化和分散得到的。

30. 对照试剂包括权利要求 29 的脂质体悬浮液。

31. 使用权利要求 1－7 的三维脂类结构生产高效包载力的脂质体。

32. 使用权利要求 1－7 的三维脂类结构生产诊断用对照试剂。

33. 按照权利要求 10－26 的方法生产高效包载力的脂质体的生产装置，包括有进口和出口的反应器、真空泵接口、冷却或加热装置、控制装置和填料；其特征是，填料由紧密填充的惰性物质管材排列而成，管材内径介于 0.5 毫米至 5 毫米之间，壁厚为 0.5 毫米至 2 毫米之间。

脂质体前体、高效包载力脂质体的制备方法、装置及应用

技术领域

本发明涉及干脂类化合物形式的脂质体前体和高效包载力的脂质体的制备方法：通过在反应容器中用至少一种有机溶剂溶解一层或多层用于制备脂类化合物的膜层，通过将溶剂蒸发沉淀得到脂类化合物，将脂类化合物沉淀与水溶液载体相相接触产生包载溶液的脂质体载体。本发明还涉及实施本方法的装置，包括脂质体前体的对照试剂和用对照试剂作为前体的方法。

技术背景

脂质体载体其连接外膜由两层或多层脂类分子组成，被认为是能够提高多种药物和对照试剂治疗效果与诊断效果的药物传递系统。用多种不同的抗生素和 X－射线对照试剂进行的实验表明：用脂质体包装药物和对照试剂可获得较好的治疗活性或高安全性的较好的对照。人们对脂质体作为药物包装系统的极大关注表明：这类产品的成功改进和商品化需要能够大规模生产具有合适特性的脂质体的重复性好的方法。因而人们已经建立了能够不断地生产特定大小、浓度、大小分类和包装力而不必考虑脂类化合物混合物性质的方法。目前采用的生产效果好的方法的实施，这些方法能够生产一系列活性物对脂类比的脂质体。研究结果以及由于脂质体行为实际上随不同的产物参数而变化，人们提出许多种不同的制备方法。

常规脂质体制备方案包括一系列步骤，包括在圆底烧瓶中用易挥发的一种有机溶剂或多种有机溶剂混合物溶解多层或双层组成成份(磷脂或磷脂与其他脂类比为胆固醇的混合物)，然后在能够不分相的条件下(温度和压力)使有机溶剂蒸发掉。有

机溶剂蒸发后，干脂混合物通常以薄层方式沉淀在反应容器的壁上，用包含有缓冲液、盐、特定的试剂和活性物质的水相介质水化而包装它们。脂质体在水化过程中形成并且靠它将部分的水相介包进脂质体中。水化可以在或不在通过搅拌、超声或微流化加强的情况下完成，然后通过一层或多层的聚碳酸盐滤器。游离的未被包装的活性物质能回收，产品过滤、使无菌，可选择真空干燥包装。

水化以及其他的一些步骤影响形成的脂质体的类型（大小、脂质层数、包裹体积）。干脂的性质、表面区域和多孔性具有相当重要的意义。有结果表明：水化和包装在干脂层很薄时非常有效。这就意味着脂类化合物的量越大，沉淀脂类化合物所需要表面也越大，而且也意味着即使能够使用玻璃珠和其他不活泼的不溶性颗粒来增加用以脂类薄层沉淀的表面积，但薄层膜方法仍只停留在实验室方法。

另外的一些制备脂质体的方法无经发表或申请了专利诸如US-A-4,529,561, US-A-4,572,425等，这些方法包含：将脂类化合物的有机溶液注射到水介质中，并不断的去除有机溶剂，用喷雾干燥、真空干燥、显微乳化、微流体化等作用。

在US-A-4,935,171(Vestar)中提出一种解决大规模生产脂质体的方法。有一种发表的方法，通过蒸发有机溶剂在蒸发容器中形成薄层样的均质的一致的脂质化合物膜，用它来生产制备商品量的脂质体。在蒸发容器内壁上形成的薄脂类化合物层干燥后，这些沉淀在原位在马达搅拌下与水相水合。尽管该资料中所用方法似乎是一步的，但脂类化合物沉积的表面对反应器且体积比率趋势如果不是勉强的话也只比圆底烧瓶的比值稍好一点。就经济合理和竞争性而言其容器的空间得率或产率仍然太低。

脂质体制备的不同方面已经被提及，而且很多的改进方案和大规模生产的问题的解决的不同方案也已提出。比如WO-A-86/00238, WO-A-87/00043, US-A-4,753,788 和 US-A-4,781,

871 等这些资料都提出预先制备的多层载体用快速冷冻而后冻融处理能提高其包载能力，用压出技术制备多层膜脂质体能提其大小分类等等。

到目前为止仍没有对大规模工业化生产方法提出建议这种方法在相对小的反应器空间里处理大体积液体而其重复性好所控制产品的参数。众所周知的前面的程序或工业化生产规模的程序一般都比小批量生产量有关，在这些程序中稀释的脂质体溶液的大体积的处理需要很大的壁和反应容器空间，同时也需要处理大体积的溶液和溶剂。事实上由于相对低的空间得率或生产率，这些方法对大规模商品化生产来说有许多的麻烦而且花费很高。

概要

简要的概述本发明涉及以三维结构方式支撑或不支撑展开脂类化合物，其大批量生产的密度低于0.1g/cm³，优化的条件低于0.08，更优的在0.05~0.001之间，甚至在0.02~0.01之间。通过这种支撑结构就意味着脂质多孔性沉淀在不溶性支撑物上网状或排列形成。形成沉淀的脂质化合物从合成的或天然的，饱和的和不饱和的磷脂中选出来，这些脂类包括磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇以及它们的混合物。这些脂类还包括一些从磷脂酰二十六烷醇、胆固醇、麦角固醇、植物甾醇类、谷甾醇、羊毛甾醇、α－生育酚、硬脂酸胺以及这些物质的混合物中选出的脂类。

本发明还涉及一种制备脂质体的方法，该方法能通过一层或多层形成脂类化合物的薄层溶解在至少一种有机溶剂中形成具有高效包载力的脂质体。这种脂类溶液被装入一合适的反应容器中有待蒸发后使用，靠蒸发这些干脂形成展开的三维多孔性结构，其大量的密度低于0.1g/cm³，优化的低于0.08，更优选的在0.05~0.01之间甚至达到0.02~0.01之间。此后，这些多孔性结构物与水溶液载体相相接触而产生包装了部分载体相的

脂质体载体。

本发明甚至包含用于按上述方法制备高效包载力的脂质体载体的装置，包括反应器带有入口进口，与真空泵连接口、冷却或加热以及控制方式的装置接口和填料包括一种不溶物质构成的紧密包裹的管形材料。更可取的是这些管形材料是不锈钢管材，其内径为0.5~5毫米，壁厚为0.5~2毫米。填料是可选择的，可以是固定也可以是移动的比如流体化的，还包括Raschig环，空玻璃球，网状化碳、网格化透明碳、网格化金属、 玻璃或金属棉和玻璃或金属纤维。

本发明的三维脂类结构非常适合于大规模生产高效包载力的脂质体。

当本发明的三维脂类结构物与含有对照介质的水介质载体相孵育时，特别适于诊断的对照试剂脂质体的制备。

图形简介

图1.本发明的反应器， 带有扩展的三维脂质结构的剖面的图示简图。

图2反应器中不溶性管形材料排列简图。

图3脂类沉淀对浓度的线形图。

图4脂类沉淀对线性速度图。

图5 用本发明的展开的脂类结构物生产对照介质脂质体的流程图。

详细说明

本发明基于这种偶然的发现，这种发现能够得到合适的脂质体且反应器容量提高，如果在生产脂质体载体的过程中在与水介质载体相与脂类沉淀物接触前通过蒸发溶解于一种有机溶液中的形成脂类的一层或多层膜的溶剂，该溶液至少有一种有机溶剂，而得到脂类沉淀，该沉淀大批量的密度低于0.1g/cm^3，优选的低于0.08更优选的介于0.05~ 0.001之间，甚至在0.02~

0.01之间，且该沉淀展开成三维结构物。尽管这出乎意料的结果的确切原因还没有完全搞清楚，估计本方法能够提供超常大的表面对体积的比值，这使得随后水合作用更充分。本方法使得生产特定大小和类型的脂质体产率提高，并且容易大规模生产和控制。有大的表面对体积的比值展开脂类化合物结构提高了反应容器的空间得率，此技术引起工业界的兴趣。另外，当使大规模生产容易进行和提高生产率，本方法还提供了更多的优越性，包括较快的反应转换时间，水化步骤容易控制、缩短工艺时间、廉价材料的使用和沉淀，溶剂蒸发、展开的脂类化合物结构的水化作用、生成的脂质体载体的消毒在同一反应器中进行。

本发明的纯脂类化合物多孔性结构的开成具有很大的表面对体积的比值已经确立。但不幸的是由于展开结构的很高的脆性而使展开的脂类化合物结构的单位体积或重量的确切表面区域的仍没有确切的得到。然而，本发明中1 克展开结构物总的表面积的保守估计值可能介于0.1~50平方米，这意味着表面积对体积的比值在$10\sim0.5\times10^{5}$之间。

展开的三维结构的脂类结构可以通过蒸发反应容器中的有机溶剂而得到，该反应容器中有不溶性多孔网状物或用于沉淀脂类由实物支架或介质表面承担的支持物。这种不溶性网状物可以是任何具有相对大的表面对体积比的普通物质，包括经排列成阵势管形材料或填料，诸如空的玻璃球，网格化碳、网格化透明碳、网格化金属、玻璃、陶瓷或金属绵以及金属、玻璃或陶瓷纤维。当使用排列成阵势的管形材料时，管形材料的尺度应当优化以使表面积对体积的比值达到最大。用本发明在给出的图形中表示的反应器按其发展和特性作实验，管形材料内径在0.5~5毫米，壁厚0.5~2毫米时所得到好的结果，然而另一种图案的反应容器可能用另一组管形材料尺度才是最佳。尽管螺旋式的排列也可能可以，由于重力的作用脂类化合物溶液可扩散到管形材料的内部和外部，纵向排列的方式是最优的。

为了便于均匀的脂类化合物薄层沉淀，可使不溶性填料轻轻流动或用脂类化合物溶液从上面和左面缓慢滴加到由Raschig环或上面提及的不溶性材料填充的填料中。以滴加的方式使脂类化合物溶液与支撑物接触能使沉淀物厚度得到有效的控制，由此用滴加塔式处理能得到更好的结果是肯定的。多余的脂类化合物就不断的除去，由此支撑物全部表面的均匀的脂类化合物厚度就得到保证。为了协助脂类化合物溶液在填料表面形成均匀结构，空气或不溶性气体比如氮气以与滴加方向反向的方式引入一定时间。通常该气体是冷的，然而在特定条件下可以考虑用特定选择的热气体将有助于脂类化合物薄层的干燥和展开。

由纯的或通常纯度的干的展开的沉淀物形成三维结构后，使沉淀物与水介质载体相相接触。根据反应器的图载体相可以在反应器的低末端引入，例如用滴加塔或流体化床图式，如果用固定排列的管形材料可以由反应器柱上面引入。使用的水介质载体相可以是纯的或可以含有生物活性物、对照试剂或者二者兼有的水溶液。事实上按照本发明的方法任何生物活性物都可以包装到脂质体中。这类物质包括但并不限于抗菌类化合物，比如庆大霉素、抗病毒化合物比如来福霉素，抗真菌化合物如两性霉素B、抗寄生虫化合物比如锑衍生物， 抗肿瘤药物比如丝裂霉素C、阿霉素和顺铂、蛋白比如白蛋白和脂蛋白、 免疫球蛋白、毒素比如白喉毒素、酶类比如过氧化氢酶、激素、神经递质、不透X线化合物为^{99}TC,荧光化合物如羧基荧光素、消炎药如水杨酸和布洛芬、麻醉剂如狄布卡因和利多卡因。

用碘化的 X－线对照剂如iopamidol iomeprol, iohexol iopentol iotrolan iodixanol, ioglucol 等可得到漂亮的结果而且包载力高。按本发明制得的脂质体载体其碘对脂的比例至少为2.75。

在高于周围环境温度或减压或二者兼有的条件下蒸发有机溶剂或有机溶剂混合物。实验表明蒸发速率对脂类结构的展开

程序影响很大。因此如得到最佳的展开，可以适当的控制反应器内部总热量和压力。这种控制在蒸发的后期具有相当重要的意义，比如当溶剂变浓，变粘的时候。此时，略为减压可导致较快的展开方式(起泡沫)。通过平衡加在溶剂或溶剂混合物温度和压力，可以得到不同展开程度的脂类化合物沉淀，这一点已被确证。当有机溶剂选择石油醚、氯仿、甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、正丁醇、叔丁醇、戊醇、己醇、戊烷、己烷、庚烷、环己烷和这些物质的混合物。最优的是两种溶剂的恒沸点混合物。用环己烷和乙醇、氯仿和甲醇与异丙醇和己烷的恒沸点混合物作溶剂可得到很好的结果。

用于制备脂质体载体的脂类化合物是普通的脂类，可选用合成的或天然的，饱和的和/或不饱和的磷脂， 包括磷脂酰胆碱、磷脂酰二醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇和磷脂酸。以下的磷脂特别有用：二棕榈硬脂磷脂酰胆碱、二棕榈硬脂磷脂酰甘油、二棕榈硬脂磷脂酸、二棕榈硬脂磷脂酰乙醇胺和相应的二硬脂酰和二十四酰化合物和这些物质的混合物。这些脂类或它们的混合物还含有从磷酸三十二烷、胆固醇、麦角甾醇、植物甾醇、谷甾醇、羊毛甾醇、α－生育酚、硬脂酸、硬脂酰胺和这些化合物的混合物中选出的一些物质。

本发明还包含有用于展开干脂的三维立体的支撑或非支撑物，使得其密度低于每立方厘米 0.1克，优化的低于每立方厘米0.08克，更好介于每立方厘米0.05克~0.01克之间。 依靠这些支撑物，脂类化合物多孔性沉淀在这些不溶性支撑物排列阵上形成。

当脂质体用于包载药物或诊断对照试剂时，这些展开成三维立体结构的脂类化合物对制备高效包载力的脂质体非常有用。在这种情况下靠这些多孔性三维立体结构的脂类化合物与包含药物或诊断试剂等活性试剂的水介质载体相接触而形成脂质体并包装该成份。这些载有活性物质的脂质体载体可以常规方法适当的生产制备。也可选择首先制备"空"的脂质体悬浮物，

比如只包含液体水溶液载相。随后这些"空"脂质体载体与含有活性组份的溶液相接触，用比如穿膜载入技术装入。

本发明还包括一套用于制备高效包载力须质体载体的装置，该装置包含带有进口和出口的反应器，真空泵接口制冷或加热设备，控制方式以及填料，该填料特征在于是用不溶性材料构成的包装紧密的管形材料的排成一定结构。该管形材料的填料尽管缠绕形式也可以用，但优选的结果是垂直方式排列，其管材内径为0.5毫米到5毫米，壁厚为0.5~2毫米之间。

下面的例子进一步阐明这项发明

例1

反应器特征：

一垂直的、热调节式的、 一米高、316升的不锈钢圆柱形结构，底部内径为50毫米，有12根不锈钢管材以金属网状结构排列在内部。这些管材内径为4毫米，壁厚1毫米。这些管材先点焊成平行结构的排列再插入反应器。同时也制备和试验了有管形材料，其内径为2毫米和3毫米的同种式样的反应器。

首先用下列脂类结构：还原性黄豆卵磷脂/ 磷酸三十二烷以9:1 的摩尔比构成实施非展开的脂类薄层测试反应器脂类化合物沉淀特征。实验是为了确定脂类化合物沉淀在管材上的最佳条件，确定脂类化合物浓度的影响、管材内径和性质的影响、脂类溶液干燥速率的影响。所有方案中，溶于氯仿的脂类溶液在室温条件下加入管材中，从底部装入后溶液以可控的速率被干燥。在氮气存在下80℃蒸发溶剂干燥沉淀，干脂用小量氯仿淋洗三次。

表 1

脂类浓度 g/l	每100平方厘米沉淀的脂类毫克数	
	3毫米管材	4毫米管材
180	33.1	23.3
220	43.7	29.7
260	62.5	40.0
300	81.5	56.5
320	94.5	80.4
340	111.3	84.2

如表1和图3所示，随着脂类浓度的增加，在不同的脂类浓度和不同内径的管材上脂类沉淀的量增加。另外，4毫米管材上单位面积沉淀厚度比3毫米管材的高。这两种情形下，脂类沉积的量似乎正比于脂类浓度的平方。

从表2中可以看出，脂类沉积的量随干燥速率的提高而增加。然后，如果这些结果以干燥速率(每分钟多少厘米)而不是干燥流速(每分钟毫升数)表示的话，脂类化合物沉积的量似乎也近似的正比于线速度。这与实际管材大小无关。参看图4

表 2

干燥速率 ml/min	每100平方厘米的下列管材中脂类沉积的毫克数		
	2毫米	3毫米	4毫米
1	55.2	55.3	37.4
2	76.5	63.0	47.3
3.75	114.9	83.7	65.4
5	121.0	94.5	80.4

关于脂类沉淀，另外的设计相同的只是由玻璃管代替不锈钢管的介质试验的结果表明两种支撑物之间没有很大的区别，脂类薄层的均一性，通过从上部每隔10厘米取钢管上的脂类，测定其厚度来定。结果见表3

表 3

采样点	脂类沉淀按毫克计	
	3毫米管	4毫米管
1	5.15	5.13
2	6.63	3.77
3	7.22	4.52
4	8.20	3.50
5	7.59	5.58
6	6.55	6.16
7	5.59	6.38
8	5.63	6.21
9	5.22	6.97
10	9.06	6.86
均数±标准差	6.68±1.33	5.51±1.24

通过计算脂类沉淀在三种不同规格反应容器中的表面（体积）密度，表明对2毫米管密度介于0.04~0.06克/每立方厘米，3毫米管材为0.02~0.04克/每立方厘米，4毫米管材密度为0.01~0.03克/立方厘米。

脂质体的生产

确定了前面的一些特征后，制造了一新的有250根不锈钢管的新的反应器并连接到图5所示的回路中。26克氢化大豆磷脂酰胆碱(Nattermann)，2克磷酸三十二烷和106克氯仿放入1升的玻璃反应器中，反应器有搅拌器、加热套和冷凝器(1)，搅

拌情况下加热到60℃ 至完全溶解。脂类溶液用消毒滤膜(3)过滤，用泵(2)装入316升的不锈钢柱子，该柱子内装有250根相互平行1米长304不锈钢管(4)中。除去多余的溶液，80 ℃由柱子底部鼓入循环空气蒸发溶剂，沉淀脂类化合物。

2升的反应容器有搅拌器、热封套、冷凝器(5)、装入 849克碘异酞醇(iopamidol)，1196克水，0.54克EDTA和1.60克Tris，搅拌并加热至90℃至完全溶解。溶液然后过滤，转入玻璃反应器(6)并由那儿上柱(4)。溶液通过齿轮泵(7)在反应器(6)和柱子(4)之间循环。形成的脂质体悬浮通过滤膜流出，收集在容器中(9)并通过泵(11)在微孔滤膜系统(10)中浓缩。 浓缩的溶液用盐溶液洗涤去除游离的碘异酞醇(iopamidol)。 在不同的条件下试验得到的典型的碘对脂类化合物的比(I/L)在2.5~3.5范围之内，脂类浓度为25~35毫克每毫升，得到的脂质体平均大小为570纳米。

生产单元可被消毒(比如用蒸汽)， 可作为一个密闭回路，无菌的大规模生产单位。

例2

同例1的试验设计，如图5所示只是因素4被放大。518.6克氢化的大豆磷脂酰胆碱和41.4克磷酸三十二烷，2130.0克氯仿装入3升的反应器，该反应器有搅拌器、垫封套和冷凝器(1)加热到60℃，搅拌至完全溶解。脂类溶液在泵作用下用0.22微米孔径的消毒滤膜(3)过滤。然后转移至316升不锈钢柱子，该柱子有热封套，内部装有1000根相互平行的1米长的304不锈钢管(4)，除去过剩的脂类溶液。在80 ℃条件下由柱子底部鼓入循环空气蒸发掉氯仿，脂类化合物干沉淀。

7升的不锈钢容器(316L)带有搅拌器、热封套和冷凝器(5)装入2920克碘异酞醇(iopamidol)，4110克水，1.87克EDTA 和5.50克Tris(盐酸调pH至7.2)加热到90 ℃并不断搅拌至完全溶解。该溶液经消毒滤膜过滤后用齿轮泵(7)转入柱子(4)，75℃在反应器(6)和柱子(4)之间循环一会。形成的脂质体悬液收集

在反应器(6)中，75℃下通过滤膜(8)，在容器(9)中回收。脂质体溶液通过微孔滤膜系统(10)浓缩。在不同条件下完成的一系列试验的典型的碘对脂类比值(I/L)在2.5~3.5之间，脂类浓度在25~35毫克/毫升，脂质体平均大小为570纳米。脂类化合物的体积密度随实验条件不同而变化，估计在0.08~0.05克/立方厘米之间。可是在体积密度在0.01~0.02克/立方厘米时才得到最好的脂质体。

例3

同例2一样只是用氯仿和甲醇的恒沸点混合物作为溶剂(体积比为87/13)。在减压情况下蒸发去溶剂后，加60℃热蒸馏水到反应器中。所加水的温度要高于脂类通常的相变温度(54℃)。得到的三维展开结构的脂类化合物沉淀可被水合，形成的脂质体均匀分散到溶体中。MLV型的脂质体得率很高。大约一小时后，含有5毫克/毫升脂类的脂质体悬浮液在60℃情况下流过2微米和聚碳膜(Nuclepore)，冷却到室温后，通过用0.22微米的微孔滤膜系统Prostak(Millipore)浓缩到30毫克/毫升。

加1升含有1040克(S) - N, N'- bis [2- hydroxy- 1 - (hydroxymethyl)-ethyl]-2, 4, 6- triiodo- 5- lactamido -isophtalamide 碘异酞醇(iopamidol)的水溶液，即含有520克/升共价结合的碘到浓缩的脂质体悬浮液中。终溶液(2升)含有260克/升碘60℃孵育30分钟，30分钟后脂质体内部外部碘的浓度达到平衡。最终产物浓缩到每升溶液30克脂。包装的碘对脂类的比值(I/L)为4.0。

例4

一玻璃柱子(500毫米高，内径50毫米)装有Raschig环并作为滴加塔容器。含有50克二硬脂酸磷脂酰胆碱(DSPC)，胆固醇和磷酸三十二烷以5:4:1摩尔比混合在氯仿中的溶液滴加到装有35层Raschig环的柱子上，环散在镍网作为支撑物上，直到底部最后一层完全被溶液浸泡。除去多余的溶液。80℃热氮气从底部向上鼓入反应器。脂类沉淀干燥2小时。停供氮气，反

应器连接到真空泵(1-2Torr)，沉淀干燥直到全部氯仿被除尽。溶剂蒸发完后，碘浓度为260克/升的iomerprol溶液，在60 ℃情况下加到反应器上。展开成三维结构的脂类化合物沉淀被水化30分钟。60℃，脂质体悬液流过2微米的聚碳膜(Nuclepore)，冷却至室温后，浓缩到每升30克脂类。包装的碘对脂的比值(I/L)大于4.0。

同样用网格化碳、网格化镍、网格化透明碳作为柱子填料作试验。这些试验中得到的三维脂类结构体积密度在 0.05 ~ 0.005克/立方厘米之间。得到的脂质体脂对碘的比为3.5~4.5。

例5

一玻璃柱子(500毫米高，50毫米内径) 填有空玻璃珠作为内部填料，作为流体化床反应器操作。含有50克/ 升的二棕榈硬脂磷脂酰胆碱(DPPC)，胆固醇和二棕榈硬脂酰磷脂酸以5:4:1摩尔比的环己烷/乙醇恒沸点混合物体积比为69.5/30.5溶液，被装入柱子，柱子有100 毫米高的由多孔玻璃隔饼支撑的空玻璃球柱床。溶液通过并完全浸湿玻璃珠，移去多余的溶液。热空气流(80℃)从底部通入反应器，玻璃球被流体化直至脂类沉淀物近乎干燥，停止热气，反应器连接到真空泵(1-2Torr)，沉淀干燥直到全部除尽溶剂。溶剂蒸发完后，重量百分比为4% 的盐酸利多卡因水溶液(pH7.2)在60℃情况下加入反应器。 形成的脂质体80℃下通过2微米多聚碳膜(Nuclepore)，冷却至室温后浓缩到35毫克脂/毫升。 脂质体中包装的利多卡因为每克脂0.35毫摩尔利多卡因。

柱床的不同扩展(20%~80%) 在流体化过程中对沉淀质量的影响差别很小。

例6

用500毫米高的玻璃柱子没有内部填料重复例4试验。柱子装入100毫升，由乙醇/环己烷、氯仿/甲醇和异丙醇/己烷组成的恒沸点混合物溶解的脂类化合物溶液(80克/升)。 有机溶剂先在55℃300毫米汞柱气压下蒸发，而后在70℃和10 毫米汞柱

压力下蒸发至形成泡沫状干脂沉淀。最后三维展开的脂类沉淀在70℃与iomeprol的水溶液接触水化生产包装有iomeprol的脂质体悬液，70℃流过0.6微米的多聚碳膜(Nuclepore)后，脂质体悬浮液被浓缩。不同条件下进行的一系列试验结果代表性的碘对脂类的比值为1.9~2.5之间，脂浓度为25~35毫克/ 毫升。展开的脂类结构密度据估计在0.05~0.001克/立方厘米。

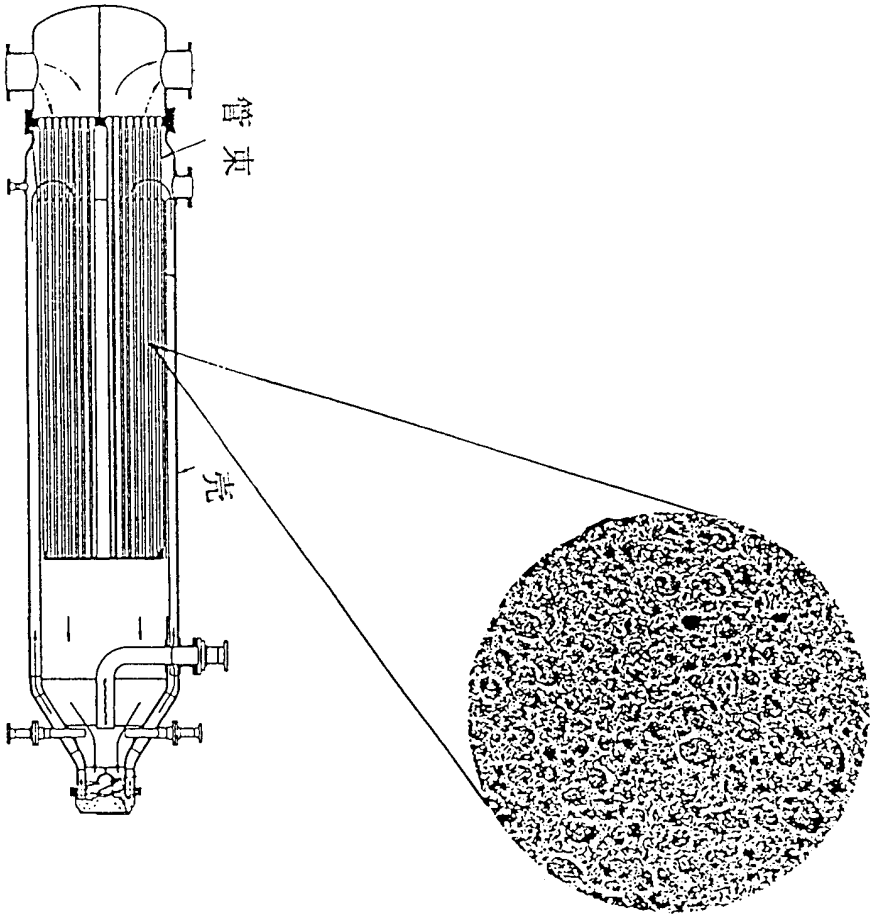


图 1

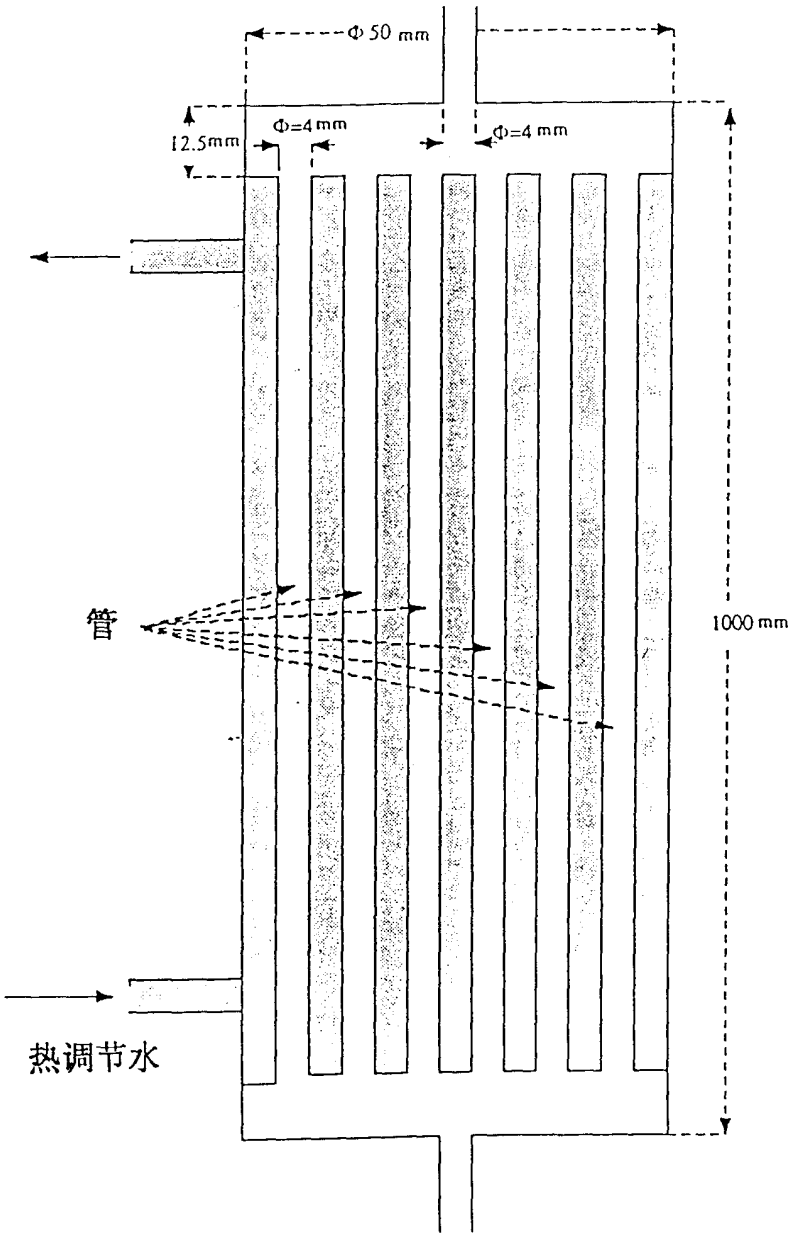


图 2

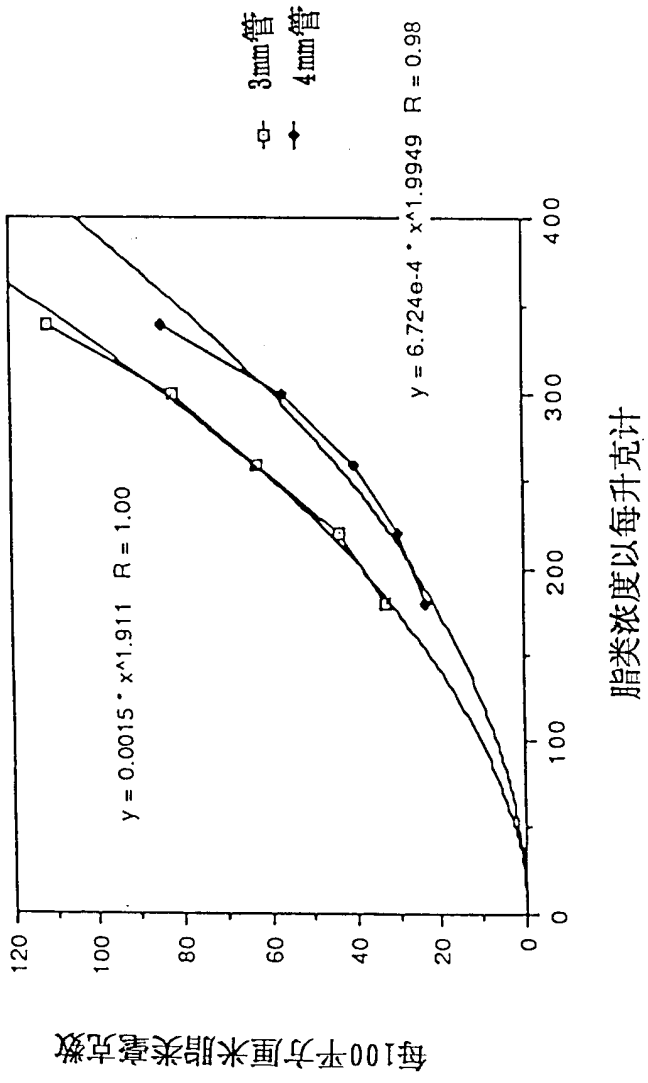

3mm管
4mm管
y = 6.724e-4 * x^1.9949 R = 0.98
y = 0.0015 * x^1.911 R = 1.00
每100平方厘米脂类毫克数
脂类浓度以每升克计
0
20
40
60
80
100
120
100
200
300
400

图 3

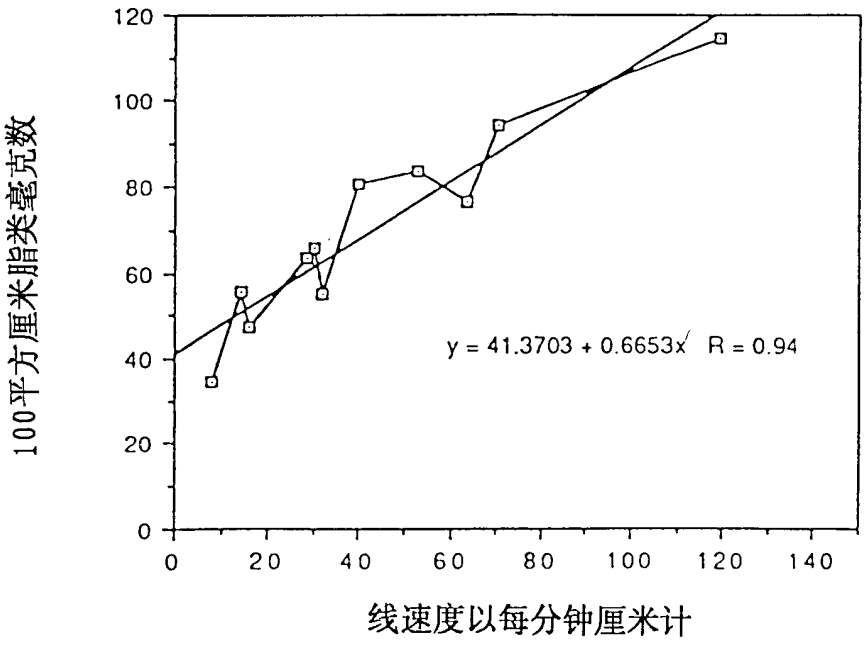

100平方厘米脂类毫克数
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
140
y = 41.3703 + 0.6653x R = 0.94
线速度以每分钟厘米计

图 4

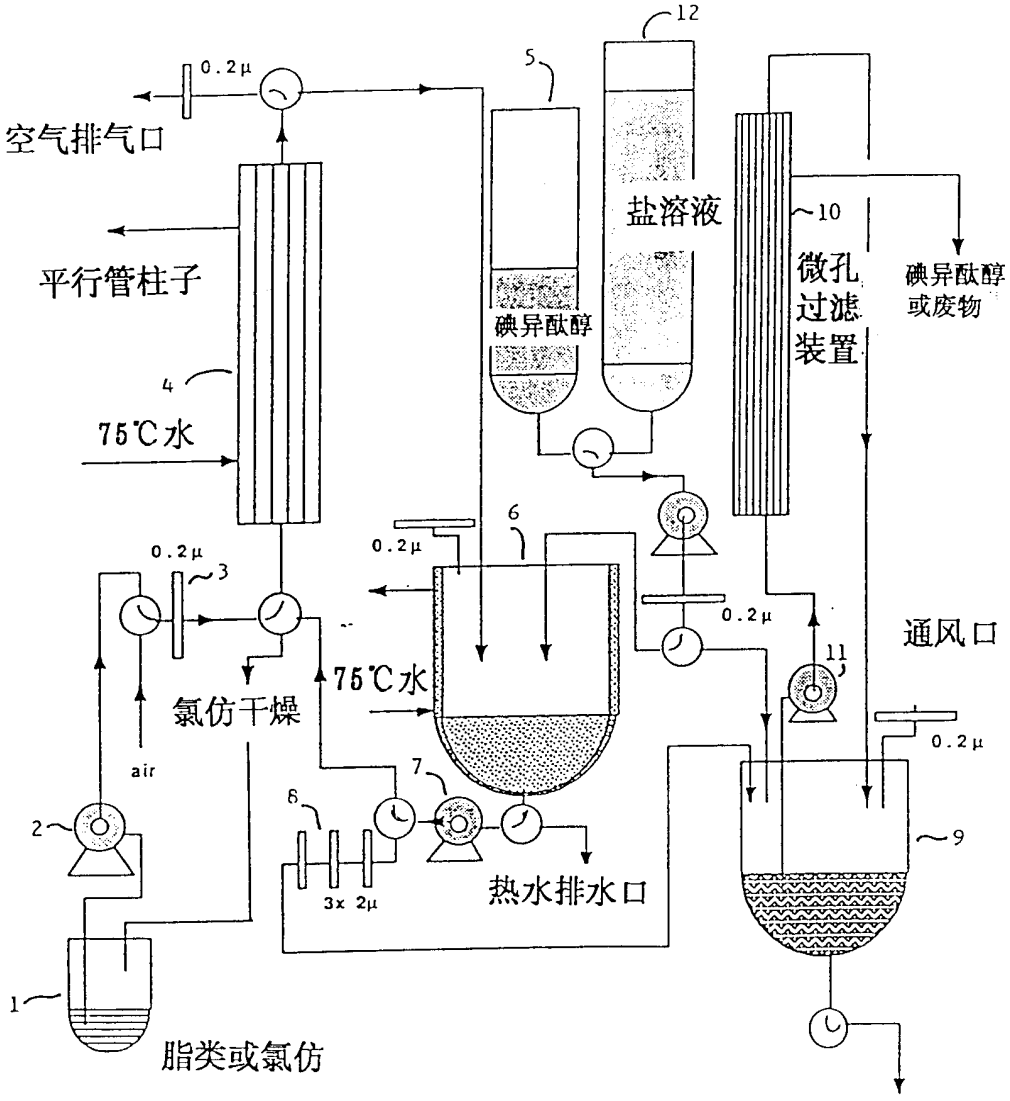

12
5
0.2μ
空气排气口
盐溶液
10
平行管柱子
碘异酞醇
微孔
过滤
装置
碘异酞醇
或废物
4
75℃水
6
0.2μ
0.2μ
3
0.2μ
通风口
11
75℃水
氯仿干燥
0.2μ
air
7
8
2
热水排水口
9
3x 2μ
1
脂类或氯仿

图 5