

基于质量源于设计 (QbD) 理念的氧化苦参碱-黄芪甲苷共载脂质体 处方工艺研究

韦良银^{1,2}, 李霞^{1,2}, 王虹^{1,2}, 黄琳清^{1,2}, 刘聪燕^{1,2*}, 陈彦^{1,2*}

(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏南京 210028; 2. 江苏省中医药研究院, 中药组分与微生态研究中心, 江苏南京 210028)

摘要: 本研究以“质量源于设计”(quality by design, QbD) 理念为核心, 优化氧化苦参碱-黄芪甲苷共载脂质体 (oxymatrine-astragaloside IV liposomes, Om-As-Lip) 的处方工艺并对其进行放大验证。采用乙醇注入联合 pH 梯度法制备 Om-As-Lip, 通过双重风险评估工具、Plackett-Burman 设计和 Box-Behnken 响应面实验对其关键物料属性进行优化, 建立设计空间; 进一步考察 Om-As-Lip 的放大工艺, 采用单因素试验优化高压匀质的关键工艺参数, 并对其终产品进行质量评价。研究结果发现, 黄芪甲苷药脂比、胆脂比和混合磷脂比例 (氢化大豆卵磷脂: 大豆卵磷脂) 是影响 Om-As-Lip 质量的关键材料属性, Box-Behnken 设计建立的回归模型具有良好的预测性, 并确定 Om-As-Lip 的最佳处方为: 黄芪甲苷药脂比为 1:40, 胆脂比为 1:10, 氢化大豆卵磷脂: 大豆卵磷脂为 51:9。设计空间内的胆脂比可控制在 1:12~1:5, 氢化大豆卵磷脂: 大豆卵磷脂比例可控制在 1:7~17:3。Om-As-Lip 高压匀质的最佳压力为 600 bar, 循环次数为 6 次, 温度为 4 °C。基于 QbD 理念制备的 Om-As-Lip 质量评价符合预期, 建立的处方工艺稳定可行, 有望为其今后的开发应用奠定实验基础。

关键词: 质量源于设计; 脂质体; 高压匀质; 黄芪甲苷; 氧化苦参碱

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)01-0232-11

Formulation and technology of oxymatrine-astragaloside IV coloaded liposomes based on quality by design

WEI Liang-yin^{1,2}, LI Xia^{1,2}, WANG Hong^{1,2}, HUANG Lin-qing^{1,2}, LIU Cong-yan^{1,2*}, CHEN Yan^{1,2*}

(1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology Research Center, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

Abstract: To optimize the formulation and technology of oxymatrine-astragaloside IV coloaded liposomes (Om-As-Lip) based on quality by design (QbD) principles, and further to verify the feasibility of its amplification process, Om-As-Lip was prepared by ethanol injection combined with pH gradient method. The critical material attributions of Om-As-Lip were evaluated by dual-risk analysis tools and Plackett-Burman design (PBD). The formulation of Om-As-Lip was further optimized with the Box-Behnken design (BBD). The design space was also established based on the contour plots of BBD. In order to further investigate the amplification process of Om-As-Lip, the critical process parameters of high-pressure homogenization (HPH) were optimized by single-factor test, and the quality of the final product was also evaluated. The results of risk analysis and PBD confirmed that the astragaloside concentration, cholesterol concentration, and phospholipid ratio (HSPC: SPC) were the critical

收稿日期: 2023-04-27; 修回日期: 2023-09-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173985); 江苏省重点研发计划社会发展项目 (BE2021754).

*通讯作者 Tel: 86-25-52362155, E-mail: liucongyan2007@126.com; ychen2020@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0515

material attributes. The model established by BBD had a good predictability, and the optimized mass ratio of As to phospholipids was 1:40, cholesterol to phospholipids was 1:10, HSPC to SPC was 51:9. The design space of Om-As-Lip was as follows: the ratio of cholesterol to phospholipids was 1:12-1:5 and HSPC to SPC was 1:7-17:3. The optimized high-pressure homogenization pressure was 600 bar, temperature was 4 °C, and cycle times was 6 times for HPH-Om-As-Lip. The quality of Om-As-Lip prepared based on the QbD concept can meet the expected CQAs, and the formulation and technology established can provide a reliable experimental basis for its future development and applications.

Key words: quality by design; liposome; high-pressure homogenization; astragaloside IV; oxymatrine

近年来,以PD-1、PD-L1抑制剂为代表的免疫检查点抑制剂对某些肿瘤(如肝癌、乳腺癌)疗效不佳^[1],这主要与肿瘤复杂的微环境及免疫细胞的功能耗竭有关^[2],从干预肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)功能和提高免疫细胞活性的角度出发,与PD-1抑制剂联用是提高其免疫疗效的策略之一。目前已有研究表明,中药黄芪中的主要活性成分黄芪甲苷(astragaloside IV, As)可通过提高肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TILs)线粒体活性,增强瘤内TILs杀伤能力^[3-6]。本课题组前期研究亦发现,苦参中的主要活性成分氧化苦参碱(oxymatrine, Om)可通过抑制CAF活化,提高瘤内TILs数量^[7],并且将As与Om按照1:1~1:2的比例配伍使用时,可协同增强PD-1抑制剂的抗肝癌、抗乳腺癌药效。但两药理化性质差异较大,As为难溶性成分,属于生物药剂学分类系统(biopharmaceutics classification system, BCS) IV类药物^[8],而Om为水溶性成分,属于BCS I类药物,如何将两药按照最佳配比进行共载和共递送将面临巨大挑战,也是本研究拟解决的关键药剂学问题。

脂质体是一种由磷脂和胆固醇构成的类脂双分子层闭合囊泡,具有独特的脂质双分子层和亲水性空腔结构,可同时包载疏水性药物与亲水性药物。作为商业化程度较高的纳米药物载体^[9],脂质体制备工艺成熟,易于工业化生产和临床转化,是实现Om和As共载与共递送的理想载体,但目前已上市的两药共载脂质体共载的均为水溶性药物,尚未见有共载极性差异极大的两种药物的脂质体产品上市,这可能是由于这种共载脂质体的构建过程涉及多个复杂环节和步骤,且终产品工艺放大生产难度高、批次间重复性差、质量难以达到预期目标。质量源于设计(quality by design, QbD)是人用药物注册技术标准国际协调会(International Conference on Harmonisation, ICH)于2005年提出的药品开发与生产理念^[10],它强调对药品本身属性及制造过程进行深入研究以确保最终质量^[11],从而构造科学化、简约化的药品制备工艺体系,降低药品的开发成

本和难度。目前,QbD理念在口服等固体制剂领域的应用已较为成熟,但在脂质体特别是双药共载脂质体等纳米制剂领域的研究较少。

因此,本研究基于QbD理念,以大豆卵磷脂(soybean phosphatidylcholine, SPC)和氢化大豆卵磷脂(hydrogenated soybean phosphatidylcholine, HSPC)为脂质材料,采用乙醇注入法联合pH梯度法构建Om-As共载脂质体(oxymatrine-astragaloside IV coloaded liposomes, Om-As-Lip),通过预先设定最终的目标产品质量属性(quality target product profile, QTPP)和关键质量属性(critical quality attributes, CQAs),使用双重风险分析工具和Plackett Burman试验筛选出对CQAs影响最显著的关键物料属性(critical material attributes, CMAs),并运用Box-Behnken设计试验对CMAs参数进行优化,建立设计空间;之后进一步对Om-As-Lip的放大工艺进行考察,优化高压匀质过程的关键工艺参数(critical process parameters, CPPs),并对终产品进行质量评价,最终开发出工艺稳定可靠、质量均一可控的Om-As-Lip,以期为其后续转化应用提供技术参考。

材料与方法

试剂 黄芪甲苷(批号:S31401-1g,纯度≥98%,上海源叶生物有限公司);氧化苦参碱(批号:16837528,纯度≥98%,南京春秋制药公司);大豆卵磷脂(批号:510430-21,纯度≥85%,德国Lipoid公司);氢化大豆卵磷脂(批号:B60455,纯度≥95%)、蛋黄卵磷脂(批号:EK14005,纯度≥98%)(上海艾伟拓医药科技有限公司);DSPE-mPEG₂₀₀₀(批号:R053501,纯度≥98%)、胆固醇(批号:R008056,纯度≥99%)(上海罗恩试剂);无水碳酸钠(批号:060410339,南京化学试剂有限公司);一水合柠檬酸(批号:201707052,国药集团试剂有限公司);N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(批号:BS106-500 g,安徽Biosharp®公司);无水乙醇(分析纯,西陇科学股份有限公司);乙腈(色谱纯,美国TEDIA公司)。

仪器 FA2014型万分之一电子天平(上海良平仪器仪表公司); MSZOSDU型十万分之一电子天平(美国梅特勒-托利多仪器有限公司); Agilent Technologies 1260 Series 高效液相色谱(美国安捷伦公司); 6100型ELSD蒸发光散射检测器(四川奥泰医疗系统有限责任公司); ZNCL-BS型智能磁力搅拌仪(上海利亚蒙制冷科技有限公司); RE2000A型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); ST 16R型高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司); XO-1000D型超声探头细胞粉碎仪(南京先欧仪器制造有限公司); ZEN 3600型马尔文激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司); Tecnai 12型TEM电镜(美国FEI公司); ZRS-8G智能溶出试验仪(天津天光光学仪器有限公司); mAH-1500 N型高压匀质仪(苏州ATS公司)

Om和As的HPLC测定 Om测定条件: 伊利特ODS-2柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(含0.1%磷酸-0.16%三乙胺) 10:90, 等度洗脱; 流速0.8 mL·min⁻¹; 检测波长: 220 nm; 柱温30 °C; 进样量10 μL。

As测定条件: 伊利特ODS-2柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 35:65, 等度洗脱; 流速1.0 mL·min⁻¹; 柱温35 °C; 进样量10 μL。ELSD漂移管温度110 °C; 载气流速1.8 L·min⁻¹; 增益系数1。

Om-As-Lip评价指标的建立

包封率测定 取500 μL Om-As-Lip溶液, 经0.22 μm的水系滤膜过滤, 以除去游离的As, 加入2倍量甲醇至续滤液中, 超声加热30 min至完全破乳, 离心取上清液, HPLC检测脂质体中包载的As含量, 计为 W_1 。之后精密移取500 μL Om-As-Lip滤液置于10 kD超滤离心管中, 13 000 r·min⁻¹离心15 min, 收集下室离心液, 检测游离的Om含量, 计为 W_2 。另取500 μL Om-As-Lip溶液, 加入2倍量甲醇, 超声30 min破乳, 分别测定As与Om含量, 记为 W_3 和 W_4 。按公式(1、2)计算包封

率(encapsulation efficiency, EE)。

$$EE_{Om} = (W_4 - W_2) / W_4 \times 100\% \quad (1)$$

$$EE_{As} = W_1 / W_3 \times 100\% \quad (2)$$

载药量测定 精密吸取1 mL Om-As-Lip溶液, 置于透析袋(MWCO: 10 kD)中, 流水透析4 h。吸取1 mL透析后溶液, 冷冻干燥后得冻干粉末, 精确称重冻干粉末重量 $M_{总}$ 。向冻干物中加入1 mL甲醇涡旋复溶, 13 000 r·min⁻¹离心10 min, 取上清液分别测定As与Om含量, 记为 W_5 和 W_6 。按公式(3、4)计算载药量(drug loading efficiency, LE)。

$$LE_{Om} = W_6 / M_{总} \times 100\% \quad (3)$$

$$LE_{As} = W_5 / M_{总} \times 100\% \quad (4)$$

DLS测定 取适量的Om-As-Lip溶液, 经超纯水稀释100倍后, 采用马尔文粒径仪对其粒径、PDI和zeta电位进行分析, 所有样品均在25 °C下测试3次。

Om-As-Lip的制备与处方优化

Om-As-Lip的QTPP与CQAs根据前期研究和文献^[12]综述, 确定本制剂的制剂形式、给药途径、共载比例等, 根据FDA颁布的脂质体药物生产指南及2020年版《中国药典》微粒制剂中对脂质体的相关规定^[13,14], 在表1中定义了Om-As-Lip的QTPP和CQAs。

Om-As-Lip的制备 分别精密称取适量HSPC、SPC、胆固醇、DSPE-mPEG₂₀₀₀和As, 置于西林瓶中, 加入一定体积的无水乙醇, 超声溶解至澄清透明, 即得油相。在磁力搅拌(800 r·min⁻¹, 50 °C)条件下, 将油相匀速注入5 mL一定浓度的柠檬酸溶液(水相)中, 搅拌1 h后, 继续加入1 mL HEPES(50 mmol·L⁻¹)缓冲盐溶液, 再加入4 mL预溶有Om的碳酸钠溶液(300 mmol·L⁻¹), 调节pH值为7.0, 50 °C水合孵育一定时间, 加超纯水定容至10 mL, 即得Om-As-Lip。

风险评估 采用鱼骨图分析影响CQAs的风险因素。将FEMA作为第二工具从失效影响、潜在原因、控制方法等角度综合分析, 结合风险指数[RPN, 即严重

Table 1 The summary of QTPP and CQAs of Om-As-Lip. QTPP: Quality target product profile; CQAs: Critical quality attributes; Om: Oxymatrine; As: Astragaloside IV; Lip: Liposomes; Om-As-Lip: Oxymatrine-astragaloside IV liposomes; PDI: Polymer dispersity index; EE: Encapsulation efficiency; EPR: Enhanced permeability and retention effect

Element	Quality attribute	Target	Justification
QTPP	Route of administration	Intravenous	Increase the bioavailability of active substances at the tumor site
	Dosage form	Liposome	Co-encapsulate and co-delivery of Om and As
	Outer packing	Penicillin bottle	Ensure stability of Om-As-Lip during storage
	Prolonged blood circulation time	PEGylated liposomes	To avoid reticuloendothelial system macrophages
	Appearance	Clear and transparent	Quality standards for injections
CQAs	<i>In vitro</i> release	Slow release	Standards for sustained-release preparations
	EE%	50%–100%	Reduced drug loss and production costs
	Size	100–200 nm	Produce EPR effect and enhance drug concentration
	PDI	< 0.3	To predict the behavior of Om-As-Lip <i>in vivo</i>
	Zeta potential	≤ -20 mV / ≥ 20 mV	To enhance the stability
	As:Om	1:1–1:2	To achieve the desired effect at the tumor site

程度 (S)、发生率 (O) 和检测率 (D) 3 种指标的乘积] 对各个风险因素进行评级。参照 FDA 脂质体生产指南^[14]和 ICH 药品研发指南 Q9^[10]制定 S、O 和 D 的评判标准, 从 1 (影响最低) ~ 5 (影响最高) 进行评分, 按公式 (5) 进行计算:

$$\text{RPN} = S \times O \times D \quad (5)$$

评判标准: RPN > 16 或 S = 4 时为高风险, 16 ≥ RPN ≥ 8 时为中风险, RPN ≤ 7 时为低风险。

Plackett-Burman 设计筛选关键影响因素 在前期实验基础上, 结合对 Om-As-Lip 处方和制备工艺的风险分析结果, 以 As 药脂比 (X_1)、Om 药脂比 (X_2)、磷脂浓度 (X_3)、胆脂比 (X_4)、DSPE-mPEG₂₀₀₀ 浓度 (X_5)、HSPC 与 SPC 质量比 (X_6)、无水乙醇体积 (X_7)、pH 梯度 (X_8)、孵育时间 (X_9) 为考察对象, 以 Om 与 As 两药总包封率 (Y_1) 为评价指标, 利用 Plackett-Burman 实验设计筛选出对 Om-As-Lip 性质具有显著影响的因素。

Box-Behnken 响应面设计优选 CMAs 配比 在 Plackett-Burman 实验的基础上, 以 As 包封率 (Y_1)、Om 包封率 (Y_2) 为响应值, 选取 As 药脂比 (X_1)、胆脂比 (X_2)、HSPC:SPC 质量比 (X_3) 为响应面模型自变量, 其他因素固定为: Om 投药量为 2.50 mg, 磷脂浓度为 0.60 mg·mL⁻¹, DSPE-mPEG₂₀₀₀ 投药量为 2.00 mg、无水乙醇体积为 2.0 mL、pH 梯度为 5.0、孵育时间为 3.0 h, 总体积定容至 10.0 mL, 进行三因素三水平的 Box-Behnken 实验设计, 确定最佳工艺处方。

设计空间的建立 根据响应面实验结果, 固定 As 药脂比为 1:40, 根据胆脂比和混合磷脂比例对 Om 和 As 包封率影响的等值曲线进行叠加, 建立设计空间, 为后续工艺放大确定最优工艺条件范围。由于在放大生产的匀质环节中, 脂质体会受到匀质机的剪切、空化冲击, 导致药物包封率在在一定程度上有所降低^[15], 因此本研究将 As 包封率下限调整为 80%, Om 包封率下限调整为 50%。以此为条件搜索符合目标的子集, 构建设计空间。

Om-As-Lip 放大工艺的 CPPs 研究 在实验室小试的基础上, 将基于 QbD 理念优化的 Om-As-Lip 处方放大 50 倍得到 50×-Om-As-Lip, 检测其 CQAs 是否合格。采用单因素实验对 50×-Om-As-Lip 进行高压匀质 (high-pressure homogenization, HPH) CPPs 的筛选, 分别考察匀质压力 (20、40、60、80、90 bar)、匀质循环次数 (3、6、9、12、15 次)、匀质温度 (4、15、25、35 °C) 对脂质体 CQAs 的影响。基于单因素实验结果筛选出高压匀质的最佳 CPPs 条件, 制备 3 批放大样品进行高压匀质, 得到 HPH-Om-As-Lip, 测定其包封率、粒径、PDI 和 zeta 电位, 验证放大工艺的可重复性。

HPH-Om-As-Lip 的质量评价

形态学观察 将 HPH-Om-As-Lip 溶液稀释适宜倍数后, 用 2% 磷钨酸负染后转移至专用铜网上, 自然晾干, 于透射电镜下观察其双分子层膜结构和大小并拍照。

稳定性考察 稀释稳定性: 取 HPH-Om-As-Lip 1 mL, 分别用超纯水稀释 10、20、50、100 倍体积, 测定其粒径和 PDI。

放置稳定性: 取 HPH-Om-As-Lip 10 mL, 于 4 °C 条件下保存, 分别于 1、2、3、4、5、6、7、8、14、21、28 天定时取样测定其粒径和 PDI。

体外释放考察 精密吸取 5 mL HPH-Om-As-Lip 溶液放于透析袋 (10 kDa) 中, 将两端用透析夹扎紧, 另取游离药物组合 (Om-As) 溶液置于透析袋中, 再将透析袋放置于盛有 150 mL 含 0.5% Tween 80 的磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4) 的溶出杯中, 在 (37 ± 0.5) °C、100 r·min⁻¹ 条件下不断搅拌, 分别在 0、0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 时吸取 1 mL 释放介质并补充同体积的释放介质。将取出的样品溶液于 4 °C、13 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min, 取上清液过滤, 采用 HPLC 法检测 Om 及 As 含量。按照公式 (6) 计算药物的累计释放百分率 (%)。

$$E_r = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_{\text{drug}}} \times 100\% \quad (6)$$

E_r : 药物累计释放率; V_e : PBS 的置换体积; V_0 : 释放介质总体积; C_i : 第 i 次置换取样时释放液的浓度; m_{drug} : 脂质体所含药物总药量; n : 置换 PBS 的次数。

结果

1 风险评估

图 1 从人员及环境、物料属性、乙醇注入法、pH 梯度法和高压匀质的工艺参数 5 个方面分析了可能影响 Om-As-Lip CQAs 的风险因素。表 2 结果显示, 磷脂浓度、As 药脂比、Om 药脂比、HSPC 与 SPC 质量比 (HSPC:SPC)、pH 梯度、PEG 修饰材料 (DSPE-mPEG₂₀₀₀) 浓度、无水乙醇体积为影响 Om-As-Lip CQAs 的中风险或高风险因素。

2 Om-As-Lip 处方优化

2.1 Plackett-Burman 设计筛选关键影响因素

由于影响双载脂质体 CQAs 的风险因素较多, 鱼骨图和 FEMA 作为风险评估工具仍具有一定程度上的主观影响, 因此进一步采用 Plackett-Burman 实验对影响因素进行分析。包封率是脂质体的关键质量属性, 根据脂质体中药物包封程度的高低, 可评价其处方工

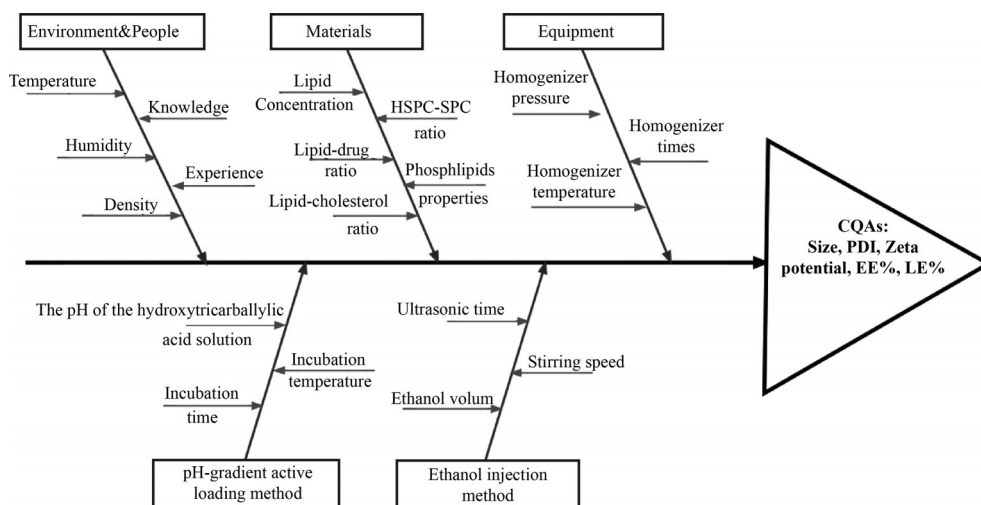


Figure 1 Ishikawa diagram summarizing the material attributes and process parameters that has a potential impact on the CQAs of Om-As-Lip

Table 2 Failure mode effects analysis of Om-As-Lip

Parameter	Failure mode	Failure effect	Potential cause	Control method	S	D	O	RPN
EE/%	Drug leakage	Increase administration frequency	Phospholipids concentration	Confirm the appropriate concentration range	4	3	4	48
			As concentration		4	3	4	48
			Om concentration		4	3	3	48
			Cholesterol concentration		4	3	3	36
			Synthetic phospholipids ratio	Optimizing the phospholipid ratio	4	3	4	48
			Om loading method	pH gradient	3	1	2	6
			The pH of the hydration medium	Optimizing the citric acid concentration	4	2	4	32
			Incubation time	Optimizing incubation time	4	2	3	24
			Size, PDI	Large size distribution	Reduced stability	Uniform particle size	Magnetic stirring speed	2
	Ultrasound time	2				1	3	6
		2				1	3	6
Zeta potential	> -20 mV	Aggregation during storage life	Types of phospholipids	Use highly charged phospholipid	2	1	5	10
			Phospholipids concentration	Optimize phospholipids concentration	4	3	4	48
Prolong blood circulation time	Eliminated by the RES system	Reduced effectiveness of treatment	PEG modified liposomes	Optimize DSPE-mPEG ₂₀₀₀ concentration	3	2	3	18
		Increased side effects						
Safety	Residual organic solvent	Increased side effects	Volume of absolute ethanol	Optimize the volume of absolute ethanol	4	3	3	36
		Reduced storage stability						

艺的优劣。Plackett-Burman实验的主要目的在于对影响脂质体的关键质量属性的关键因素进行排序筛选,因此本实验将两药包封率之和 (Y_1) 作为指标进行考察。Plackett-Burman的因素水平、实验安排及结果见表3。回归模型为: Y_1 (%) = -17.59 X_1 - 0.585 8 X_2 + 6.83 X_3 - 11.58 X_4 + 2.12 X_5 - 13.54 X_6 + 3.06 X_7 + 7.49 X_8 - 6.69 X_9 , $R^2 = 0.991 5$, $R_{adj}^2 = 0.953 3$ 。由图2A可知, As药脂比、HSPC与SPC质量比(HSPC:SPC)、胆脂比对两药包封率之和有显著性消极性影响 ($P < 0.05$), 影响大小排序为As药脂比 > HSPC:SPC > 胆脂比。

2.2 Box-Behnken 响应面实验设计优选处方配比

2.2.1 模型拟合及方差分析 表4为Box-Behnken响

应面的因素水平、实验安排及结果。通过 Design Expert 13.0软件对表4数据进行拟合,建立的二次多项式回归模型方程为 $Y_1 = 93.64 - 15.26X_1 + 0.618 8X_2 - 0.491 3X_3 + 2.16X_1X_2 - 1.78X_1X_3 - 5.51X_2X_3 - 15.27X_1^2 - 3.98X_2^2 + 1.82X_3^2$, $Y_2 = 36.58 - 6.05X_1 + 9.83X_2 + 2.01X_3 - 9.97X_1X_2 - 3.87X_1X_3 + 0.83X_2X_3 + 0.435 5X_1^2 + 1.32X_2^2 + 4.48X_3^2$ 。两个模型 $P < 0.05$, 均具有显著性影响, 而失拟项 $P > 0.05$, 表明失拟均不显著。模型的 R^2 分别为0.940 3、0.909 7, R_{adj}^2 分别为0.863 5、0.793 6, 表明模型与实际实验拟合程度良好, 适用于分析和预测 Om-As-Lip的制备。

2.2.2 响应面分析 As包封率 (Y_1) 的等高线和响应

Table 3 Design and results of Plackett-Burman design ($n = 3, \bar{x} \pm s$). X_1 : As to lipid (mass ratio); X_2 : Om to lipid (mass ratio); X_3 : HSPC concentration; X_4 : Cholesterol to lipid (mass ratio); X_5 : DSPE-mPEG₂₀₀₀ concentration; X_6 : HSPC to SPC (mass ratio); X_7 : Volume of absolute ethanol; X_8 : The pH value; X_9 : Incubation time; Y_1 : Total EE of As and Om

Run	X_1	X_2	$X_3/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	X_4	X_5	X_6	X_7/mL	X_8	X_9/h	$Y_1/\%$
PB-1	1 (-1)	3 (1)	0.6 (1)	12 (1)	1 (-1)	11:1 (-1)	2 (-1)	5 (1)	0.5 (-1)	156.94
PB-2	1 (-1)	1 (-1)	0.6 (1)	3 (-1)	4 (1)	7:1 (1)	2 (-1)	5 (1)	3 (1)	140.90
PB-3	3 (1)	1 (-1)	0.6 (1)	12 (1)	4 (1)	11:1 (-1)	2 (-1)	2 (-1)	3 (1)	101.94
PB-4	3 (1)	1 (-1)	0.3 (-1)	3 (-1)	4 (1)	11:1 (-1)	5 (1)	5 (1)	0.5 (-1)	142.80
PB-5	1 (-1)	1 (-1)	0.3 (-1)	3 (-1)	1 (-1)	11:1 (-1)	2 (-1)	2 (-1)	0.5 (-1)	151.59
PB-6	1 (-1)	1 (-1)	0.3 (-1)	12 (1)	1 (-1)	7:1 (1)	5 (1)	2 (-1)	3 (1)	95.11
PB-7	1 (-1)	3 (1)	0.3 (-1)	12 (1)	4 (1)	11:1 (-1)	5 (1)	5 (1)	3 (1)	139.22
PB-8	3 (1)	1 (-1)	0.6 (1)	12 (1)	1 (-1)	7:1 (1)	5 (1)	5 (1)	0.5 (-1)	100.94
PB-9	3 (1)	3 (1)	0.3 (-1)	12 (1)	4 (1)	7:1 (1)	2 (-1)	2 (-1)	0.5 (-1)	66.13
PB-10	3 (1)	3 (1)	0.6 (1)	3 (-1)	1 (-1)	11:1 (-1)	5 (1)	2 (-1)	3 (1)	118.52
PB-11	1 (-1)	3 (1)	0.6 (1)	3 (-1)	4 (1)	7:1 (1)	5 (1)	2 (-1)	0.5 (-1)	151.52
PB-12	3 (1)	3 (1)	0.3 (-1)	3 (-1)	1 (-1)	7:1 (1)	2 (-1)	5 (1)	3 (1)	93.92

Table 4 Design and results of Box-Behnken design ($n = 3, \bar{x} \pm s$). X_1 : As to lipid (mass ratio); X_2 : Cholesterol to lipid (mass ratio); X_3 : HSPC:SPC

Run	Level			Factor			Result	
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	-1	0	1	1	10	51:9	93.13	49.72
2	0	0	0	2	10	52.5:7.5	89.87	42.34
3	1	0	1	3	10	51:9	62.88	31.31
4	0	-1	-1	2	8	54:6	80.57	27.28
5	1	-1	0	3	8	52.5:7.5	58.02	32.82
6	1	0	-1	3	10	54:6	70.80	41.01
7	0	0	0	2	10	52.5:7.5	98.49	35.91
8	-1	1	0	1	12	52.5:7.5	86.43	63.79
9	0	1	1	2	12	51:9	91.38	59.14
10	-1	-1	0	1	8	52.5:7.5	96.69	26.40
11	0	-1	1	2	8	51:9	93.99	35.63
12	0	0	0	2	10	52.5:7.5	94.52	39.78
13	0	0	0	2	10	52.5:7.5	93.53	31.85
14	1	1	0	3	12	52.5:7.5	56.41	30.33
15	-1	0	1	1	10	51:9	93.94	43.96
16	0	1	1	2	12	51:9	100.0	47.47
17	0	0	0	2	10	52.5:7.5	91.78	33.04

面分析见图2B、C, 根据等高线的密度分析, 等高线越密集, 影响程度越大。因此, 确定各因素的影响大小顺序为As药脂比 (X_1) > HSPC:SPC (X_3) > 胆脂比 (X_2), 其中As具有显著性影响 ($P < 0.001$)。根据响应面图可知, 随着As的药脂比增大, SPC比例减少, 胆脂比增多, As的包封率逐渐降低。Om包封率 (Y_2) 的等高线和响应面分析见图2D、E, 各因素的影响大小顺序为胆脂比 > As药脂比 > HSPC:SPC, 其中胆脂比 ($P < 0.001$)、As药脂比 ($P < 0.05$) 具有显著性影响, 且两者交互具有显著性 ($P < 0.05$), 随着胆脂比增大, As药脂比降低, SPC质量减少, Om的包封率逐渐升高。

2.2.3 最佳工艺的确定和验证 期望以As和Om的包封率处于最大值为优化指标, 通过Design Expert 13.0软件分析, 最终确定Om-As-Lip制备的最佳

CMA参数为: As药脂比为1:40, 胆脂比为1:6, HSPC:SPC为51:9。在该条件下重复制备3批Om-As-Lip, 测得As包封率为 $(97.28 \pm 0.01)\%$ 、As载药量为 $(2.81 \pm 0.01)\%$, Om包封率为 $(60.76 \pm 0.01)\%$ 、Om载药量为 $(3.01 \pm 0.01)\%$, RSD < 3%, 两药最终载药比例在1:1~1:2之间, 符合预期CQAs。

2.3 设计空间的建立

虽然确定了Om-As-Lip CMA的最佳取值, 但是放大生产时难以精准控制条件, 导致制备的Om-As-Lip批次重复性差。合理的设计空间可从多维角度考虑工艺参数之间的组合和相互作用, 在风险分析及实验基础上界定出CMA的一定范围, 在此范围内CMA的更改将不会改变最终药品的CQAs。为了获取更大的设计空间, 本实验将对包封率影响最显著的As药脂比固定在1:40, 将胆脂比、HSPC:SPC对Om包封率和As包封率影响的等值曲线进行叠加, 得出图2F中黄色区域为建立的设计空间, 但由于模型不可完全预测真实值, 因此加入置信水平 $\alpha = 0.05$ 的置信区间优化原设计空间 (图2G), 灰色区域中的取值将不满足优化目标, 暗黄色区域为原设计空间中不可靠的部分, 预计此空间中的取值有5%概率无法满足目标, 而亮黄色则为优化后的设计空间, 该区域的胆脂比可控制在1:12~1:5, HSPC:SPC比例可控制在1:7~17:3, 此范围内所有取点都将符合CQAs。

2.4 Om-As-Lip放大工艺

将设计空间内的CMA参数放大50倍进行放大工艺研究, 由于放大后参数取值超出设计空间规定的范围, 制备的50×-Om-As-Lip极有可能不符合CQAs, 因此考虑加入HPH解决这一问题。图3A、B分别展示了高压匀质3个CPPs (压力、循环次数、温度) 在不同水平下制备的HPH-Om-As-Lip的粒径、PDI和包封率

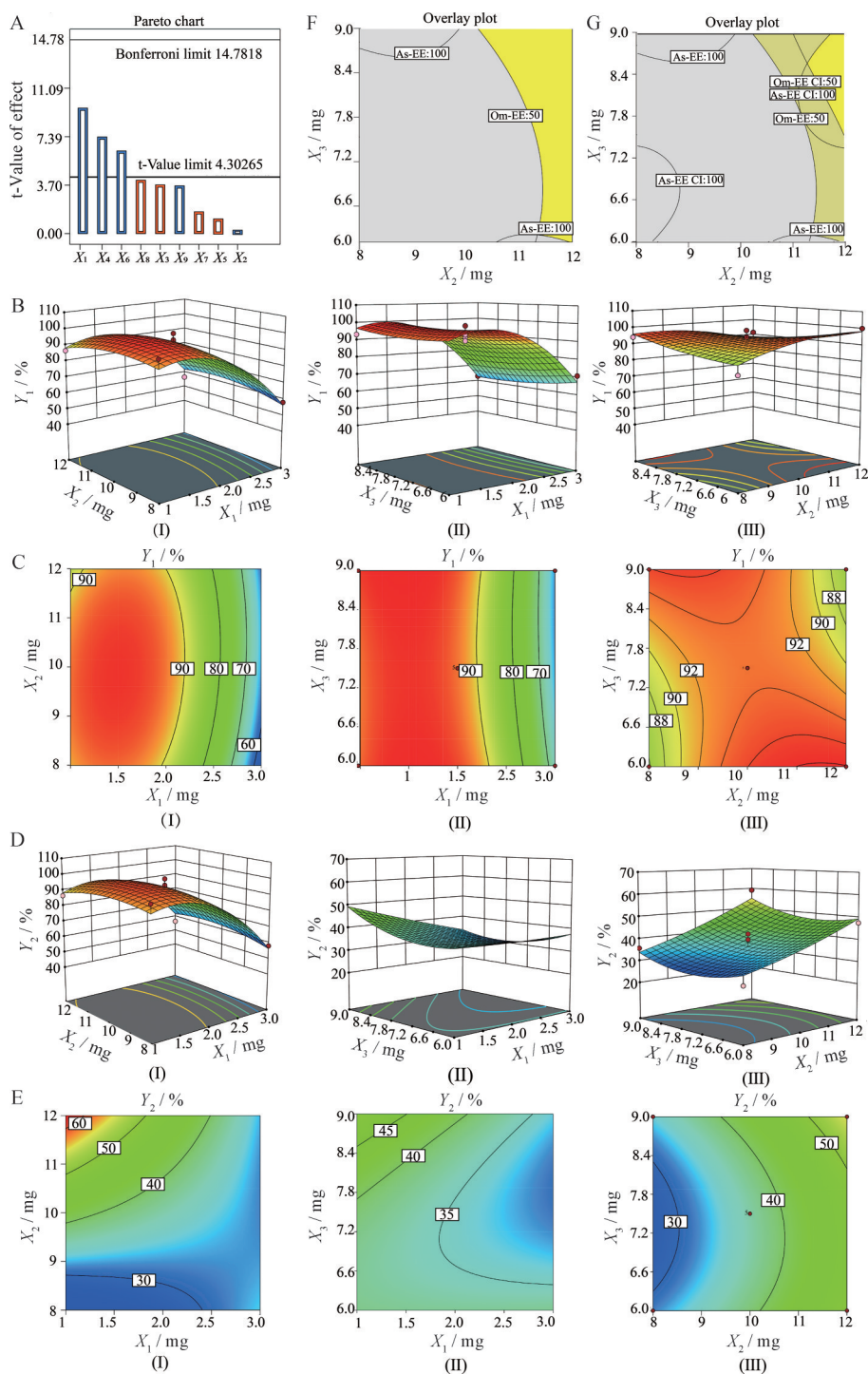


Figure 2 Optimization of the prescription of Om-As-Lip. A: Pareto plots of drug loading of Om-As-Lip; B, C: Response surface diagram (B) and contour plot of As-EE (C); D, E: Response surface diagram (D) and contour plot of Om-EE (E); F: The prescription design space of Om-As-Lip; G: The prescription design space of Om-As-Lip that coupled with 95% CI

变化,发现当匀质压力为600 bar时, HPH-Om-As-Lip 粒径为 (115.1 ± 2.479) nm, PDI为 0.216 ± 0.01 , Om和As的包封率均最高,其他压力水平下制备的脂质体的粒径均偏小,导致形成的内水相空腔也随之减小,继而影响亲水性药物Om的包封。当高压匀质循环次数为6次时, HPH-Om-As-Lip的粒径为 (118.6 ± 1.68) nm,

PDI为 0.173 ± 0.015 ,对Om和As的包封率均为最高,分别为 $(50.41 \pm 0.02)\%$ 和 $(88.60 \pm 0.14)\%$ 。当高压匀质温度为4 °C时, HPH-Om-As-Lip对Om和As的包封率均最高 $[(49.38 \pm 0.09)\%, (91.99 \pm 0.05)\%]$,之后随温度上升,两药包封率均开始降低,且脂质体粒径开始减小、PDI逐渐升高。根据CQAs规定, HPH-Om-As-Lip

的粒径应在 100~200 nm 之间, PDI < 0.3, 且具有高
的包封率, 综合考虑不同高压匀质因素水平对 HPH-Om-
As-Lip 包封率、粒径、PDI 的影响后, 选择匀质压力为
600 bar、循环次数为 6 次、匀质温度为 4 °C 作为高压匀
质最优的 CPPs。

在上述优化的参数条件下, 重复制备 3 批 HPH-
Om-As-Lip 进行优化工艺验证, 3 批样品溶液外观均澄

清透亮, 粒径为 (116.4 ± 5.2) nm, PDI 为 0.196 ± 0.028 ,
zeta 电位为 (-32.5 ± 1.19) mV。Om 包封率为 $(55.35 \pm$
 $1.38)\%$, Om 载药量为 $(2.271 \pm 0.001)\%$, As 包封率为
 $(91.21 \pm 0.27)\%$, As 载药量为 $(2.293 \pm 0.001)\%$, RSD <
3%, 由此可见, 此放大工艺具有良好的稳定性。

2.5 HPH-Om-As-Lip 的质量评价

如图 3C 所示, HPH-Om-As-Lip 的溶液外观无色澄

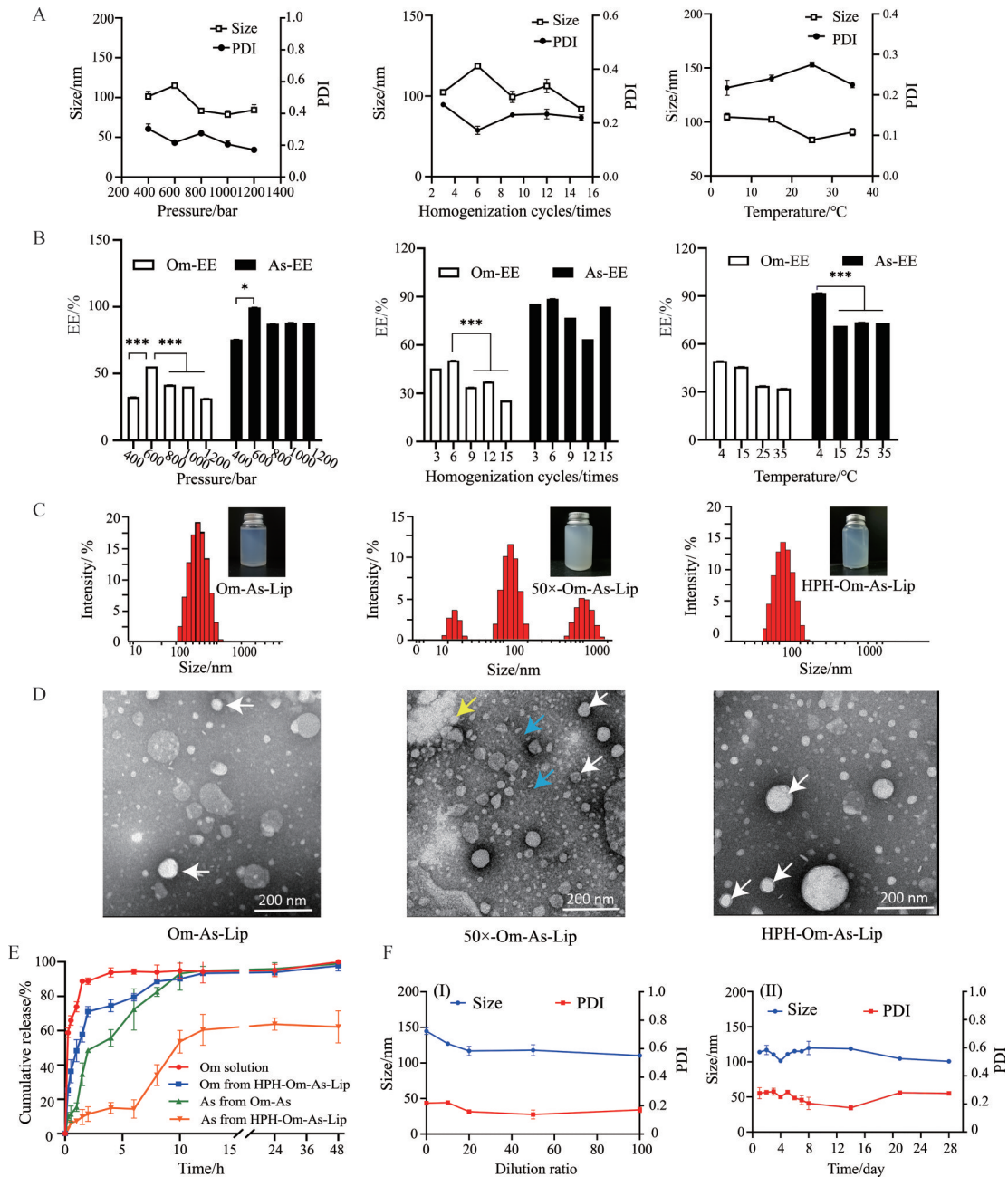


Figure 3 Process optimization and characterization of HPH-Om-As-Lip. Size, PDI (A) and EE (B) of HPH-Om-As-Lip prepared by different pressure, cycles and temperature; Appearance, particle size distribution (C) and TEM images (D) of Om-As-Lip, 50x-Om-As-Lip and HPH-Om-As-Lip. The membrane structure of liposomes was indicated with white arrow; the lipid fragment was indicated with blue arrow; the lipid aggregation was indicated with yellow arrow; E: *In vitro* release profile of HPH-Om-As-Lip and Om-As in phosphate-buffered solution (pH 7.4); F: Stability analysis of HPH-Om-As-Lip at different dilution ratio (I) and storage time (II). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. HPH: High-pressure homogenization

清,有蓝色乳光,与实验室小试样品基本一致,DLS结果显示粒径为 (115.1 ± 2.5) nm, PDI为 0.22 ± 0.01 , zeta电位为 (-36.6 ± 1.7) mV。图3D中的TEM电镜结果显示,大部分HPH-Om-As-Lip形态圆整,呈类球形,可观察到明显的脂质双分子层结构(白色箭头)。而未经高压匀质工艺制备的50 \times -Om-As-Lip的溶液外观相较于小试样品Om-As-Lip而言变得较为浑浊,其粒径为 (148.3 ± 28.4) nm, PDI为 0.704 ± 0.227 , DLS粒径表征图出现多个峰,与图3D TEM结果一致,其中10 nm左右的峰可能来源于磷脂碎片(TEM图中蓝色箭头所指),100~200 nm之间的峰应为目标制剂(TEM图中白色箭头所指),1 000 nm左右的峰表示脂质可能发生了聚集(TEM图中黄色箭头所指)。该现象表明,脂质体作为微观制剂,放大工艺对其CQAs影响极大,实验室小试规模下建立的设计空间可能并不完全适用于放大工艺。放大处方制备的50 \times -Om-As-Lip的粒径分布不均一,可能是由于实验室的超声及磁力搅拌提供的能量不够,因此高压匀质是Om-As-Lip放大工艺必不可少的环节。

各组的体外释放结果如图3E所示,游离药物组合(Om-As)中的Om在1.5 h时的累计释放率超过80%,几乎完全释放;而HPH-Om-As-Lip组中的Om累计释放率约为55%;游离药物组合的As在8 h时累计释放率超过80%,而HPH-Om-As-Lip组的累计释放率只有20%。与游离药物组合相比,HPH-Om-As-Lip组表现出明显的缓释特性。采用零级方程、一级方程、Higuchi方程、Riger-Peppas方程4种释药模型方程对HPH-Om-As-Lip的释药曲线进行拟合,结果发现一级方程的拟合效果最好,其中Om的拟合方程为 $Q_t = 87.24 [1 - \exp(-0.85t)]$, As的拟合方程为 $Q_t = 0.54 [1 - \exp(-0.08t)]$, R^2 分别为0.947 9和0.915 0,拟合效果较好。2020版药典规定缓释制剂的释放动力学方程应符合一级方程或Higuchi方程,因此HPH-Om-As-Lip的体外释放符合药典对缓释制剂的规定要求。

对HPH-Om-As-Lip的稀释稳定性和放置稳定性进行考察,结果如图3F所示,在不同稀释倍数下,HPH-Om-As-Lip的粒径、PDI均未发生明显变化;HPH-Om-As-Lip在考察的放置时间内均可保持其粒径稳定在111.5 nm左右,PDI值均低于0.3,表明HPH-Om-As-Lip具有较好的物理稳定性。

讨论

目前已有研究发现,免疫疗法的疗效与TILs的瘤内浸润数量和质量密切相关^[16]。本课题组前期研究发现,将As和Om按1:1~1:2的比例联合使用时,可协

同增强T细胞活性,并抑制CAFs活化,进而显著提高PD-1抑制剂的抗肝癌、抗乳腺癌药效。但As与Om理化性质差异极大,将两药按固定比例实现共载与体内共递送存在极大挑战。基于药物的理化性质和脂质体的载药特点,本研究拟构建一种载药量高、性质稳定、可放大生产的双药共载脂质体(Om-As-Lip),即将难溶性As负载于脂质体的脂质双分子层中,水溶性Om负载于内水相中,并在QbD理念的指导下,建立稳定可控的处方工艺体系,以期为肿瘤免疫治疗提供疗效确切、安全有效的辅助治疗药物。

虽然脂质体的制备工艺已经较为成熟,但目前多数脂质体药物研发仍处于实验室小试水平,放大生产仍存在诸多困难^[17,18]。目前全球已获批上市的脂质体产品约有20种,且多为单药脂质体,共载脂质体相对较少。其中由Celator公司研发生产的共载阿糖胞苷和柔红霉素的Vyxeos[®]于2016年被批准用于治疗白血病,最近国内研制的首个两药共载复方脂质体-盐酸伊立替康氟脲苷脂质体注射液(LY01616)已于2021年完成I期临床试验。但上述脂质体产品共载的药物均为水溶性药物,对于共载极性完全不同的两种小分子药物的Om-As-Lip而言,目前尚未有充足的研发经验可作为参考。

作为脂质体的主要组成成分,磷脂种类是影响脂质体CQAs的关键因素之一。磷脂种类可分为天然磷脂和合成磷脂,其中常用于脂质体制备的天然磷脂包括蛋黄卵磷脂(egg phosphatidylcholine, EPC)和SPC,这两种磷脂对疏水性药物均有较好的增溶效果,这可能是由于天然磷脂含有多种不同碳链长度的脂肪酸链结构^[19],更易于结合疏水性药物。以HSPC为代表的合成磷脂制备的脂质体对水溶性药物通常具有更优的包封效率,这可能是由于合成磷脂多具有较高的相变温度(phase transformation temperature, T_m),导致脂质双分子层更稳定,不易发生药物泄漏,其次是因为合成磷脂多具有较长的烃链^[20,21],可形成更大的内水腔,进而有利于负载更多的水溶性药物,但同时制备的脂质体粒径也会随之增大。本研究前期考察了不同种类的磷脂对As和Om的包封效率,结果发现SPC对As的包封率高达98.04%,显著高于EPC(78.37%)和HSPC(58.29%),而HSPC对Om具有更优的包封率(71.13%),显著高于EPC(19.32%),SPC(9.67%)。实验结果还发现,随磷脂的碳链长度增加,脂质体的粒径也在增加(EPC: 147.8 nm, SPC: 160.0 nm, HSPC: 216.2 nm)。因此,综合考虑不同种类磷脂的载药特点和拟包载药物的理化性质,本研究将SPC与HSPC两种磷脂混合使用作为Om-As-Lip的脂质材料。

脂质体的制备方法也是影响其 CQAs 的关键因素。根据载药机制可将脂质体的制备方法大致分为主动载药法和被动载药法。其中, 主动载药法常用于包载水溶性药物, pH 梯度法是一种经典的主动载药法, 其主要原理是通过调节脂质体内外水相的 pH 梯度差, 使药物以易跨膜的分子态顺梯度到达内水腔后, 转变为不易跨膜的离子态被包封。经典的被动载药法如乙醇注入法、薄膜分散法适合包载疏水性药物。乙醇注入法的原理是将溶有脂质的乙醇溶液注入到水相中, 使得脂质在乙醇-水界面中迅速分散形成脂质体^[22], 形成的脂质体粒径较小, 操作简单、易于工业化生产^[23,24]。薄膜分散法是将药物和脂质溶于易挥发的有机溶剂 (如氯仿) 后, 除去有机溶剂形成一层薄膜, 再加入水化溶液形成脂质体。本研究前期在对制备方法进行筛选时, 发现已有大量研究证明采用 pH 梯度法制备的单药脂质体对 Om 具有更高的包封率 (pH 梯度法约为 50%~60%, 被动载药法低于 30%)^[7,25,26], 因此考虑采用 pH 梯度法将 Om 加载于脂质体内水腔, 同时采用被动载药法将 As 包封于脂质双分子层间。实验前期分别对乙醇注入法-pH 梯度法和薄膜分散法-pH 梯度法制备的脂质体进行了比较, 结果发现采用乙醇注入法-pH 梯度法制备的脂质体对 As 的包封率 (84.54%) 显著高于薄膜分散法-pH 梯度法 (49.82%), 主要原因在于 As 在氯仿中基本不溶, 形成的薄膜不均匀; 两种制备方法制备的脂质体对 Om 的包封率未见有显著差别 (34.97% 和 39.26%)。本研究也曾参考 Kuo 等^[27]的做法, 将 As 预先溶于甲醇, 再与氯仿混合, 但发现该法在除去有机溶剂环节耗费的时间较长, 不利于工业化生产, 因此, 本研究最终选择采用乙醇注入法-pH 梯度法制备 Om-As-Lip。

在脂质体的放大工艺中, 常面临粒径不均一、批次间重复性差的难题。高压匀质可在高压条件下将脂质体样品迅速通过具有特殊结构的匀质腔, 通过产生剪切、撞击、空穴等效应, 从而降低脂质体的粒径及 PDI, 有助于克服粒径不均一的难题, 促进脂质体进行产业化转化。高压匀质的压力、循环次数均有利于降低脂质体的粒径和 PDI, 但由于脂质体刚性不强, 压力过高、循环次数过多则可能破坏脂质体结构, 降低药物的包封率。同时, 在高压匀质机工作时产生的热量会使 T_m 较低的磷脂通透性增加, 进而导致药物包封率降低, 因此需要将匀质温度控制在较低范围。因此, 本实验最终确定匀质压力为 600 bar, 匀质次数为 6 次, 匀质温度为 4 °C 作为最优高压匀质工艺参数, 在此条件下放大 50 倍生产的 HPH-Om-As-Lip 粒径均一、包封率和载药量与小试相比并未有明显下降, 产品质量符合

CQAs。

综上所述, 脂质体的 CMAs 和 CPPs 均对其 CQAs 有较大的影响, 深刻理解它们之间的联系将有助于简化制剂设计, 降低生产难度, 推进临床转化^[28]。QbD 理念是优化制剂处方工艺、获得质量稳定可控产品的重要技术方法, 虽然本研究中 Om-As-Lip 的放大研究规模距离真正的产业化仍有一定差异, 但在 QbD 理念下建立的 Om-As-Lip 制备工艺体系稳定可放大, 产品质量均一可控, 且成功实现了不同极性药物的高效共载 (EE-As: 97.28%, EE-Om: 60.76%), 在放大后仍保持较高的包封率 (EE-As: 91.21%, EE-Om: 55.35%), 因此 Om-As-Lip 仍具有一定应用前景。该研究有望为类似脂质体制剂的研究开发提供技术参考, 也可为肿瘤免疫治疗提供更有效的辅助治疗药物。

作者贡献: 韦良银负责全部实验内容与结果处理, 并负责文章撰写与修改; 李霞、王虹、黄琳清协助 Om-As-Lip 制备优化及提供思路; 刘聪燕负责文章修改; 陈彦负责实验方案设计、实验指导与结果审核、文章修改与审核。

利益冲突: 所有作者均声明无任何利益冲突。

References

- [1] Wu M, Huang Q, Xie Y, et al. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade *via* combination therapy and PD-L1 regulation [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15: 24.
- [2] Kubli P, Berger T, Araujo V, et al. Beyond immune checkpoint blockade: emerging immunological strategies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 12: 899-919.
- [3] Wang F, Qian H, Kong L, et al. Accelerated bone regeneration by astragaloside IV through stimulating the coupling of osteogenesis and angiogenesis [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17: 1821-1836.
- [4] Dou B, Li S, Wei L, et al. Astragaloside IV suppresses post-ischemic natural killer cell infiltration and activation in the brain: involvement of histone deacetylase inhibition [J]. *Front Med*, 2021, 15: 79-90.
- [5] Xia D, Li W, Tang C, et al. Astragaloside IV, as a potential anticancer agent [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1065505.
- [6] Wang S, Fu JL, Hao HF, et al. Metabolic reprogramming by traditional Chinese medicine and its role in effective cancer therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170: 105728.
- [7] Guo J, Zeng H, Shi X, et al. A CFH peptide-decorated liposomal oxymatrine inactivates cancer-associated fibroblasts of hepatocellular carcinoma through epithelial-mesenchymal transition reversion [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20: 114.
- [8] Zang Y, Wan J, Zhang Z, et al. An updated role of astragaloside IV in heart failure [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110012.
- [9] Filipeczak N, Pan J, Yalamarty K, et al. Recent advancements in liposome technology [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 156: 4-22.

- [10] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Guideline. Quality Risk Management (Q9) [S]. USA: International Conference on Harmonisation, 2023: 1-7.
- [11] Daniel S, Kis Z, Kontoravdi C, et al. Quality by design for enabling RNA platform production processes [J]. Trends Biotechnol, 2022, 40: 1213-1228.
- [12] Barbălată I, Porfire S, Sesarman A, et al. A screening study for the development of simvastatin-doxorubicin liposomes, a co-formulation with future perspectives in colon cancer therapy [J]. Pharmaceutics, 2021, 13: 1526.
- [13] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中国药典) [S]. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China, 2020: 474-476.
- [14] Food and Drug Administration. Liposomes Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation [S]. Rockville: Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2018: 4-14.
- [15] Håkansson A. Emulsion formation by homogenization: current understanding and future perspectives [J]. Annu Rev Food Sci Technol, 2019, 10: 239-258.
- [16] Chen S, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point [J]. Nature, 2017, 541: 321-330.
- [17] Xiao X, Chen JY, Li CX, et al. Clinical application and pharmacokinetic study of nanocarriers in drug delivery system [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 856-866.
- [18] Wang ZH, Liu YL. Progress and prospect in the clinical translation of cancer nanomedicine [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 134-141.
- [19] Drescher S, van Hoogevest P. The phospholipid research center: current research in phospholipids and their use in drug delivery [J]. Pharmaceutics, 2020, 12: 1235.
- [20] Large DE, Abdelmessih RG, Fink EA, et al. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 176: 113851.
- [21] Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications [J]. Int J Pharm, 2021, 601: 120571.
- [22] Gouda A, Sakr OS, Nasr M, et al. Ethanol injection technique for liposomes formulation: an insight into development, influencing factors, challenges and applications [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2021, 61: 102174.
- [23] Yanar F, Mosayyebi A, Nastruzzi C, et al. Continuous-flow production of liposomes with a millireactor under varying fluidic conditions [J]. Pharmaceutics, 2020, 12: 1001.
- [24] Wagner A, Vorauer-Uhl K, Kreismayr G, et al. The crossflow injection technique: an improvement of the ethanol injection method [J]. J Liposome Res, 2002, 12: 259-270.
- [25] Du S, Deng Y. Studies on the encapsulation of oxymatrine into liposomes by ethanol injection and pH gradient method [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2006, 32: 791-797.
- [26] Peng J, Wang Q, Guo M, et al. Development of inhalable chitosan-coated oxymatrine liposomes to alleviate RSV-infected mice [J]. Int J Mol Sci, 2022, 24: 15909.
- [27] Kuo YC, Chen IY, Rajesh R. Astragaloside IV- and nesfatin-1-encapsulated phosphatidylserine liposomes conjugated with wheat germ agglutinin and leptin to activate anti-apoptotic pathway and block phosphorylated tau protein expression for Parkinson's disease treatment [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021, 129: 112361.
- [28] Yenduri G, Costa P, Xu X, et al. Impact of critical process parameters and critical material attributes on the critical quality attributes of liposomal formulations prepared using continuous processing [J]. Int J Pharm, 2022, 619: 121700.