

脂质体制备工艺的研究进展

刘璐, 贾殿隆

聊城大学药学院, 山东 聊城

收稿日期: 2022年3月28日; 录用日期: 2022年4月27日; 发布日期: 2022年5月6日

摘要

脂质体作为药物递送的良好载体, 其制备工艺距今约有半个多世纪的研究历史。实验室层面的脂质体制备技术已趋于成熟, 现阶段的研究主要着眼于脂质体的制备由实验室至工业生产的过渡, 若攻克此壁垒, 将迎来脂质体药物上市的春天。本文将从脂质体制备技术的传统和非传统两个方面进行介绍, 总结每个大类下的研究进展, 为实验中涉及脂质体制备的科研工作者提供帮助。

关键词

脂质体, 纳米材料, 药物递送, 脂质体的制备工艺

Research Progress of Liposome Preparation Technology

Lu Liu, Dianlong Jia

School of Pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng Shandong

Received: Mar. 28th, 2022; accepted: Apr. 27th, 2022; published: May 6th, 2022

Abstract

As a good carrier for drug delivery, liposomes have a research history of more than half a century in the preparation process. The liposome preparation technology at the laboratory level has become mature, and the current research mainly focuses on the transition of liposome preparation from laboratory to industrial production. If this barrier is overcome, it will usher in the spring of liposome drug listing. This article will introduce the traditional and non-traditional aspects of liposome preparation technology, summarize the research progress under each category, and provide help for scientific researchers involved in the preparation of liposomes.

Keywords

Liposomes, Nanomaterials, Drug Delivery, Preparation Technology of Liposomes

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

脂质体(Liposome), 是纳米递药系统研究领域的热点。它是由一个或多个包围水核的同心脂质双层组成的人造球形囊泡, 于 1964 年 Bangham 等人发表的论文中首次出现[1]。脂质体的脂双层结构结合药物后改变药物的药动学特征, 脂质体具有生物相容性好、无生物毒性、完全可生物降解且无免疫原性等优势, 这些优势决定了脂质体可以作为输送药物的载体, 药物可通过脂质体的封装减少药物直接与敏感组织接触的次数、增加稳定性、延长在体内循环时间, 减少用药量, 降低副作用[2]。1971 年 Gregoriadis 等研究人员的论文中首次将其作为药物递送系统应用[3], 在此后的五十年的时间里, 脂质体载药引起了人们极大的研究兴趣, 一些以脂质体为载体的药物也成功上市并取得了巨大的经济效益。Doxil®于 1995 年引入美国市场, 是第一个获得 FDA 监管批准的脂质体制剂[4]。

现已发现的脂质体制备技术多种多样, 每种技术方法都会影响脂质体的性质比如: 大小、层状、封装率[5]。如今, 脂质体实验室小规模生产已趋于成熟, 若想实现脂质体工业大规模的生产, 还需克服脂质体操作步骤多、批次间差异性大、脂质药物与有机相接触过多等许多问题[6] [7]。近几年人们对于非传统脂质体制造研究的兴趣不断增加, 人们致力于突破脂质体工业化生产的壁垒, 涌现出一大批结合超临界流体技术、微流体技术等新型技术的生产方式。本文将从传统和非传统的脂质体制备方式入手, 综述脂质体的制备方式。因篇幅有限无法兼顾所有研究, 文章将着重论述部分研究成果。

2. 传统的脂质体的制备方式

在脂质体的制备方法中有很多传统的制备方法, 比如: 薄膜水化法、溶剂注入法、逆向蒸发法等。总结归纳, 这些传统的方法几乎都是先将脂质溶解在有机溶剂中, 然后再去除有机溶剂, 之所以采取这样的操作方法, 是因为, 在水相中水比重很大, 磷脂在水中的临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)极低, 而采用生成脂质体的浓度远远大于其 CMC, 故如果将这么多的磷脂直接暴露在水相中不仅会生成脂质体, 还会形成一些其他磷脂聚合物。而先将脂质溶解在有机溶剂(例如: 氯仿、甲醇、乙醚、乙醇)中, 其溶解度高且稳定性好, 磷脂分子可以均匀分布在有机溶剂中, 使磷脂分子得到分散。脂质体制备是否成功的一个前提就是是否可以将脂质充分的分散开来[6]。

传统脂质体的制备方式大致可以概括为以下四步: 1) 将脂质(油相)溶解在有机溶剂中; 2) 去除有机溶剂; 3) 纯化和分离脂质体; 4) 通过超声或挤出法缩小脂质体的粒径

2.1. 薄膜水化法

薄膜水化法, 也成为 Bangham 法或手摇法, 是第一个报道的脂质体制备技术, 代表了脂质体技术中最简单和最古老的方法[1]。

脂质首先溶解在有机溶剂中(如果药物是脂溶性的一并溶解进去), 混合溶液被置于一个大的圆底烧瓶中, 通过减压旋蒸等方法将有机溶剂蒸干, 有机溶剂一般选用氯仿、乙醚、甲醇等溶剂, 这些溶剂有一

定的毒性,故一定要将有机溶剂蒸干,此过程一般在真空条件下暴露几个小时,故耗费时间长,为该法的限速步骤。在圆底烧瓶的表面会形成一层均匀的脂质薄膜,再加入水相(如果药物是亲水的,则将其溶解在水相中)并振荡,使脂质薄膜水化脱落以产生脂质体分散体。将脂质体分散体进行过膜挤压或超声,以获得目标粒径的脂质体。有关实验证明,该方式封装脂溶性药物时的封装率远远大于封装水溶性药物。在引用文献综述[8]中提到 Ran 和 Yalkowsky 在使用此方法时,用氟烷(一种不致癌症、不易燃的吸入麻醉剂)替代了有机溶剂,获得了较高的封装率和脂质体稳定性。

特指出此法水合步骤:在水合时,圆底烧瓶玻璃上堆叠的双层分离非常缓慢,而且当脂质薄片边缘能量大于弯曲能量时,薄片可变成球体,形成最小的脂质体。水合条件影响双层脂质薄片的合并速度,双层边缘合并的速度决定了脂质体的形成结构,双层边缘快速合并生成多层大囊泡(Multilamellar large vesicles, MLV),通过施加电场来增加双层分离速率或通过抑制流体流动动力来降低双层合并速率,则可以获得单层囊泡[9]。综上所述,双层折叠的相对动力学决定了形成的囊泡的大小和层状[10]。

2.2. 溶剂注入法

脂质体的制备也可以选用溶剂注入法。该方法是将溶解在有机溶剂(乙醇或乙醚)中的脂质快速注入水性介质中,从而形成脂质体。根据有机溶剂的不同可将其分为乙醇注入法和乙醚注入法。

2.2.1. 乙醇注入法

乙醇注入法是 Batzri 和 Korn 于 1973 年开发的一种制备方法[11]。是将含有脂质的乙醇溶液注入到大量水相中,无需经过任何中间过程即可快速形成囊泡,以此可以在没有超声处理过的情况下可以形成单双层脂质体,克服了薄膜水化法的不足。在引用文献[12]中介绍了乙醇注入法的微观过程:脂质分子从乙醇中自由排列成双层磷脂片段(Bilayer phospholipid fragments, BPF),若乙醇分散在水相中,BPF 在乙醇和水相之间的边界沉淀,然后通过双层磷脂片段的融合形成脂质体。在文献中[12]指出,BPF 的弯曲能量和曲率之间呈反比关系、弯曲能量与 BPF 长度之间呈反比关系,即囊泡形成所需能量排序 $MLV < \text{大单层囊泡(Large unilamellar vesicles, LUV)} < \text{小单层囊泡(Small unilamellar vesicles, SUV)}$, SUV 的形成需要大量的能量,故很难通过其他方法(例如薄膜水合法)制备,但乙醇注入法中乙醇为脂质分子提供了较大的表面积,从而减少了双分子层的厚度和 BPF 闭合期间的弯曲刚度,可以生成 SUV。

多种因素可以影响乙醇注入法产生脂质体,比如:注射速度、搅拌速度、脂质浓度、乙醇体积、水相渗透压等[5],详细见表 1。

Table 1. Factors influencing the preparation of liposomes by ethanol injection

表 1. 影响乙醇注入法制备脂质体的因素

影响因素	影响的结果
注射速度	对脂质体的粒径影响小,影响多分散指数(PDI)
搅拌速度	主要影响脂质体的粒径:流速增加脂质体粒径减小,达到一定流速后,粒径保持不变
脂质浓度	理论上增加脂质浓度,脂质体的粒径增加
乙醇体积	水介质中乙醇浓度为 7.5% v/v,是形成小粒径均质脂质体群体的完美比例[12] 若超过最佳限度,则生成的脂质体普遍偏大
水相渗透压、pH	渗透压对脂质体粒径的影响不大 pH 脂质体粒径的大小影响可忽略不计,极端 pH 可能会影响均匀性
药物类型	更适合脂溶性或溶于乙醇的药物

常规的溶剂注入法也存在一些弊端, 其中严重的问题大多是围绕乙醇展开的, 首要问题, 乙醇残留太多, 若乙醇和水形成共沸物, 此时再去除乙醇就比较难实现了, 但可以通过后期透析除去乙醇[8]。有研究人员发明了一种改良方法, 即将水溶液注入到乙醇溶液中去, 然后再旋转蒸发除去乙醇[13]。其次问题, 有一些脂质在乙醇中并不易溶, 而且乙醇可能会造成某些药物变性失效。

2.2.2. 乙醚注入法

另一种常见的溶剂注入法为乙醚注入法。将乙醚注入预热至 60℃ 的水相中, 乙醚挥发后形成脂质体。乙醚不溶于水, 易挥发, 此法虽仍有有机溶剂残留的问题, 但较乙醇注入法相比, 残留的较少[8]。但此法也具有局限性, 乙醚的生物毒性较大, 对实验操作者有隐形的安全问题。

2.3. 逆向蒸发法

文章中的前两种方法在大部分情况下对脂溶性药物的包封率优于水溶性药物的包封率, 且易形成 MLV (>500 nm), 虽然可通过超声或过膜挤出等方法制备 SUV (20~100 nm), 但脂质体内包含的水相的体积还是太少[14]。Szoka 和 Papahadjopoulos 在 1978 年发表的论文中首次提出了逆向蒸发法这种脂质体的制备方法[14]。逆向蒸发法的步骤大致与薄膜水化法类似, 最终的目的是形成反胶束或 w/o 乳液。经实验, 这种方法制备的脂质体, 在低离子强度的介质(例如: 0.01 M NaCl)中对水性药物的包封率也达 65%, 是传统脂质体制备方法中包封亲水性药物的最好的方法[2]。

文献中该方法的制备流程可概括为: 脂质溶解在有机溶液中, 加水相超声(间断性超声)乳化, 超声为反胶束后加入到圆底烧瓶中, 在旋转蒸发器中减压蒸发有机溶剂形成粘性凝胶, 然后再加入水相, 继续减压蒸发, 直至充分水化, 当去除足够的有机溶剂时, 凝胶塌陷并形成囊泡的水性悬浮液[5]。

逆向蒸发法虽然可以更好的截留水相, 但也具有一定的局限性。若包封水溶性的药物则直接将药物加到水相中进行包封, 会造成与有机溶剂直接接触, 且包封的物质直接与超声的环境条件接触[5], 因此不适合包封易碎分子, 例如肽。在制备过程中, 易造成有机溶剂残留, 这些有机溶剂可能与脂质和药物作用。

2.4. 表面活性剂去除法

在 1975 年 Helenius 和 Simons 发表了一篇文章[15], 文章讨论了表面活性剂对细胞膜的增溶, 在此基础上, 后续研究提出了在脂质 - 表面活性剂混合胶束中去除表面活性剂的重组脂质体的方式, 这种制备方法称为表面活性剂去除法或去污剂去除法。

该方法的操作步骤可以概括为: 先将脂质溶解到表面活性剂溶液里, 必须注意的是表面活性剂的浓度应高于 CMC。将此混合溶液与水相混合后, 再采用透析、稀释、凝胶排阻色谱等方式[16], 将表面活性剂去除。

表面活性剂去除的操作方式不同, 产生的结果也不同, 详见表 2。

Table 2. Methods for detergent removal

表 2. 表面活性剂去除方式

方式	优点	缺点
透析	技术简单、成本低	由于存在渗透压差异导致最终浓度未知; 实验重复性差、持续时间长
稀释	技术简单、可控	不适合大规模生产, 因不可无限稀释故无法完全去除表面活性剂

Continued

凝胶排阻色谱	技术简单、效率高、成本低、可重复使用	形成脂质体的脂质与凝胶接触时可能会被凝胶保留
酶促反应	速度快、效率高	酶和副产物去除较难

2.5. 复乳法

复乳法顾名思义是经过两次乳化制备脂质体的方法, 该方法的操作方式类似于逆向蒸发法, 对水性药物具有极强的包封能力, 具体步骤可以概括如下:

第一次乳化: 将少量水相(可包含药物)加入到大量的有机相中(一般是磷脂)形成 W_1/O 的反胶束, 然后选择性地减压去除部分有机溶剂; 第二次乳化: 将制备的 W_1/O 乳液添加到 10 倍体积的水相中进行混合形成 $W_1/O/W_2$ 乳液[17]; 通过减压除去有机溶剂以自组装形成囊泡。

近些年人们基于传统复乳法进行改造和创新, Kuroiwa 等人[18]在二次乳化中与微通道技术连用从而减少包封药物的泄露并增强了囊泡大小的均匀性。

3. 非传统的脂质体的制备方式

虽然基础脂质体的研究仍然是脂质体研究的核心, 若分析关于脂质体的其他研究, 明显发现人们对非传统脂质体制造的研究的兴趣在不断增加, 在这些其他研究中已发表的文献, 主要侧重于传统脂质体方式的替代方式[19]。在本节将对非传统脂质体的制备方式进行介绍, 这些方法在一定程度上减少了对有机溶剂的使用和制作步骤, 为脂质体大规模生产奠定基础。

3.1. 超临界流体技术

超临界流体(supercritical fluid, SCF)在压力和温度的控制下对某些脂类化合物具有很强的溶解能力, 且超临界流体选用的材料大多为无毒的二氧化碳, 故可将此技术应用于脂质体的制备。超临界流体法这类制备技术又可细分为: 注入减压法、超临界溶液快速膨胀法(rapid expansion of super critical solution, RESS)、气体反溶剂法(gas antisolvent, GAS)、超临界反溶剂法(supercritical antisolvent, SAS)、超临界逆向蒸发(supercritical reverse-phase evaporation, SCRPE)等。

3.1.1. 注入减压法

注入减压法由 Castor 和 Chu 于 1994 年提出, 是第一种 SCF 制备脂质体的技术[8]。根据操作方式的不同可以分为注入法和减压法。注入法: 脂质、有机溶剂和 SCF 的混合物通过喷嘴注入水相, 脂质体在注入水相后形成。脂质体的粒径大小取决于喷嘴开口直径。减压法: 先将脂质、水相和 SCF 混合, 然后将混合物减压, 使 SCF 与脂质和水相分离, 此过程脂质体逐渐形成。脂质体粒径大小取决于减压速率[20]。

3.1.2. 超临界溶液快速膨胀法(RESS)

在这个方法中, SCF 起到了溶剂的作用。RESS 通过改变 SCF 的温度和压力, 从而影响其溶解能力而形成脂质体。操作方式与减压法类似: 调整 SCF 的温度和压力, 将脂质和水相充分溶解在 SCF 中, 然后将混合物在极短的时间内经过一个特制的喷嘴, 快速降压破坏超临界状态, 以形成脂质体。此法不需要使用大量的有机溶剂且制得的脂质体粒径均一, 故应用广泛, 但制备压力过高, 大多数物质在 SCF 中的溶解度不高, 不适合大规模生产[21]。

3.1.3. 气体反溶剂法(GAS)

SCF 在此法中起到反溶剂的作用。反溶剂具有可以溶解原溶剂, 但不能溶解原溶剂溶质的特点。故

GAS 法的操作方式可以概括为: 先将脂质溶解在一定的有机溶剂中, 然后再将混合溶剂与 SCF 混合, 溶液体积膨胀, 有机溶剂发生过饱和, 溶质析出, 从而形成脂质体[22]。

3.1.4. 超临界反溶剂法(SAS)

目前, 该方法在脂质体制备过程中应用很普遍, SAS 与 GAS 十分类似(有的文章将 GAS 归为 SAS 中, 再将 SAS 分类为间歇式和连续式, 在本篇文章中将两者分开, GAS 特指间歇式制备策略, SAS 特指连续式策略), 其操作方式可以概括为将溶液通过特制喷嘴, 以小液滴的形式喷射到 SCF 中, 在短时间内析出溶质。其中在一项专利中将喷嘴改造为超声特制喷嘴, 以得到粒径更小更均匀的液滴[23]。SAS 可以减少有机溶剂的残留, 简化了操作步骤, 粒径可以调节, 可推广为工业大规模生产。

3.1.5. 超临界逆向蒸发法(SCRPE)

2001 年, Katsuto Otake 等人开发了一种超临界逆向蒸发法制备脂质体[24], 在该方法中, 在高于脂质相变温度下, 将脂质、有机助溶剂、SCF 在电池中混合搅拌在一起, 然后对该系统进行减压, 不同于 3.1.1 中介绍的减压法, 该法是通过储存溶液的电池释放气体而减压。脂质体的形成是水相引入电池后形成的, 减压后, CO₂ 从水相中蒸发。2006 年还是 Otake 等人改进了 SCRRE 方法, 详细请见引用文献[25]。

3.2. 微流体技术

近些年, 微流体技术在脂质体制造领域引起了科研工作者的极大兴趣, 有研究表明, 可以将脂质体的制造从实验台转移到 GMP 车间, 由此实现脂质体的批量生产。该方法生产脂质体的原理与反溶剂法类似, 微流体技术创造了一种使多种溶液快速混合的条件, 微通道中的流动促进了醇中的磷脂溶液和水相缓冲液之间的扩散混合[9]。多种溶剂的混合致使溶液极性变化从而导致脂质的溶解度下降, 最终沉淀形成脂质体。

微流体技术生产脂质体的关键装置是混合器, 微流控混合器的设计方向大致可以分为三个方向: 1) 应用流体动力学聚焦方法: 2004 年 Jahn 等人首次提出将微流体动力学聚焦方法(Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing, MHF)应用于脂质体的生产, 并已成功生产出单分散脂质体[26]。MHF 装置可具有平面 2D 几何形状或 3D 几何形状; 2) 设计基于液滴的微流控系统: 乳化液滴是通过使用两种不互溶的流体形成的, 例如水和油, 以及毛细管微流控装置; 3) 应用被动混合器: 交错人字混合器(staggered herringbone mixer, SHM)是最常见的被动混合器之一, SHM 的主要优点是制造工艺简单, 能够在低雷诺数下实现流体的完全混合[27]。微流控混合器的相关仪器图片请见引用文献[27]。

3.3. 冷冻干燥法

冷冻干燥法主要用于生产无菌和无热源的亚微米小尺寸脂质体[28], 有时也会用于脂质体的储存。该方法将脂质体在冻干保护剂(比如: 蔗糖、甘露糖、乳糖和海藻糖, 最常用海藻糖)存在的条件下冷冻干燥, 若加入适当的水性缓冲溶液后发生再水合, 然后形成脂质体悬浮液。该技术作为一种解决脂质体长时间储存困难的方法具有很大的潜力, 但在冷冻的情况下有时会造成包封物质的泄露。在引用文献中, 对冷冻干燥法制备脂质体进行了很全面的综述[29]。

3.4. 其他的制备方式

超临界流体、微流体和冷冻干燥法这三种非传统脂质体制备技术已经近乎成熟, 除此之外还有很多新兴的脂质体制备技术, 见表 3。

Table 3. Emerging liposome preparation technology
表 3. 新兴的脂质体制备技术

名称	简介
填充床反应器	使用可提供高重力的技术——旋转填料床生产药物负载脂质体, 可用于大规模生产[30]
双不对称离心	是一种用于制备小脂质体的新型均质化技术, 该法应用双不对称离心技术生产非常小批量的 siRNA-脂质体[31]
喷雾干燥法	该法通常制备吸入给药或经皮给药的脂质体制剂[32] [33]
凝胶辅助水化法	凝胶辅助水合法已成为一种替代电铸的方法, 在生理离子强度的溶液中产生 GUV, 囊泡生成的速度快[28]
改良的电铸法	Taylor 等人基于钨锡氧化物载玻片与脂质溶液和电铸的微图案化相结合, 开发出制备单分散巨脂质体的新技术[34]
高剪切力法	用于制造含有疫苗佐剂的免疫原性脂质体, 已获取专利[6]

4. 临床研究中脂质体制剂的制备

脂质体可以在人类感染和炎症部位积累[35], 也可以通过对脂质体的修饰可以使脂质体表面带有电荷从而对某些特殊物质进行封装, 除了小分子化疗药物的封装外, 越来越多的研究集中在脂质体对基因药物(包括 mRNA, pDNA, siRNA 等), 蛋白质药物, 激素药物等的封装和递送能力上[36], 如今, 脂质体被研究应用于多种疾病的治疗, 取得了一定的进展。尤其是在脂质体疫苗研制领域, 已上市的代表药物有 Epaxal® 和 Inflexal® (分别肌内注射以预防甲型肝炎和季节性流感)、Mosquirix® 疟疾疫苗和 Shingrix® 带状疱疹疫苗(通过将含有适当免疫刺激素的脂质体与抗原混合来制备) [37], 如今在应对 COVID-19 疫情大背景下, mRNA 的应用有着举足轻重的作用, 但 mRNA 稳定性差, 很多人选用纳米材料对 mRNA 进行包封, FDA 已授予 BNT162b2 (辉瑞/BioNTech)和 mRNA-1273 (Moderna)两种药物的紧急使用授权, 它们都采用脂质纳米颗粒(Lipid nano particles, LNP)载体进行包封的 mRNA 疫苗[36], 这两种药物所选用的纳米包封材料 LNP 通常采用微流体技术制备, 将制备材料快速混合, 步骤简易快速且可用于大规模生产; 脂质体与 LNP 相比, 脂质体的制备工艺和包封 mRNA 技术相对复杂, Huang 等人首次报道了一种包裹 SARS-CoV-2 RBD-mRNA 的脂质体来对抗 SARS-CoV-2 感染, 该实验中脂质体采用薄膜分散法进行制备[38]; 米歇尔等人[39]曾经采用薄膜分散法制备阳离子脂质体试图对 mRNA 进行良好的包封, 操作方式如下: 将脂质溶解在氯仿中, 在通入氩气流的条件下(无 O₂)进行干燥和真空蒸发过夜, 将形成的脂质层用无核酸酶的水相再水化, 然后涡旋、超声(30 min)、挤压(通过孔径为 200 nm 的膜)获得单层脂质体, 最后孵育包封 mRNA, 虽然该研究证明了特殊脂材(DC-cholesterol/DOPE liposomes)制成的脂质体可用作具有高封装效率的 mRNA 的高功能递送载体, 但在该两种脂质体研究中, 脂质体制备和 mRNA 包封的方式复杂, 且较难应用于大规模生产。在引用文献[36] [37] [40]中对脂质体疫苗领域进行了很详细的综述, 并解释了相关的原理和机制。

5. 结语

脂质体作为基于脂质的纳米材料, 拥有半个多世纪的研究历史, 在临床中已经应用为药物的载体。脂质体未来的发展历程必然是机遇和挑战并存的: 机遇体现在脂质体是药物和患者的双重保护伞, 一方面保护药物不会被尽快代谢, 一方面保护患者, 因对脂质体进行靶向修饰, 从而降低一部分副作用。目前前沿科学许多已经涉及了对经典小分子和 RNA 递送, 并取得一定的进展。作为一种类似于生物膜的复

杂的药物制剂, 实现脂质体批量生产的工业技术选择性少而且不成熟。现在正处在纳米药物研究的热潮, 不仅脂质体, 其他纳米递药材料: 微球、胶束等的研究各个实验室正在如火如荼地进行, 谁先突破纳米药物工业化生产的难点, 无疑可独立鳌头。可以相信的一点是, 在未来, 对脂质体研究的投资将会不断加大, 新型脂质体药物也将不断上市, 为更多的疾病治疗带来新的希望。

基金项目

山东省大学生创新创业训练计划项目(S202110447020)。

参考文献

- [1] Bangham, A.D., Standish, M.M. and Watkins, J.C. (1965) Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, **13**, IN26-IN27. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
- [2] Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., et al. (2013) Liposome: Classification, Preparation, and Applications. *Nanoscale Research Letters*, **8**, Article No. 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- [3] Gregoriadis, G., Leathwood, P.D. and Ryman, B.E. (1971) Enzyme Entrapment in Liposomes. *FEBS Letters*, **14**, 95-99.
- [4] Doxil, B.Y. (2012) The First FDA-Approved Nano-Drug: Lessons Learned. *Journal of Controlled Release*, **160**, 117-134. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80109-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80109-6)
- [5] Diana, G., Artur, C.-P. and Eugénia, N. (2021) Design of Liposomes as Drug Delivery System for Therapeutic Applications. *International Journal of Pharmaceutics*, **601**, Article ID: 120571. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571>
- [6] Shah, S., Dhawan, V., Holm, R., Nagarsenker, M.S. and Perrie, Y. (2020) Liposomes: Advancements and Innovation in the Manufacturing Process. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **154-155**, 102-122. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.002>
- [7] Đorđević, S., Gonzalez, M.M., Conejos-Sánchez, I., Carreira, B., Pozzi, S., Acúrcio, R.C., et al. (2022) Current Hurdles to the Translation of Nanomedicines from Bench to the Clinic. *Drug Delivery and Translational Research*, **12**, 500-525. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-01024-2>
- [8] Meure, L.A., Foster, N.R. and Fariba, D. (2008) Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review. *AAPS PharmSciTech*, **9**, Article No. 798. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9097-x>
- [9] Patil, Y.P. and Jadhav, S. (2014) Novel Methods for Liposome Preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, **177**, 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>
- [10] Guida, V. (2010) Thermodynamics and Kinetics of Vesicles Formation Processes. *Advances in Colloid and Interface Science*, **161**, 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2009.11.004>
- [11] Batzri, S. and Korn, E.D. (1973) Single Bilayer Liposomes Prepared without Sonication. *Biochimica et Biophysica Acta*, **298**, 1015-1019. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90408-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90408-2)
- [12] Ahmed, G., Sakr, O.S., Maha, N. and Omaima, S. (2020) Ethanol Injection Technique for Liposomes Formulation: An Insight into Development, Influencing Factors, Challenges and Applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **61**, Article ID: 102174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102174>
- [13] Maitani, Y., Soeda, H., Junping, W. and Takayam, K. (2001) Modified Ethanol Injection Method For Liposomes Containing Beta-Sitosterol Beta-D-Glucoside. *Journal of Liposome Research*, **11**, 115-125. <https://doi.org/10.1081/LPR-100103174>
- [14] Szoka Jr., F. and Papahadjopoulos, D. (1978) Procedure for Preparation of Liposomes with Large Internal Aqueous Space and High Capture by Reverse-Phase Evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **75**, 4194-4198.
- [15] Helenius, A. and Simons, K. (1975) Solubilization of Membranes by Detergents. *Biochimica et Biophysica Acta—Reviews on Biomembranes*, **415**, 29-79. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(75\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0304-4157(75)90016-7)
- [16] 刘晓谦, 王锦玉, 全燕, 王智民. 脂质体制备技术及其研究进展[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(14): 1084-1088.
- [17] 侯丽芬, 谷克仁, 吴永辉. 不同制剂脂质体制备方法的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37(5): 118-124.
- [18] Kuroiwa, T., Horikoshi, K., Suzuki, A., Neves, M.A., Kobayashi, I., Uemura, K., et al. (2016) Efficient Encapsulation

- of a Water-Soluble Molecule into Lipid Vesicles Using W/O/W Multiple Emulsions via Solvent Evaporation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **93**, 421-430. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2777-2>
- [19] Pattni, B.S., Chupin, V.V. and Torchilin, V.P. (2015) New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chemical Reviews*, **115**, 10938-10966. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00046>
- [20] Karn, P.R., Cho, W. and Hwang, S.-J. (2013) Liposomal Drug Products and Recent Advances in the Synthesis of Supercritical Fluid-Mediated liposomes. *Nanomedicine*, **8**, 1529-1548. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.131>
- [21] 徐少洪, 赵斌, 闫志强, 刘璐, 何丹农. 超临界流体技术在脂质体制备中的应用[J]. 材料导报, 2014, 28(5): 98-102.
- [22] 刘辉, 潘卫三, 周丽莉, 郭宏. 超临界流体技术及其在药物制剂中的应用[J]. 药学报, 2006, 41(12): 1123-1129.
- [23] Subramaniam, B., Saim, S., Rajewski, R.A. and Stella, V. (1998) Methods for a Particle Precipitation and Coating Using Near-Critical and Supercritical Antisolvents. Patent No. US5833891A.
- [24] Otake, K., Imura, T., Sakai, H. and Abe, M. (2001) Development of a New Preparation Method of Liposomes Using Supercritical Carbon Dioxide. *Langmuir*, **17**, 3898-3901. <https://doi.org/10.1021/la010122k>
- [25] Katsuto, O., Takeshi, S., Toshihiro, G., Tomohiro, I., Takeshi, F., Satoshi, Y., *et al.* (2006) Preparation of Liposomes using an Improved Supercritical Reverse Phase Evaporation Method. *Langmuir*, **22**, 2543-2550. <https://doi.org/10.1021/la051654u>
- [26] Jahn, A., Vreeland, W.N., Gaitan, M. and Locascio, L.E. (2004) Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 2674-2675.
- [27] Sarah, S., Linda, H., Boyd, B.J. and Arlene, M. (2019) Microfluidics for the Production of Nanomedicines: Considerations for Polymer and Lipid-Based Systems. *Pharmaceutical Nanotechnology*, **7**, 423-443. <https://doi.org/10.2174/2211738507666191019154815>
- [28] Has, C. and Sunthar, P. (2019) A Comprehensive Review on Recent Preparation Techniques of Liposomes. *Journal of Liposome Research*, **30**, 336-365. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010>
- [29] Chen, C., Han, D., Cai, C. and Tang, X. (2009) An Overview of Liposome Lyophilization and Its Future Potential. *Journal of Controlled Release*, **142**, 299-311. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.024>
- [30] Liu, Y., Wu, K., Wang, J., Le, Y. and Zhang, L. (2018) Continuous Production of Antioxidant Liposome for Synergistic Cancer Treatment Using High-Gravity Rotating Packed Bed. *Chemical Engineering Journal*, **334**, 1766-1774. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.11.143>
- [31] Hirsch, M., Ziroli, V., Helm, M. and Massing, U. (2008) Preparation of Small Amounts of Sterile siRNA-Liposomes with High Entrapping Efficiency by Dual Asymmetric Centrifugation (DAC). *Journal of Controlled Release*, **135**, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.11.029>
- [32] Maniyar, M.G. and Kokare, C.R. (2019) Formulation and Evaluation of Spray Dried Liposomes of Lopinavir for Topical Application. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **49**, 259-270. <https://doi.org/10.1007/s40005-018-0403-7>
- [33] Ru, B., Wei, S., Qun, W. and Na, Z. (2008) Spray-Freeze-Dried Dry Powder Inhalation of Insulin-Loaded Liposomes for Enhanced Pulmonary Delivery. *Journal of Drug Targeting*, **16**, 639-648. <https://doi.org/10.1080/10611860802201134>
- [34] Pietro, T., Chun, X., Fletcher, P.D.I. (2003) A Novel Technique for Preparation of Monodisperse Giant Liposomes. *Chemical Communications*, No. 14, 1732-1733.
- [35] Allen, T.M. and Cullis, P.R. (2013) Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**, 36-48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
- [36] Li, M., Li, Y., Li, S., Jia, L., Wang, H., Li, M., *et al.* (2022) The Nano Delivery Systems and Applications of mRNA. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **227**, Article ID: 113910. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113910>
- [37] Tretiakova, D.S. and Vodovozova, E.L. (2022) Liposomes as Adjuvants and Vaccine Delivery Systems. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, **16**, 1-20. <https://doi.org/10.1134/S1990747822020076>
- [38] Huang, H., Zhang, C., Yang, S., Xiao, W., Zheng, Q. and Song, X. (2021) The Investigation of mRNA Vaccines Formulated in Liposomes Administrated in Multiple Routes against SARS-CoV-2. *Journal of Controlled Release*, **335**, 449-456. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.07.013>
- [39] Michel, T., Luft, D., Abraham, M.-K., Reinhardt, S., Salinas Medina, M.L., Kurz, J., *et al.* (2017) Cationic Nanoliposomes Meet mRNA: Efficient Delivery of Modified mRNA Using Hemocompatible and Stable Vectors for Therapeutic Applications. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, **8**, 459-468. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.07.013>
- [40] Nisini, R., Poerio, N., Mariotti, S., De Santis, F. and Fraziano, M. (2018) The Multirole of Liposomes in Therapy and Prevention of Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, **9**, Article No. 155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00155>