

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

雙層包覆型微脂粒劑型之開發

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2622-E-038-001-CC3

執行期間：93年05月01日至94年04月30日

執行單位：臺北醫學大學生物醫學材料研究所

計畫主持人：劉得任

計畫參與人員：劉得任 王俊豐

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫為提升產業技術及人才培育研究計畫，不提供公開查詢

中 華 民 國 94 年 8 月 8 日

行政院國家科學委員會專題研究(提升產業技術及人才培育
研究計畫)計畫成果報告

雙層包覆型微脂粒劑型之開發

計畫編號：NSC 93-2622-E-038-001-CC3

執行期限：93年5月1日 至 94年4月30日

主持人：劉得任

臺北醫大學生物醫學材料所

主持人：何一滔

英麗明高科技醫療儀器股份有限公司

計畫參與人員：劉得任

臺北醫大學生物醫學材料所

計畫參與人員：王俊豐

英麗明高科技醫療儀器股份有限公司

中文摘要

微脂粒分類一般傳統上分成MLV、 LUV 、 SUV 三類，由於結構上不同使得它們具有不同之藥物包覆率以及藥物釋放動力。本計畫，我們開發雙層包覆型微脂(DEV)粒，我們除了發現其藥物釋放動力明顯不同於傳統式，也同時發現其藥物之出始(0~12小時)釋放速率以及釋放量極低。因此，我們認為DEV-liposome 可發展成延緩釋放藥物之載體。未來，假若再配合(混合)其它三種傳統劑型之微脂粒更可能發展出長效劑型藥物載體。

關鍵詞：雙層包覆型微脂粒，剪應力

英文摘要

Liposomes are conventionally divided into three categories: MLV, LUV, SUV. They have different drug encapsulation efficiencies and drug release kinetics depending on their structure. In our study, we have developed DEV (double encapsulated vesicles) which has been observed that its drug release kinetic significantly differed from conventional ones. The initial drug release rate and amount (0~12 hrs) were very low. Therefore, we suggest that DEV-liposome may develop a novel carrier controlling the time delay for drug release. Furthermore, in the event of coordinating with other three conventional liposomes, DE-liposome may become a potential long-lasting drug carrier.

Key-words: DEV-liposome, shear force

一.緣由與目的

微脂粒之簡介

微脂粒是在 1965 年由英國科學家 Bangham 所發現，當磷脂質薄膜處於水相環境系統中，會形成許多類似洋蔥多層結構(multilamellar structure)的中空球體(此即為微脂粒)。由於微脂粒的結構組成類似生物膜(biomembrane)，因此微脂粒間接提供了科學家用來模擬細胞膜與膜蛋白(membrane protein)間交互作用之系統模式，包含細胞膜的滲透性、細胞膜的融合以及細胞膜與蛋白質的反應。此外，也因為微脂粒(liposome)的特殊中空球體構造，在微脂粒脂雙層的結構中，可保留疏水性藥物；其內部水相區中，可包覆水溶性藥物，因此，無論是親疏水性藥物微脂粒都將是一良好之藥物載體。另外，也由於微脂粒為天然物質所構成，具有良好的生物相容性(compatible)及生物可分解性(biodegradable)，所以再再顯示出微脂粒在藥物輸送方面具有很大之應用潛能，包括廣泛被應用於作藥物控制釋放的載體(carriers)、藥物之保護載體，如血紅素、蛋白質藥物、癌症藥物等等。事實上，微脂粒之發展到今天已有將近40年，有關於微脂粒之改進無論是在製程、包覆藥物之方法、表面改質方面都已有相當大之進步與突破。在此，就微脂粒分類、微脂粒的製備方法、微脂粒的穩定性以及發展之相關研究我們做一簡述如下：

微脂粒分類

若以微脂粒的脂質分子組成觀點，可將微脂粒分類成表面不帶電之中性微脂粒以及表面帶有正電或負電型之離子型微脂粒；若以微脂粒粒子大小分類則可分成大型微脂粒(粒徑大小 1000~3000nm)以及小型微脂粒(粒徑大小 50~200nm)；若以微脂粒粒子囊泡層數分類可分成多層脂雙層之微脂粒以及單層脂雙層之微脂粒，此外也可將微脂粒表面改質開發出所謂改質

修飾型之微脂粒。如此說來，開發一新型微脂粒劑型是可以有多種型態組合的。

事實上，利用微脂粒做為藥物載體或劑型設計一直是人們希望突破之技術，經過近 20 年之研究發展，就藥物包覆率以及藥物釋放動力模式，科學家已開發出許多不同藥物釋放動力模式之微脂粒劑型，例如有：大型多層包覆(MLV)、大型單層包覆(LUV)以及小型單層包覆(SUV)等等，雖然這些型態之微脂粒其藥物釋放動力模式都有所不同，但其共同點都顯示其起始之藥物釋放速率以及釋放量都很大，這對藥物之控制釋放之設計是不完美的。因此，本研究主要之目的是想開發出一新型藥物釋放動力模式之微脂粒(雙層包覆型微脂粒)劑形，希望此新劑型能夠做到藥物投與之出始(0~6 小時)其藥物釋放速率以及釋放量極低，以達到所謂延緩釋放之新劑型。

二. 實驗設備與方法

雙層包覆型微脂粒(DEV)之製備

a. 大size之空白微脂粒的製備

- 1.將所選擇的配方物質置於磨口燒瓶中，加入氯仿，使配方完全溶解並呈現均勻液相。
- 2.將磨口燒瓶接上真空濃縮儀。並水浴將溫度控制在40℃，旋轉速度適度，抽真空將溶劑抽乾，使配方物質在瓶壁上形成一均勻薄膜。
- 3.加入緩衝溶液，以水浴式超音波振盪器振盪，使脂質膜完全由瓶壁脫落進入溶液中，形成多層微泡(MLVs)溶液。
- 4.利用擠壓器擠壓，微脂粒擠壓步驟恆溫在50℃下先放入polyester drain discs，再放入nuclepore membrane(diameter 25mm, pore 250 nm)，組裝後，加入微脂粒溶液，打開氮氣壓力閥，藉由密閉產生的壓力使微脂粒溶液擠壓經過濾膜，並收集微脂粒溶液樣品，重複三次，即完成擠壓步

驟。

5. 收集微脂粒溶液，裝入樣品瓶中，待進行其它實驗。

b. 包覆螢光物質之小 size 微脂粒的製備

1. 步驟同上述之1-5，但是在步驟3時加入螢光水溶液，使配方與螢完全溶解並呈現均勻液相。步驟4之nuclepore membrane改成diameter 25 mm, pore 50 nm

c. 雙層包覆型微脂粒之製備

1. 首先將b製放於4 °C環境下30分鐘,而a則分開製放於50 °C下10分鐘。
2. 迅速將b倒入a中並且充分搖晃數秒後直接再迅速倒入液態氮中使其迅速固化。
3. 將已固化之微脂粒置放於4 °C環境下使其自然解凍。

雙層包覆型微脂粒於剪應流場下之藥動模式之建立

1. 將雙層包覆型微脂粒懸浮液取4ml放置於黏度儀槽中(cone/plate)，調整好cone以及plate之感應距離後，調整欲操作之剪切率使其作流場試驗。
2. 本系統之流場剪應力實驗系統是將待測之雙層包覆型微脂粒懸浮液置放於cone/plate之黏度儀中，以特定之剪切率(250sec⁻¹)對其shear 0、4、8、hr 觀測雙層包覆型微脂粒懸浮液於流場shear之後其隨培養時間粒徑與螢光滲漏率之變化情形。
3. 雙層包覆型微脂粒樣本以奈米粒徑儀及 HPLC 分析之。

雙層包覆型微脂粒粒徑的測量

1. 將奈米粒徑儀電源打開暖機至少20分鐘，使光源穩定。

- 2.取出雙層包覆型微脂粒溶液置於乾淨的四面透明的比色槽中，再以緩衝溶液稀釋，並避免容氣內有氣泡產生。
- 3.將四面透明的比色槽放入儀器中，設定參數(包括了黏度、折射率等)進行測量。
- 4.每個樣品測量 10 次，取其平均值。

四.結果與討論

雙層包覆型微脂粒物性

	DEV型微脂粒	LUV型微脂粒	SUV型微脂粒
徑徑(nm)	354 ± 28	332 ± 32	78 ± 16
包覆率	48%	59%	51%
穩定度(4)	90天	100天	105天

說明: “穩定度”意指其粒徑增加10%之天數

雙層包覆型微脂粒於流場環境之釋放動力

	4 Hr	8 Hr	12Hr	16 Hr
DEV型微脂粒				
37 下 Shear rate 250	3 %	8%	11%	13%
LUV型微脂粒				
37 下 Shear rate 250	41%	61%	72%	79%
SUV型微脂粒				
37 下 Shear rate 250	37%	55%	64%	69%

五. 參考資料

- [1] D. D. Lasic, H. Strey, M.C. Stuart, R. Podgornic and P.M. Frederic. *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 832.
- [2] H. M. Chen, V. Torchilin, and, L.Robert. *Journal of Control Release.* 42(1996) 263-272.
- [3] P. L. Beaumier and K. J. Hwang. *Biochim. Biophys. Acta.* 731(1983) 23.
- [4] C. R. Alving and N. M. Wassef. *J. Liposome Res.* 2 (1992) 383.
- [5] E.Zimmermann and R. H. Muller. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 52 (2001) 203-210.
- [6] M. C. Woodle and D.D. Lasic. *Biochim. Biophys. Acta.* 1113 (1992) 171.
- [7] M.C. Woodle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32 (1998) 139.
- [8] I. Henriksen , G. Smistad. and J.Karlsen. *International J. of Pharmaceutics*, 101(1994)227-236.
- [9] H.Ping, S. S.David , and L.Illum , *International J. of Pharmaceutics* , 166 (1998) 75-88.
- [10] K. Iwanaga, S. Ono, K. Narioka, M. Kakemi, K. Morimoto, S. Yamashita, Y. Namba, N. Oku, *J. Pharm. Sci.* 88 (2) (1999) 248–252.
- [11] M.H. Lee, Y. Roussel, M. Wilks, S. Tabaqchali, *Vaccine* 19 (28–29) (2001) 3927–3935.
- [12] B.A. Lidbury, T.V. Grissell, P.J. Sizer, R. Clancy, A.W.Cripps, *Immunol. Cell Biol.* 78 (2) (2000) 149–155.

- [13] D.J. Smith, W.F. King, L.A. Barnes, D. Trantolo, D.L. Wise, M.A. Taubman, *Infect. Immunol.* 69 (8) (2001) 4767–4773.
- [14] M.A. Jepson, M.A. Clark, N. Foster, C.M. Mason, M.K. Bennett, N.L. Simmons, B.H. Hirst, *J. Anat.* 189 (Pt. 3) (1996) 507–516.