

[新應用] 精準給藥-連續製備 負載核酸藥物的奈米顆粒

研究背景

近年來，奈米顆粒被廣泛應用於藥物體內傳遞的領域，部分已進入市場或處於臨床試驗研究階段。

自2020年以來，新冠疫情肆虐，自從科學家們發展出了mRNA疫苗後，脂質體奈米顆粒越來越受到關注，活性物質在體內的安全運輸問題成為了一大難題。

透過奈米顆粒對藥物進行包裹，能夠延長其在體內循環、釋放的時間，有效提高藥效，核酸類藥物能透過這種負載方式獲得更大的優勢。

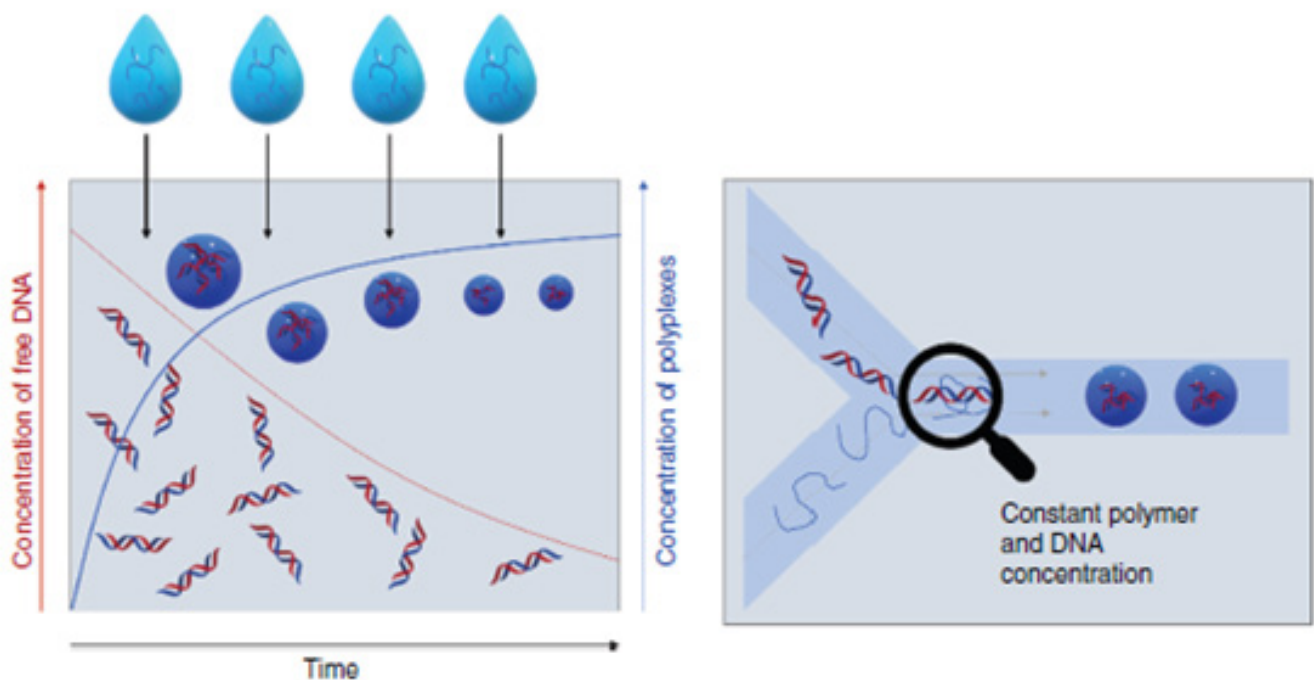


圖1 釜式製程（左）和連續流（右）中DNA和聚合物混合效果對比

而與傳統的間歇釜式製程相比，連續化的負載和組裝更容易獲得可重現的，穩定的高品質製程和產品（圖1），後者也逐漸成為了科學研究的重點。

澳洲新南威爾斯大學的Martina教授，對負載核酸藥物的奈米顆粒聚合物的連續製備這一研究領域進行了綜述。

主要包括以下內容：

Part 1

- 傳統製備工藝中存在的缺陷
- 不同類型的連續流製備裝置及原理

Part 2

- 連續製備過程中對奈米顆粒粒徑大小的影響因素

本期我們將著重介紹Part 1，請您點擊關注康寧反應器技術，繼續了解下一期 Part 2 精彩分享。

研究過程

01 傳統製備工藝

1.1 奈米顆粒的粒徑

奈米顆粒的粒徑大小是藥物遞送過程中最重要的參數之一。通常，較小的奈米顆粒能在人體血液循環內維持更長的停留時間，達到藥物緩釋的效果。

- 研究者曾以金奈米顆粒進行展示證明，10-100奈米為其藥用粒徑的最佳範圍。
- 小於10奈米會被人體的腎臟過濾去除，不利於吸收；
- 大於100奈米則會被單核巨噬細胞系統吞噬，或在肝脾中累積，同樣無法獲得藥效。
- 研究表明，10-50奈米的奈米顆粒能有效滲透進入腫瘤內部，實現精確給藥，而50-100奈米則對腫瘤外部用藥更有優勢。

因此，對於不同功能的藥物，要實現體內循環、滲透或細胞攝取，都對奈米顆粒的尺寸大小有不同的要求。而在傳統製程中，通常難以得到粒徑較小的奈米顆粒，且製程可重現性較差，對粒徑的可調控性較差，不利於批量化生產符合標準的產品。

1.2 多分散性係數PDI

PDI是微球或奈米顆粒製備過程中另一個重要指標。PDI是多分散性係數的簡稱，表徵粒徑分佈的均勻性，其數值越小，表示分佈越窄，樣品的均勻性較佳。

傳統方法的缺陷：

- 在傳統的釜式攪拌中，由於涉及兩組分的混合，在相互滴加的過程中，溶液的組分會不可避免的隨時發生變化（如圖1），導致粒徑分佈不夠均勻；
- 同時，由於強的靜電相互作用，也會局部形成大體積的多聚體；
- 而過於寬的粒徑分佈，在生物體內則會發生一些意料之外的結果，不利於人們對藥效的評估與控制。

連續製備由於其獨特的混合、進料方式，不存在溶液組分變動的問題，通常可以製備出均一性較高的奈米顆粒。

02 不同的連續流製備裝置

在早期，為了解決低重現性、高分散性以及難以放大的問題，科學家們使用兩個不同的注射器，對物料進行混合，能夠以此合成300奈米左右的顆粒，但該法產品品質受制於操作者的實驗水平，不同的人進行操作，往往難以得到平行的實驗結果。

2.1 反應器設計

基於這種需求，人們設計出了集進料、混合、反應、淬滅等於一體的連續流微通道反應器，其通常用玻璃作為材料，對於不同的反應體系，亦可採用不同的設備材料，例如：特氟龍、碳化矽、有機矽聚合物等。



圖2 (a).T形混合口(b).Y形混合口(c).流動聚焦混合

物料在微通道中的混合方式可分為主動混合和被動混合。

- 在主動混合過程中，通常需要整合外部的超音波、電磁驅動、壓力驅動、電泳力驅動等，也可以將微型的攪拌擾流裝置整合於微通道中。
- 被動混合透過控制流速來調節反應速率，經T形或Y形口來混合溶液，而透過流動聚焦的方式（圖2），可以得到更高的流速，得到更好的混合效果。

2.2 反應器改進

物料透過Y形口混合，在通道較窄的情況下，容易出現層流，導致混合效果還不夠好，如圖3。

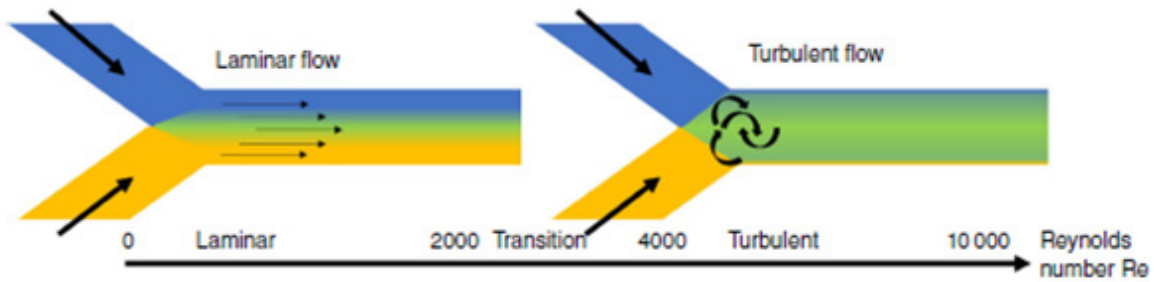


圖3 從層流混合轉變為湍流混合示意圖

因此，人們設計了新型微流控裝置，透過內建障礙物、建構相交通道、鋸齒通道、三維蛇形結構等，達到湍流從而實現混合擾流裝置，更容易減小批次間的差異。

上述這些改進都被用在單通道連續製備載藥奈米顆粒的設備中，可以使得物料在奈米尺度上快速連續混合。

2.3 反應器升級

如圖4所示的整合了連續逐級稀釋裝置和「人」字形混合器的反應設備，可以滿足同時篩選多個實驗條件的需求，提高了實驗效率。

目前已有用「人」字形微通道混合器生產負載阿奇黴素的藥物或負載siRNA的奈米顆粒。

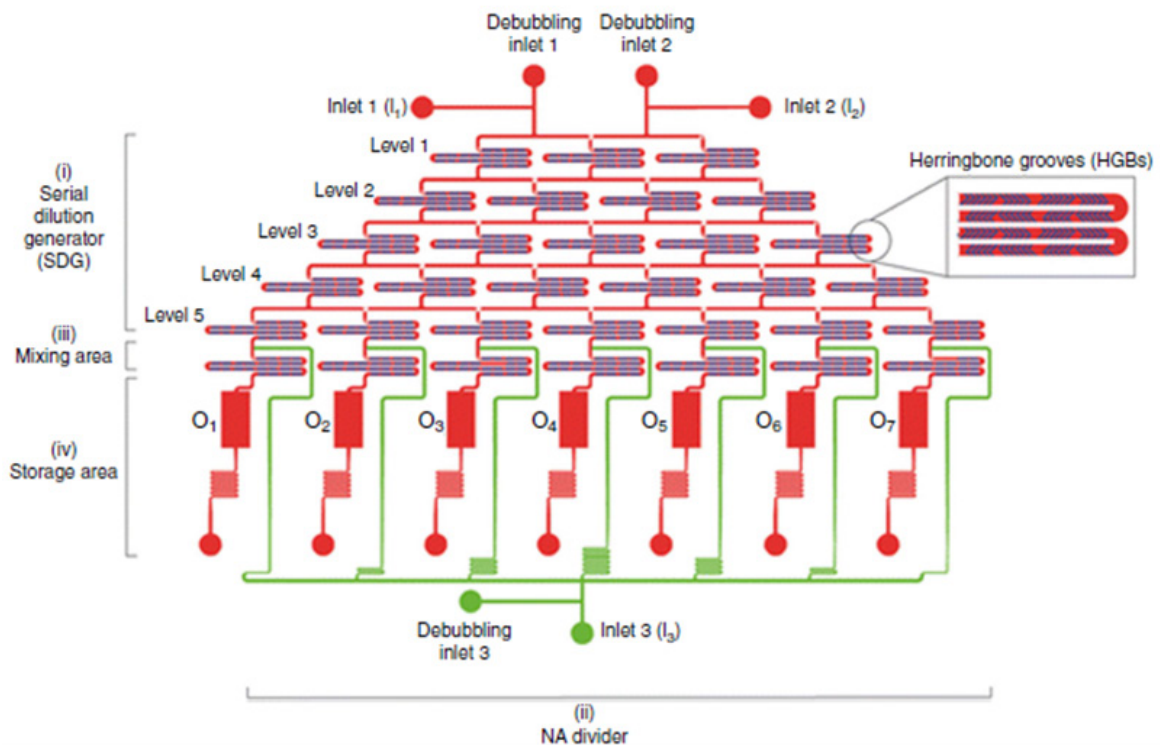


圖4 整合了「人」字型混合器和連續逐級稀釋裝置的微通道設備

4.1 傳質的影響

間歇釜中攪拌的工藝，由於其局部異質性高，所生產的奈米顆粒分散性較高。相較之下，連續流技術能有效提升混合效率，粒徑尺寸和PDI都要小於釜式條件。

4.2 流速即反應停留時間的影響

此外，兩股物料的流速比對奈米顆粒的粒徑也有較大的影響。在pDNA負載的脂質體聚合物奈米顆粒的研究過程中，人們嘗試了水相:有機相3:1和5:1的不同條件，更低的流速比會形成更小的尺寸和PDI值。甚至在均相混合體系中，流速比亦對最終的實驗結果有一定影響。

4.3 物料摩爾比的影響

N/P比指的是陽離子聚合物中的氨基氮（N）原子和核酸中的磷酸中磷（P）原子的摩爾比。

Koh團隊研究發現，較高的N/P比通常能製備出較小粒徑的奈米顆粒和較小的PDI值。

Protopapa團隊透過圖4的實驗裝置，同時對7種不同的N/P比進行測試，在最短的時間內找到了最優實驗條件。

此外，聚合物的結構、性質，核酸的種類，兩者的濃度不同，都會對所得的奈米顆粒的粒徑大小，及分佈均勻性產生影響。

結論

- 研究表明，負載藥物的奈米顆粒的連續製備具有**混合均勻、易於控制粒徑分佈和形態、高效率**的優點；
- 目前，藥物負載的奈米顆粒的連續組裝已成為實驗室和工業中的成熟技術。研究者可以從各種裝置設備中根據自己的研究需求來進行選擇；
- 連續組裝相比於間歇釜中具有明顯的優勢，奈米顆粒的**生產可重現性高，批次間的差異較小**，這為擴大生產規模和實現臨床應用提供了保障；
- 面對醫藥產業的快速發展，對藥物、疫苗在體內安全傳遞、給藥的要求日益提高，奈米顆粒的連續製備必將成為加速奈米醫藥研究的重要實驗工具。

03 負載藥物的奈米顆粒的連續製備

負載核酸通常有兩種方法：

- 奈米顆粒是透過用核酸壓實陽離子聚合物以形成複合物來形成的；
- 或者通常在陽離子聚合物或陽離子界面活性劑的幫助下，透過將帶負電荷的負載包埋到中性的、通常是疏水性的聚合物中來形成的。

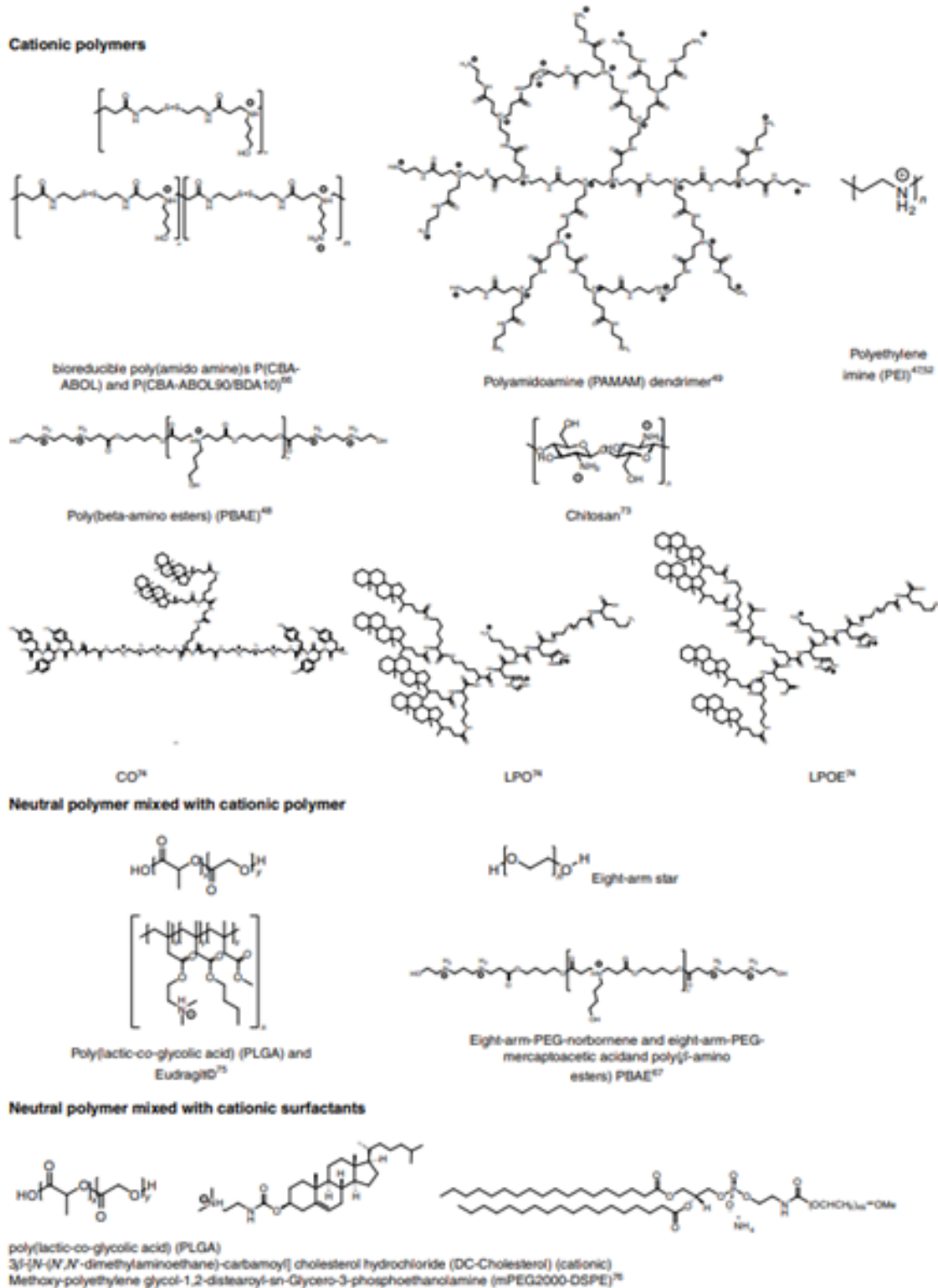


圖5. 使用流動組裝製備核酸負載奈米顆粒的聚合物

圖5所示的陽離子電荷取決於pH值(CO、LPO和LPOE是Loy等人給出的縮寫，分別作為核心低聚物、脂質錨定的PEG12低聚物和不含谷氨酸的脂質錨定PEG12寡聚物)。

表1. 使用流動裝置製備核酸負載奈米顆粒所用聚合物的概述

Polymer	Drug	Technique	Flow mixing		Bulk mixing		Remarks	References
			Size (nm)	PDI	Size (nm)	PDI		
Cationic polymers								
PBAE	DNA	Mixing of aqueous solutions in flow focusing devices with pinch channel					No difference between MF and BM and no size data shown	Wilson et al. (2017) ⁶⁷
P(CBA-ABOL)	pDNA	Water droplets in fluorocarbon oil emulsion-based microfluidic system	100	0.15	166	0.34		Grigsby et al. (2013) ⁶³
	mRNA		113.1	0.18	222	0.32		
PEI	pDNA	Mixing of aqueous solutions in cartridge with seven chaotic serial dilution generator and dividers for variation of N/P ratios	98	0.1	196	>0.4	N/P ratio 50	Protopapa et al. (2023) ⁶⁵
PEI	pDNA	Mixing of aqueous solutions in microfluidic hydrodynamic focusing device	494		898		N/P ratio 3.3, PDI not reported	Koh et al. (2009) ⁶⁶
PAMAM dendrimer	siRNA	Mixing of aqueous solution using funnel-shaped micromixer	86	0.18	87	>0.20	N/P ratio 20	Agnoletti et al. (2017) ⁶⁸
CO + siRNA + LPO	siRNA	Mixing of aqueous solution in a single or a double meander channel microfluidic chip	114.7	0.14	416.2	0.71		Loy et al. (2021) ⁷¹
CO + siRNA + LPOE			141.9	0.23	128.2	0.47		
Chitosan	pDNA	Mixing of aqueous solutions in in-line mixing system (AIMS) consisting of Y-mixer and pinch valves	199	0.68	165	0.25		Naeini et al. (2017) ⁷²
	siRNA		48	0.15	98	0.21		
Cationic polymer and neutral polymers								
Eight-arm-PEG-norbornene and eight-arm-PEG-mercaptopoctic acid and poly(β -amino esters) PBAE	pDNA	Water in oil T-junction droplet break-up microfluidic device	41×10^3 – 142×10^3				Size of microspheres dependent on channel size	Deveza et al. (2015) ⁶⁵
PLGA and Eudragit	pDNA	Microfluidic-assisted nanoprecipitation	170	0.25	98	0.21		Zoqlam et al. (2021) ⁷³
Cationic surfactant and neutral polymer								
PLGA DC-cholesterol (cationic) mPEG ₂₀₀₀ -DSPE (surfactant)	pDNA	Microfluidic-assisted nanoprecipitation in toroidal micromixer	83	0.11	136	0.23		Santhanes et al. (2022) ⁷⁴

MF, mixing by microfluidics; BM, bulk mixing.

表1中探索了三種不同的體系和方法：

兩種水溶液的混合，分別含有聚合物和核酸、奈米沉澱和基於液滴的微流體。


- Loy團隊報告了一種負載siRNA核酸的聚合物奈米顆粒要優於釜式結果。
- Santhanes團隊使用微通道奈米沉澱，成功製備了具有較小PDI的奈米顆粒。
- Naeini團隊開發了一種線上混合系統，在殼聚糖-siRNA和殼聚糖-pDNA體系中，透過高雷諾數下的湍流混合，最大限度的減小了粒徑和PDI，且能夠透過調控核酸的濃度，來調節奈米顆粒的尺寸，同時確保了PDI小於0.2。

04 連續製備過程中主要影響因素

在單通道均相混合系統中，核酸和陽離子聚合物透過靜電結合組裝，可以透過改變離子強度、pH值以及聚合物的性質來得到不同性質的奈米顆粒；而在多相的系統中，可以透過T形通道口尺寸的調節，實現對奈米顆粒粒徑的控制。

康寧微通道反應器實現集進料、混合、反應於一體，更有助於物料進行連續快速混合，有效控制反應溫度以及反應停留時間：

Corning® Advanced-Flow® Reactors 康宁高通量微通道反应器



康宁专利“心”形通道设计

高效的传热-传质（混合）以及化学反应的集成



獨特「三明治」多層結構設計集「混合/反應」和「熱交換」於一體，精準控制流體流動分佈，大大提升了單位物料的反應熱交換面積（1000倍）。

專利的「心型」通道結構設計，高度強化非均相混合系列，提高混合/質傳效率（100 倍）。

传热和传质指标	康宁微通道反应器	传统的夹套加热搅拌釜
单位体积换热面积, S/V (m^2/m^3)	2500	2.5-10
总换热系数, $U \times (S/V)$, (kW/m^2K)	1700	1-10
单位体积气液相介面积 (m^2/m^3)	3000-10000	100-2000
气液相传质系数(ka) (1/s)	1-30	0.03-0.4

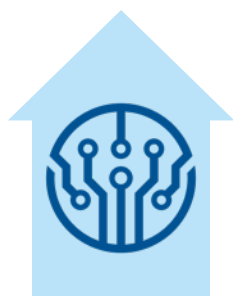
參考文獻：

Australian Journal of Chemistry

doi:10.1071/CH23116

Advanced-Flow® Reactors : Disrupting the Industry, Changing Lives

康寧反應器在具有天然的安全優勢，質傳與熱傳效率相較傳統反應器有百倍到千倍的提升，在許多製程上也有很好的應用案例，歡迎感興趣的客戶電話或郵件諮詢。



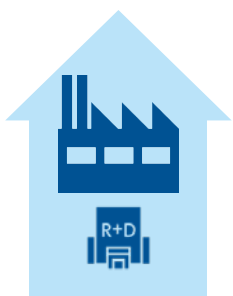
製程強化

- ✓ 質傳效率 ↑ 100X
- ✓ 熱傳效率 ↑ 1000X
- ✓ 達到反應極限而非設備限制



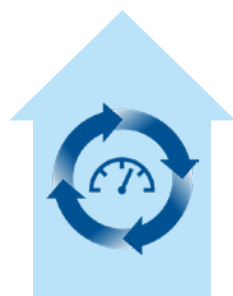
減少佔地

- ✓ 減少反應器佔地 1/1000
- ✓ 實現未來工廠的可能



無縫放大

- ✓ 減少50%時間於工業化放大製程的開發



連續生產

- ✓ 在中國與其他區域已經有整合完成年產萬噸之工廠連續生產中(>500天)



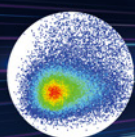
本質安全

- ✓ 各國制定的安全規範引領產業朝向使用更安全有效率的生產技術

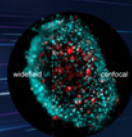


THE FUTURE LAB | FUTURE CMC

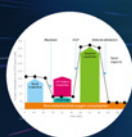
進階與您一同邁入新未來



Multi-color Flow



Confocal Live Image



Energy Metabolism



Bioreactor



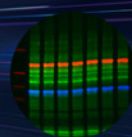
Organ Chip



Digital PCR



Multiplex Assay



IP Western



進階生物科技股份有限公司

台北總公司 02-26959935

免付費專線 0800251302

傳真 02-26958373

www.level.com.tw



進階官網



FB粉絲團