

## 灵活的纳米颗粒研发：用 Sunshine 进行多种纳米药物的工艺优化及规模化生产

### 简介

纳米药物是药物递送领域中最有前景的方向之一，能够克服传统制剂方法的局限，并广泛应用于新药和疗法的开发中。合成纳米材料如脂质体、脂质纳米颗粒 (LNPs) 和聚合物纳米颗粒，可以有效提升活性药物成分 (API) 的溶解性、稳定性和生物利用度，从而增强 API 的跨膜运输，并延长其体内循环时间，提高疗效和安全性。

由于活性药物成分 (API) 从小分子药物到核酸和蛋白质，具有广泛且复杂的理化性质，灵活的纳米颗粒生成工艺能够根据不同的 API 和所需特性形成不同类型的颗粒。Unchained Labs 的 Sunshine 提供了一种自动化的微流控方法，能够在毫升级别上开发和优化多种材料类型和颗粒结构的纳米颗粒合成方案，并具备连续生产多升规模颗粒的能力，适用于临床前测试。

在过去几十年里，脂质基纳米颗粒（包括脂质体、脂质复合物和脂质纳米颗粒）以及各种聚合物、金属和氧化物纳米颗粒，通常采用批量方法如薄膜水化、超声波处理和纳米沉淀等进行生产。然而，这些传统技术劳动密集且常涉及大批量生产。此外，这些方法在颗粒大小、形态和包封效率等方面的批次一致性较差，这些都是影响最终药物配方效果的重要因素。

相比之下，通过微流控技术在稳定且高度控制的层流下，以精确的混合几何方式结合反应物，可以实现对反应化学的高度控制，从而形成具有显著一致性的纳米颗粒。利用流体动力学聚焦方法，可以通过简单调整反应物的流速，精确且可重复地调节纳米颗粒的合成时间（因此也包括颗粒的大小和形态），从而优化纳米颗粒的性质。

近年来，脂质纳米颗粒 (LNPs) 等用于疫苗和先进疗法递送的纳米药物研究与开发迅速增长，微流控技术已广泛应用于其合成的核心流程（图 1）。然而，早期

的商用微流控技术通常需要用户投入大量操作时间，消耗较多试剂，并且耗材成本高昂。

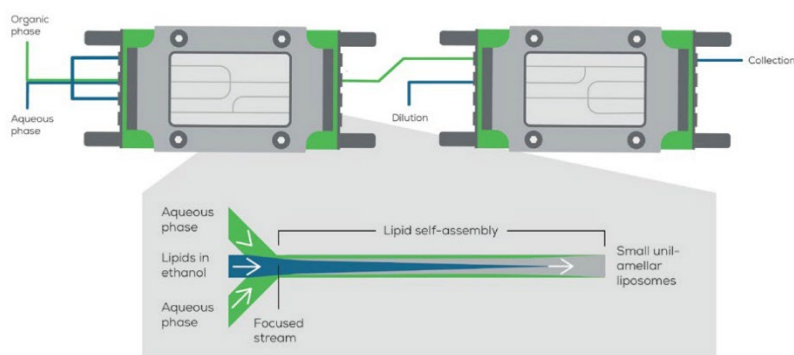


图 1: Sunny 设备用于合成纳米颗粒的示例设置，如脂质纳米颗粒 (LNPs)。在第一个 Sunny 中，乙醇中的脂质和水相缓冲液中的 mRNA 以层流方式混合，形成流体动力学聚焦的试剂流。试剂相互扩散，降低脂质的溶解度，从而驱动自组装过程。这种混合方式提供了高度控制的反应条件，生成的 LNPs 具有很高的的一致性和可调性。可选的第二个 Sunny 用于在线稀释，以调整 pH 值并降低收集样品中的溶剂浓度。

为了大幅加速纳米药物的开发，研究人员需要可靠、低成本且高效的纳米颗粒生产方法，能够灵活应用于多种材料。Unchained Labs 的创新微流控技术在 Sunshine 系统中用于生产均一且可重复的纳米颗粒 (图 2)。通过 Sunshine，用户可以精确控制流速比 (FRR)、总流速 (TFR)、前体体积、样品收集量以及可选的在线稀释，从而实现各种纳米颗粒的可控、可重复和单分散生成。Sunny 不仅降低了耗材成本，还兼容多种试剂和溶剂，提供了更加灵活的解决方案。



图 2: Sunshine

本解决方案展示了 Sunshine 如何灵活适用于多种材料类型，以生产用于纳米药物开发的纳米材料。使用 PLGA、两种不同的脂质体配方以及两种 mRNA-LNP 配方合成了多种纳米颗粒，所有生成的颗粒尺寸均在 20 nm 至 150 nm 范围内，且多分散指数 (PDI) 小于 0.2，包封效率超过 90%。该研究表明，精确控制和调整流速比 (FRR)、总流速 (TFR) 以及反应物稀释程度，对于全面表征和优化纳米颗粒合成至关重要，而 Sunshine 是实现这一目标的理想工具。

## 使用 Sunshine 合成 PLGA 纳米颗粒

聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 纳米颗粒因其良好的生物相容性和可生物降解性，广泛用于药物递送和控制释放领域。一个典型应用是将 PLGA 纳米颗粒用于眼科药物递送，如抗炎药物曲安奈德。将这些药物包封在 PLGA 中可延长释放时间，减少所需剂量和不适药物给药的频率，提高患者依从性。此外，PLGA 纳米颗粒具有特定的表面积和功能性，有助于包封药物克服眼部屏障的挑战 (Jiang et al)<sup>①</sup>。

精确控制纳米颗粒的尺寸至关重要，因为尺寸直接影响活性药物成分 (API) 递送的最终效果。传统的批量 PLGA 纳米颗粒合成方法由于无法精确控制反应条件，缺乏可重复性，通常会生成尺寸不一的颗粒，甚至导致颗粒聚集失控，进而对实验结果产生不利影响，阻碍药物研发进程。

Parameter	Description
Aqueous Phase (A)	Deionized (DI) water
Organic Phase (O)	0.5% (w/v) PLGA in acetone
Flow Rate Ratio (FRR)	Variable (A:O)
Total Flow Rate (TFR)	3 mL/min
Sunny	Sunny 275 XT

表 1：使用 Sunshine 合成 PLGA 纳米颗粒的参数

Sunshine 加速了 PLGA 纳米颗粒的开发。在此示例中，使用了 Sunshine 275 XT，通过流体动力学聚焦 (HFF) 混合试剂来合成纳米颗粒。通过调整流速比 (FRR) 从 1:1 到 8:1 (水相与有机相的比例)，并保持总流速 (TFR) 为 3 mL/min，

PLGA 纳米颗粒的尺寸被精确且可重复地控制在 83 nm 到 57 nm 之间 (图 3)。生成的纳米颗粒的多分散指数 (PDI) 平均低于 0.1, 显示出 PLGA 纳米颗粒的单分散性, 这对确保包封活性药物成分 (API) 的释放特性一致性至关重要。这些 PLGA 颗粒可以通过调整变量如总流速 (TFR)、Sunny 型号, 以及在水相中引入稳定剂进一步优化。

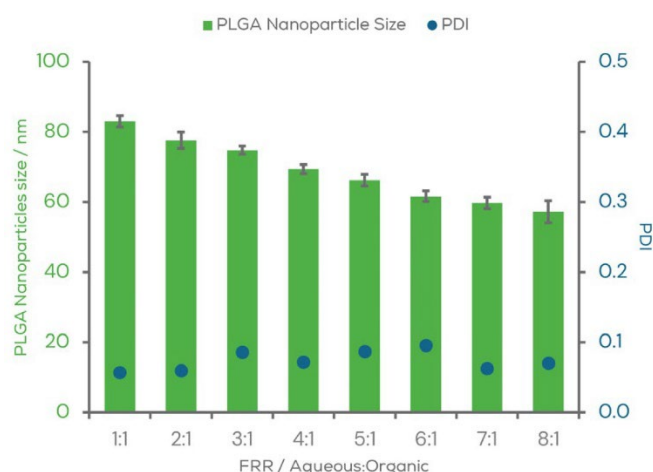


图 3: 在总流速为 3 mL/min 的条件下, 通过调节水相与有机相的流速比 (FRR) 生成的 PLGA 纳米颗粒。颗粒尺寸分布和多分散指数 (PDI) 由动态光散射 (DLS) 测定。

误差条表示平均值的标准偏差, n=3。

通过 Sunny Suite 软件, 用户可以优化流速比 (FRR)、总流速 (TFR)、加入体积、样品收集量, 并支持在线稀释, 实现可控、可重复且单分散的纳米颗粒合成。例如, 在协议模式下, 使用固定试剂组合进行的 10 次小体积实验, 可在不同的 FRR、TFR 和稀释比条件下进行测试, 15 分钟内即可自动完成。

### 使用 Sunshine 合成脂质体

脂质体是由一层或多层磷脂双分子层组成的脂质囊泡, 其膜结构与天然细胞膜高度相似。由于其配方简单、出色的生物相容性、高生物利用度, 以及在递送亲水性和疏水性活性药物成分 (API) 方面的灵活性, 脂质体作为药物递送系统受到了广泛关注。正因如此, 脂质体目前是最常见纳米药物类别。

Parameter	Description
Aqueous Phase (A)	1x PBS, pH 7.4
Organic Phase (O)	Phospholipon 90G (1 mg/mL), DDAB (0.1 mg/mL) in ethanol
Dilution	1x PBS pH 7.4
Flow Rate Ratio (FRR)	Variable (A:O:D)
Total Flow Rate (TFR)	3 mL/min
Sunny	Sunny 100 XT, with Sunny 190 XT for dilution

表 2：使用 Sunshine 合成磷脂酰胆碱基脂质体参数

在这个例子中，展示了使用磷脂酰胆碱 90G 和阳离子脂质二甲基二十八烷基溴化铵 (DDAB) 配方合成脂质体的结果。与 PLGA 纳米颗粒合成中需要使用丙酮作为溶剂不同，这种脂质体配方的脂质成分悬浮在乙醇中作为有机相输入，而磷酸盐缓冲液 (1x PBS, pH 7.4) 则用于水相和稀释输入。在评估新配方时，可以通过快速筛选流速比 (FRR) 来有效探索各种参数，找出颗粒形成的理想和非理想条件 (图 4)。

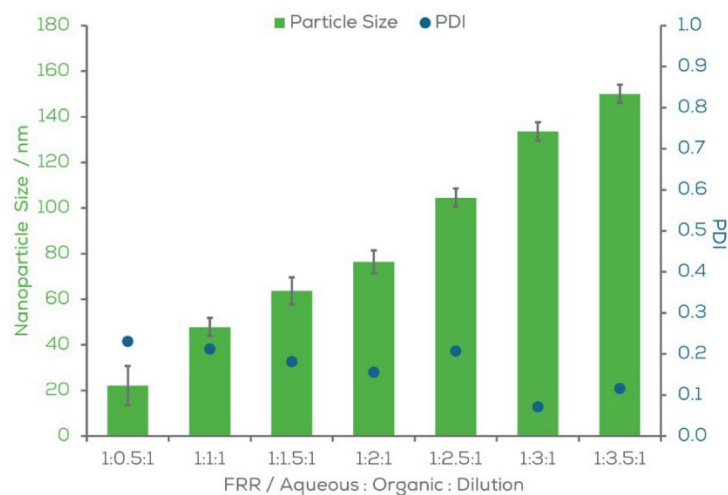


图 4：在总流速为 3 mL/min 的条件下，通过调整水相与有机相的流速比 (FRR) 合成的磷脂酰胆碱基脂质体。脂质体的尺寸范围从 20 nm 到 150 nm，颗粒尺寸分布和分散指数 (PDI) 通过动态光散射 (DLS) 测定。误差条表示标准偏差，n=3。

上述结果显示，脂质体的尺寸在 20 nm 到 150 nm 之间变化，这与流速比 (FRR) 密切相关。在实验中，水相、溶剂和稀释剂的比例从 1:0.5:1 调整到 1:3.5:1，水

相和稀释剂的成分保持不变,而有机相的成分增加。所有实验的总流速 (TFR) 保持在 3 mL/min。

在较低的有机相比例下, PDI (多分散指数) 较高, 不理想。比例为 1:3:1 虽然能得到最低的 PDI, 但颗粒尺寸较大。比例为 1:2:1 则提供了约 80 nm 的合适颗粒尺寸, 同时 PDI 稳定在 0.2 以下。在这一优化的流速比下, 可以进一步探索其他条件, 如总流速 (TFR) 和 Sunny 几何配置等, 以进一步优化 PDI 和其他性能指标。

下面展示了第二个脂质体合成的例子, 使用了 1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱 (DMPC)、胆固醇和 1,2-二月桂酰-外消旋甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000 (DSPE-PEG 2000), 它们的摩尔比为 2:1:0.05。本研究考察了总流速 (TFR)对脂质体尺寸的影响。使用 Sunshine 的协议模式进行实验, 将 TFR 从 2 mL/min 逐步提高至 5 mL/min, 同时保持流速比 (FRR) 为 3:1:1 (水相:有机相:稀释剂)。

Parameter	Description
Organic Phase (O)	DMPC: cholesterol: DMG-PEG 2000 (2:1:0.05 molar) in ethanol
Aqueous Phase (A)	PBS (Phosphate Buffered Saline) (1X, pH 7.4)
Dilution Phase (D)	PBS (Phosphate Buffered Saline) (1X, pH 7.4)
Flow Rate Ratio (FRR)	3:1:1 (A:O:D)
Total Flow Rate (TFR)	Variable
Sunny	Sunny 100 XT, with Sunny 190 XT for dilution

表 3: 使用 Sunshine 合成 DMPC:胆固醇 2000 脂质体的条件, 流速比 (FRR) 为 3:1:1 (A:O)。

图 5 数据显示, 总流速 (TFR) 的增加使脂质体的水动力学尺寸从 133 nm 降低至 109 nm, 减少了 18%。同时, TFR 的增加还改善了颗粒的多分散指数 (PDI), 进一步印证了在不同工艺条件下评估配方响应的重要性。

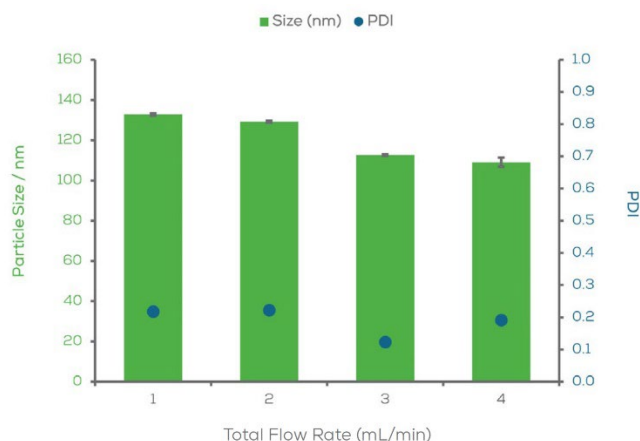


图 5: 使用 Sunshine 在不同总流速 (TFR) 下合成基于 DMPC、胆固醇和 DMG-PEG 2000 的脂质体, 流速比 (FRR) 固定为 3:1:1 (A:O)。颗粒尺寸分布和多分散指数 (PDI) 通过动态光散射 (DLS) 测定。误差条表示平均值的标准偏差, n=3。

## 使用 Sunshine 合成脂质纳米颗粒

近年来, 脂质纳米颗粒 (LNPs) 已成为脂质基纳米载体中最重要的类别。LNPs 最初源于成熟的脂质体技术, 通过添加阳离子或可离子化的阳离子脂质来包装带负电的寡核苷酸, 如 siRNA、mRNA、miRNA 和 DNA, 这些材料通过静电作用进行封装。随着研究的迅速发展, 学者们正致力于全面理解配方、组成、尺寸、表面化学及其他参数, 以实现从 CRISPR 疗法到 mRNA 疫苗等各种载荷的有效且靶向递送。

Parameter	Description
Aqueous Phase (A)	Luciferase mRNA (4basebio PLC) in acetate buffer, pH 4
Organic Phase (O)	SM-102: DSPC: cholesterol: DMG-PEG 2000 (50:10:38.5:1.5 molar ratio) in ethanol
Dilution (D)	No dilution
Flow Rate Ratio (FRR)	Variable (A:O)
Total Flow Rate (TFR)	5 mL/min
N/P	6
Sunny	Sunny 190 XT

表 4: 使用 Sunshine 合成 mRNA-LNP 的参数。

在这里, 制备了一种包含可离子化阳离子脂质 SM-102、DSPC、胆固醇和 DMG-PEG 2000 的配方, 摩尔比为 50:10:38.5:1.5。用 Luciferase mRNA (4basebio PLC) 进行封装, 其中阳离子脂质的电荷与 mRNA 磷酸负电荷的比率 (N/P 比)

为 6。使用 Sunshine 自动执行了一系列不同流速比 (FRR) 的小体积实验, 同时保持总流速 (TFR) 为 5 mL/min。

图 6 显示, 随着流速比 (FRR) 从 2:1 (水相:有机相) 增加到 6:1, mRNA-LNP 的尺寸减少了 14.7%, 从 68 nm 降至 58 nm。通过动态光散射 (DLS) 在透析后评估了颗粒尺寸和 PDI, 所有测试条件下 PDI 均保持在较低水平。

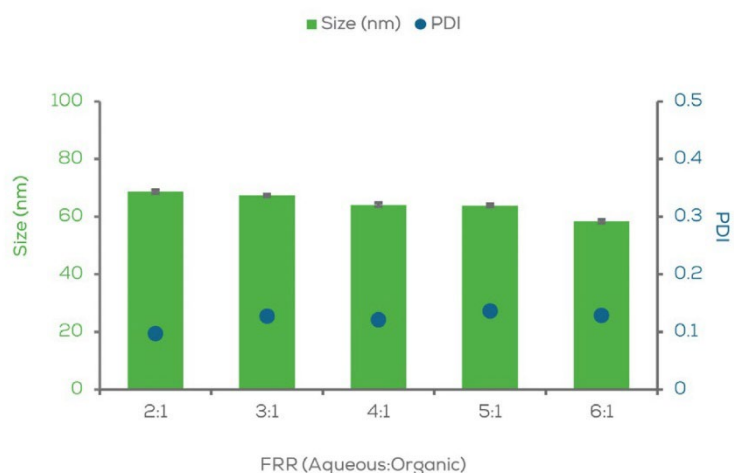


图 6: 通过不同流速比 (FRR, 水相:有机相) 在固定的 5 mL/min 总流速 (TFR) 且无稀释条件下生产的 mRNA-LNP。透析后 LNP 尺寸在 58 nm 至 68 nm 之间, 平均 PDI 为 0.12。颗粒尺寸分布和多分散性指数 (PDI) 通过动态光散射 (DLS) 测定。误差棒表示平均值的标准偏差, n=3。

使用 Quant-it™ RiboGreen RNA 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific), 以下简称“RiboGreen”, 对 mRNA 的包封效率 (EE%) 进行了评估。在总流速 (TFR) 保持 5 mL/min、N/P 比固定为 6 的条件下, 图 7 显示所有测试的流速比 (FRR) 下包封效率均超过 90%, 其中 FRR 为 6:1 (水相:有机相) 时包封效率最高, 达 96%。

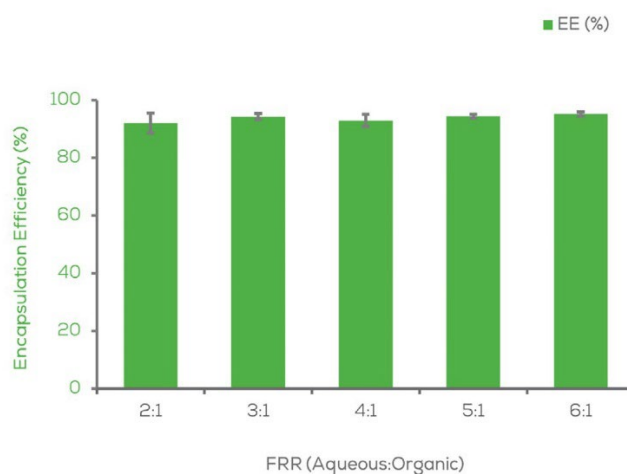


图 7: 通过 RiboGreen 分析法测定 LNP 中 mRNA 的包封效率 (EE%)。mRNA-LNP 是在固定总流速 (TFR) 为 5 mL/min、不同流速比 (FRR, 水相:有机相) 且无稀释条件下使用 Sunshine 生产的。N/P 比固定为 6。误差棒表示平均值的标准偏差, n=3。第二种基于阳离子脂质 DOTAP (1,2-二油酰-3-三甲基铵丙烷) 的 LNP 配方如表 5 所示进行了制备。在该实验中, 负载物为聚腺苷酸 (Poly (A), Merck, 货号: GE27-4110-01), 这是一种由核苷酸腺嘌呤组成的单链 RNA 同聚物, 平均链长超过 200 个核苷酸。Poly (A) 已被证明是用于颗粒合成实验的 mRNA 合适模拟物 (数据可根据需求提供)。

Parameter	Description
Aqueous Phase (A)	Poly(A) in citrate, pH 6
Organic Phase (O)	DOTAP: DSPC: cholesterol: DMG-PEG 2000 (40:10:47.5:2.5 molar) in ethanol
Dilution (D)	1x PBS, pH 7.4
Flow Rate Ratio (FRR)	3:1 (A:O)
Total Flow Rate (TFR)	Variable
N/P	8
Sunny	Sunny 490 Trident T

表 5: 基于 DOTAP 的 Poly (A)-LNP 合成参数使用 Sunshine 系统。

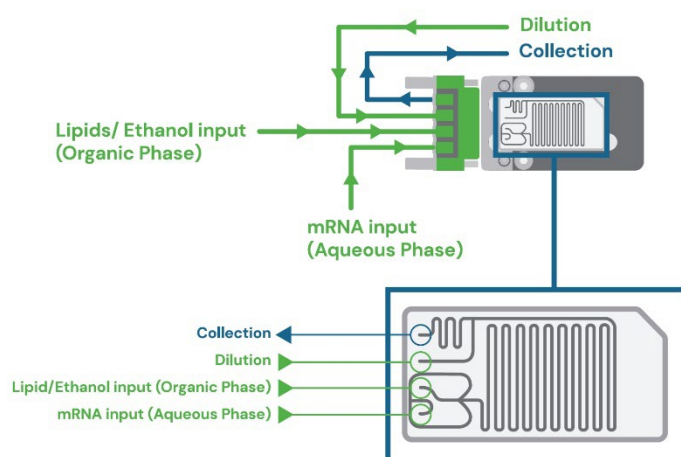


图 8: Sunny 490 Trident T-DOTAP 脂质在有机溶剂中与 Poly (A) 在水性缓冲液中的入口, 通过水动力聚焦和后续混合组装 Poly (A)-LNPs, 并可选择进行在线稀释。线性连接器固定在 Sunny 的顶面, 使 mRNA 输入在芯片上分成两股流体, 并在三叉接头处与脂质/乙醇输入重新组合。

Poly (A) 被加载到基于 DOTAP 的 LNPs 中, 这些 LNPs 使用 Sunshine 和 Sunny 490 Trident T 组合制备。在一系列实验中, 保持 FRR 为 3:1 (水相:有机相), 同时将 TFR 从 5 mL/min 调整到 12 mL/min, 以探究 TFR 对纳米颗粒尺寸和分散性的影响。如图 9 所示, 加载了 Poly (A) 的 DOTAP 基 LNPs 可以一致且可重复地合成, 粒径范围为 66 nm 至 128 nm, PDI 约为 0.13。每个 TFR 条件下均进行了三次重复实验。所有生产的 LNPs 均显示出高度一致的尺寸, PDI 低于 0.2, 相对标准偏差 (RSD) 小于 4%, 表明实验具有良好的重复性。

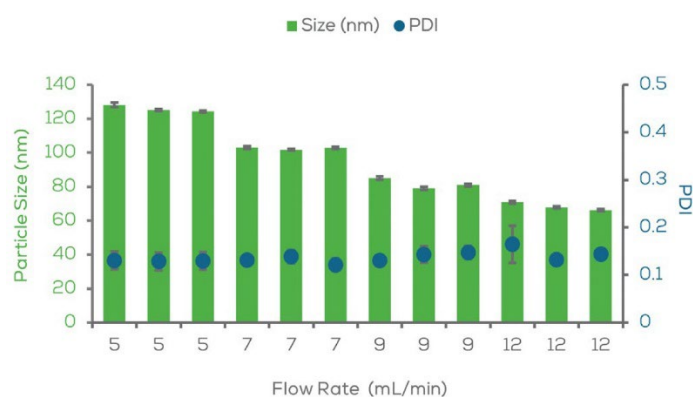


图 9: 在固定 FRR (3:1) (水相:有机相) 条件下, 不同 TFR 下生产的基于 DOTAP 的 Poly (A)-LNPs。LNP 的粒径范围从 66 nm 到 128 nm, 且多分散指数 (PDI) 值约为 0.13。颗粒大小分布和 PDI 通过动态光散射 (DLS) 测定。误差线表示平均值的标准偏差,  $n=3$ 。

## 结 论

由于不同材料在纳米颗粒合成中的独特配方属性, 确定一种通用的优化过程具有挑战性。这导致了对能够快速合成并有效筛选过程参数的全能系统的高度需求, 以优化来自各种纳米材料的纳米颗粒生产。此外, 传统的大规模合成方法通常生产的纳米颗粒不均匀或不可预测。实际上, 药物有效递送需要对生产的颗粒进行极其精确和可重复的控制, 因此批量方法生产的颗粒对制药行业来说吸引力有限。与传统的批量合成方法不同, 微流控技术提供了通过调整流量比 (FRR)、总流量 (TFR) 和/或芯片几何形状来操控颗粒尺寸的能力。例如, 对于大多数配方来说, 增加水相与有机相的流量比通常会导致纳米颗粒尺寸的减少。

在上述纳米颗粒合成过程中，可以观察到调整 FRR 以增加有机组分通常会导致颗粒尺寸的增加。这是由于单位体积内脂质/聚合物浓度的提高和更长的扩散/混合时间所驱动，从而形成了较大的颗粒。

同样，TFR 在确定颗粒尺寸方面也起着关键作用，因为增加 TFR（从而增加流体速度和雷诺数）会缩短混合时间，从而减少最终纳米颗粒的尺寸。

Sunshine 提供了一个独特的平台，通过结合精确的微流控技术和自动化功能，快速筛选并确定特定配方和纳米颗粒类型的最佳工艺条件。与其他合成方法相比，微流控技术生成的纳米颗粒通常具有更窄的尺寸分布，并且可以轻松地调节颗粒尺寸。

Sunshine 可以快速优化各种纳米颗粒的合成，包括 PLGA 纳米颗粒、脂质体以及可离子化或阳离子 LNPs。通过让用户定义并自动执行一系列实验（每次实验具有不同的 TFR 和 FRR），可以确定最佳的纳米颗粒合成条件。一旦确定了这些条件，Sunshine 就可以在连续模式下生产高达数十升的纳米颗粒每天。

## 材料和方法

为了生产 PLGA 纳米颗粒，将聚乳酸-羟基乙酸 (Sigma Aldrich, UK) 溶解在乙酮 (Sigma Aldrich, UK) 中，浓度为 0.5% (w/v)。去离子水用于水相。所有配制的溶液都经过了 0.2  $\mu\text{m}$  过滤器过滤。所有实验均使用 Sunny 275 XT 进行。

为了生产基于磷脂酰胆碱和 DDAB 的脂质体，将磷脂酰胆碱 90G (Lipoid, Switzerland) 和 DDAB (Fisher Scientific, UK) 分别溶解在乙醇（试剂级 99%，Sigma Aldrich, UK）中，浓度为 1 mg/mL 和 0.1 mg/mL。水相和稀释相使用 pH 7.4 的 1x PBS。所有配制的溶液在使用前都经过了 0.2  $\mu\text{m}$  过滤器过滤。颗粒在 Sunny 100 XT 上形成，并且在串联中使用了第二台 Sunny 190 XT 以进行在线稀释剂的添加。

第二种脂质体配方使用了 DMPC (Avanti, USA)、胆固醇 (Sigma Aldrich, UK) 和 DMG PEG 2000 (Avanti, USA)，它们分别以 2:1:0.05 的摩尔比溶解在无

水乙醇 (Sigma Aldrich, UK) 中。水相和稀释缓冲液使用 pH 7.4 的 1x PBS。对于这些脂质体的合成和在线稀释, 使用了 Sunny 190 XT。

基于 SM-102 的 mRNA-LNPs 的合成中, 使用了 DSPC (Avanti, USA)、DMG PEG-2000 (Avanti, USA) 和胆固醇 (Sigma Aldrich, UK), 它们以最终浓度 10 mg/mL 溶解在乙醇中。SM-102 (BroadPharm, San Diego, US) 以 100 mg/mL 的浓度溶解在乙醇中, 与初始的脂质溶液混合, 得到一个总体浓度为 10 mM 的混合物, 其中 SM-102、DSPC、胆固醇和 DMG PEG-2000 的相对摩尔比为 50:10:38.5:1.5。对于水相, 89.44  $\mu\text{g/mL}$  的 mRNA (荧光素酶) 溶解在 50 mM 的醋酸缓冲液中, pH 为 4 (无核酸酶)。使用 Sunny 100 XT 进行 LNP 合成。

DOTAP 基础的 LNPs 的生产使用了 DOTAP (Avanti, USA)、DSPC (Avanti, USA)、DMG PEG-2000 (Avanti, USA) 和胆固醇 (Sigma Aldrich, USA)。这些脂质组分溶解在乙醇中, 制成 10 mM 的溶液, DOTAP、DSPC、胆固醇和 DMG PEG-2000 的摩尔比为 40:10:47.5:2.5。对于水相, 64  $\mu\text{g/mL}$  的 Poly (A) 溶解在 50 mM 的柠檬酸缓冲液中, pH 为 6.0 (无核酸酶)。使用 Sunny 490 Trident T 进行 LNP 合成。

所有准备的纳米粒子都通过 Sunshine 进行微流控混合和自动化处理, 进行不同总体流速和流速比的实验批次。

粒径分布和多分散指数 (PDI) 通过动态光散射 (DLS) 测定。所有样品均以三次重复进行分析, 报告了均值和标准偏差 (SD)。

所形成的纳米颗粒使用透析套件 (Pur-A-lyzer™ Midi Dialysis Kit, Sigma, UK) 进行透析, 置于含有 1 升 PBS 1x (pH 7.4) 的烧杯中。透析过程持续 3 小时, 以去除乙醇并更换缓冲介质。透析后的纳米颗粒溶液存放于冰箱中, 供进一步研究使用。

mRNA-LNP 的封装效率 (EE%) 通过 RiboGreen 测定法量化。使用 Triton X-100 破坏 LNP 以确定样品中的总 mRNA 浓度, 并将此值与在不使用 Triton 时

测定的游离 mRNA 浓度进行比较。RiboGreen 的荧光强度在 Microplate 读数仪 (FLUORostar, BMG, Germany) 上进行测量。



**Unchained Labs**  
4747 Willow Rd.  
Pleasanton, CA 94588  
Phone: 1.925.587.9800  
Toll-free: 1.800.815.6384  
Email: [info@unchainedlabs.com](mailto:info@unchainedlabs.com)

© 2023 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo, Sunscreen and Sunshine are trademarks and/or registered trademarks of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A