



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112691625 A

(43) 申请公布日 2021.04.23

(21) 申请号 202011412157.7

(22) 申请日 2020.12.02

(71) 申请人 中国科学院大连化学物理研究所  
地址 116000 辽宁省大连市沙河口区中山  
路457号

(72) 发明人 陈光文 刘志凯 董正亚 杨梅  
尧超群

(74) 专利代理机构 大连东方专利代理有限责任  
公司 21212

代理人 房艳萍 李馨

(51) Int. Cl.

B01J 19/00 (2006.01)

B01J 19/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种纳米药物的超声微反应器制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种纳米药物的超声微反应器制备方法,该方法采用超声混合渗滤置换溶剂体系、浓缩与无菌过滤的制备方法,具体包括:输送两种溶液进入超声微反应器实现超声快速混合,将得到的粗产品通过泵送入切向过滤系统,同时通过泵不断向切向流过滤系统补充新鲜的缓冲溶液以实现溶剂的置换,除去多余的有机溶剂。停止向切向流系统补充新鲜的缓冲溶液,粗产品在切向流系统内循环实现产品的浓缩。最终经过无菌过滤得到产品。利用本发明实现了反应流体的超快速混合,得到产品平均粒径更小,单分散性更好,PDI低至0.044,防止产品堵塞通道,实现产品的连续化长时间生产。

1. 一种纳米药物的超声微反应器制备方法,其特征在于,所述方法步骤如下:

(1) 超声混合:将有机相溶液与水相溶液通入超声微反应器进行混合,得到粗产品A;

当所述有机相溶液为溶解有纳米药物前驱体的有机相溶液时,所述水相溶液为溶解有药物活性成分的水相溶液;

当所述有机相溶液为溶解有纳米药物前驱体和药物活性成分的有机相溶液时,所述水相溶液为水或缓冲溶液;

所述有机相溶液中的溶剂为有机溶剂,所述溶解有药物活性成分的水相溶液中的溶剂为水或缓冲溶液;

(2) 渗滤:向步骤(1)得到的粗产品A中通入缓冲溶液并进行渗滤,对粗产品A进行溶剂体系交换,得到粗产品B;

(3) 浓缩:对步骤(2)得到的粗产品B进行浓缩,得到目标浓度的溶液C产品;

(4) 无菌过滤:将步骤(4)得到的溶液C产品经过孔径为 $0.2\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m}$ 的滤膜进行过滤,除去产品中的细菌微生物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)所用的超声微反应器以换能器为超声源;通过胶粘、焊接、机械结构固定中的一种或多种方式将超声导入截面为圆形、椭圆或矩形的微型管道内。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述微型管道的水力学直径为 $0.1\text{mm}\sim 50\text{mm}$ ;超声频率为 $18\text{kHz}\sim 40\text{kHz}$ ;功率为 $30\text{W}\sim 500\text{W}$ 。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)和步骤(2)之间还包括稀释:向步骤(1)得到的粗产品中通入缓冲溶液进行稀释,得到稳定的粗产品。

5. 根据权利要求1或4所述的方法,其特征在于,步骤(3)渗滤、及步骤(3)浓缩通过切向过滤系统、正压过滤系统、超滤离心管中任意一种方式实现;步骤(4)无菌过滤通过正压过滤系统、切向过滤系统、针式过滤器中任意一种方式实现;稀释通过超声微反应器、微混合器、T型三通或搅拌釜实现。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)中水相溶液与有机相溶液的体积比为 $1:0.05\sim 50$ ;有机相溶液中有有机溶剂为无水乙醇、甲醇、异丙醇、丙酮、二甲基甲酰胺中的一种或多种。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)纳米药物前驱体为阳离子脂质、结构脂质、修饰有聚乙二醇脂质、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、嵌段共聚物中的一种或多种;药物活性成分为siRNA、mRNA、CRISPR-Cas9、阿霉素、姜黄素中的一种或多种。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)中水相溶液与有机相溶液的总流量为 $0.1\sim 10000\text{ml}/\text{min}$ ;纳米药物前驱体及药物活性成分的浓度为 $0.01\sim 100\text{mg}/\text{ml}$ ;水相溶液与有机相溶液在超声微反应器内停留时间为 $0.1\text{s}\sim 60\text{s}$ 。

9. 根据权利要求1或4所述的方法,其特征在于,当所述方法不包括稀释步骤时,步骤(2)中加入的缓冲溶液与步骤(1)得到的粗产品A的体积比为 $1\sim 50:1$ ;

当所述方法包括稀释步骤,稀释步骤中加入的缓冲溶液与步骤(1)得到粗产品的体积比为 $0.5\sim 50:1$ ;步骤(2)中加入缓冲溶液与稀释得到的稳定的粗产品A的体积比为 $1\sim 50:1$ 。

10. 根据权利要求1或4所述的方法,其特征在于,缓冲溶液为磷酸盐缓冲溶液、柠檬酸盐缓冲溶液中至少一种,pH为 $2.0\sim 12.0$ 。

## 一种纳米药物的超声微反应器制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及纳米药物合成领域,具体涉及载有药物活性成分的脂质纳米颗粒、脂质体、聚合物纳米颗粒制备的方法。

### 背景技术

[0002] 纳米药物是指以纳米材料为递送载体,载有核酸、小分子等药物活性成分的一类新型药物,具有高吸收利用率、靶向递送等特点,是肿瘤治疗及基因治疗的重要工具,被认为是下一代新型药物。

[0003] 纳米药物常用的制备方法有纳米沉淀法及乳化-溶剂蒸发法,其中纳米沉淀法因其工艺过程简单,产品质量高,得到广泛使用。美国专利(US9005654)详细公开了该方法:纳米沉淀法将药物活性成分(核酸及小分子化合物)与前驱体(脂类分子及嵌段共聚物等)溶解于互溶的溶剂体系内(例如:无水乙醇与水的溶剂体系),将两种溶液进行快速混合,在过饱和度的驱动下,药物活性成分与前驱体自组装形成纳米药物颗粒,粗产品经过一系列后处理去除多余的溶剂最终获得产品。

[0004] 由于前驱体分子自组装时间在20-60ms量级(Physical Review Letters,2003,91(11):118302.),有机相和水相的混合必须足够快,使混合时间小于成核时间,这样才能保证生成的纳米颗粒尺寸小且均一。从该专利公开的数据可知:最终得到的产品粒径较大,平均粒径均大于80nm,同时单分散性较差,PDI大部分情况下大于0.1。其使用的混合器为T型三通混合器,无法达到20-60ms量级的快速混合;该混合方式操作弹性差,只有高流速条件下混合效果较好;所使用的T型混合器通道尺寸小,产物浓度较高时进行连续化生产时会出现堵塞的现象。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于,克服上述现有技术混合效率不高,产品平均粒径偏大、单分散性较差,系统易堵塞,操作弹性差,难以实现连续化放大生产的技术问题。提出了一种纳米药物的超声微反应器制备方法。本发明采用超声混合、在线稀释、渗滤置换溶剂体系、浓缩与无菌过滤的制备方法,特别是采用超声微反应器实现了流体的超快速混合,防止产品堵塞通道,实现产品的连续化高通量生产。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:一种纳米药物的超声微反应器制备方法,所述纳米药物为载有药物活性成分的脂质纳米颗粒、脂质体、聚合物纳米颗粒,所述方法步骤如下:

[0007] (1) 超声混合:将有机相溶液与水相溶液通入超声微反应器进行混合,得到粗产品A;

[0008] 当所述有机相溶液为溶解有纳米药物前驱体的有机相溶液时,所述水相溶液为溶解有药物活性成分的水相溶液;

[0009] 当所述有机相溶液为溶解有纳米药物前驱体和药物活性成分的有机相溶液时,所

述水相溶液为水或缓冲溶液；

[0010] 所述有机相溶液中的溶剂为有机溶剂，所述溶解有药物活性成分的水相溶液中的溶剂为水或缓冲溶液；

[0011] (2) 渗滤：向步骤(1)得到的粗产品A中通入缓冲溶液并进行渗滤，对粗产品A进行溶剂体系交换，得到粗产品B；

[0012] (3) 浓缩：对步骤(2)得到的粗产品B进行浓缩，得到目标浓度的溶液C产品；

[0013] (4) 无菌过滤：将步骤(3)得到的溶液C产品经过孔径为 $0.2\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m}$ 的滤膜进行过滤，除去产品中的细菌微生物。

[0014] 基于以上技术方案，优选的，步骤(1)所用的超声微反应器以换能器为超声源；通过胶粘、焊接、机械结构固定中的一种或多种方式将超声导入截面为圆形、椭圆、矩形的微型管道内。微型管道水力学直径 $0.1\text{mm}\sim 50\text{mm}$ ，优选 $0.1\sim 8\text{mm}$ ；超声频率在 $15\sim 2000\text{kHz}$ ，优选 $15\sim 500\text{kHz}$ ；功率在 $5\sim 20000\text{W}$ ，优选 $1000\text{W}$ 。

[0015] 基于以上技术方案，优选的，在步骤(1)和步骤(2)之间还包括稀释：向步骤(1)得到的粗产品中通入缓冲溶液进行稀释，得到稳定的粗产品。稀释通过超声微反应器、微混合器、T型三通或及搅拌釜实现，优选微混合器、T型三通。稀释之后再行步骤(2)-(4)的处理。

[0016] 基于以上技术方案，优选的，步骤(3)渗滤、步骤(3)浓缩通过切向流过滤系统、正压过滤系统、超滤离心管中任意一种方式实现；步骤(4)无菌过滤通过正压过滤系统、切向流过滤系统、针式过滤器中任意一种方式实现。

[0017] 基于以上技术方案，优选的，步骤(1)中水相溶液与有机相溶液的体积比为 $1:(0.05\sim 50)$ ，优选 $1:(0.1\sim 10)$ ；有机相溶液中有有机溶剂为无水乙醇、甲醇、异丙醇、丙酮、二甲基甲酰胺中的一种或多种。纳米药物前驱体为阳离子脂质(包括可质子化阳离子脂质)、结构脂质、修饰有聚乙二醇脂质、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、嵌段共聚物(包括聚乳酸-羟基乙酸-聚乙二醇嵌段共聚物)中的一种或多种；药物活性成分为siRNA、mRNA、CRISPR-Cas9、阿霉素、姜黄素中的一种或多种。水相溶液与有机相溶液的流量比为 $1:(0.05\sim 50)$ ，优选 $1:(0.1\sim 10)$ ；水相溶液与有机相溶液的总流量为 $0.1\sim 10000\text{ml}/\text{min}$ ，优选 $1\sim 5000\text{ml}/\text{min}$ ；纳米药物前驱体及药物活性成分浓度为 $0.01\sim 100\text{mg}/\text{ml}$ ；水相溶液与有机相溶液在超声微反应器内停留时间为 $0.1\text{s}\sim 60\text{s}$ 。

[0018] 基于以上技术方案，优选的，当所述方法不包括稀释步骤时，步骤(2)中加入的缓冲溶液与步骤(1)得到的粗产品A的体积比为 $1\sim 50:1$ ；当所述方法包括稀释步骤，稀释步骤加入缓冲溶液与步骤(1)得到粗产品A的体积比为 $(0.5\sim 50):1$ ；步骤(2)中加入缓冲溶液与稀释步骤得到的稳定的粗产品A的体积比为 $(1\sim 50):1$ 。缓冲溶液为磷酸盐缓冲溶液、柠檬酸盐缓冲溶液中至少一种， $\text{pH}=2.0\sim 12.0$ ，优选 $\text{pH}=3.0\sim 9.0$ ；步骤(3)浓缩后产品(纳米药物)浓度为 $0.5\sim 10\text{mg}/\text{ml}$ ；将步骤(4)得到的溶液C经过孔径为 $0.2\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m}$ 的滤膜进行过滤，除去产品中的细菌微生物。

[0019] 超声微反应器是一类新型的具有较强混合特性的连续流反应设备。将超声与微反应器进行耦合，在超声作用下，微反应器内的空化气泡在通道内剧烈振动、穿梭，像一个搅拌子一样产生扰动和涡流，从而实现流体快速混合。超声微反应器内混合时间可以达到 $10\sim 20\text{ms}$ 。将这一技术原理应用于纳米药物的制备过程，可以大幅提高该过程的混合效率；得到

平均粒径更小,单分散性更好的产品;防止系统堵塞,实现连续化生产;提高反应物浓度,增大通量;减少反应时间,提高反应转化率。

[0020] 有益效果

[0021] 本发明创新性提出利用超声微反应器实现多相流体的超快速混合,开发了纳米药物超声混合、在线稀释、渗滤置换溶剂体系、浓缩与无菌过滤的新工艺,与现有技术中利用T型三通混合器相比,利用本发明实现了反应流体的超快速混合,产品平均粒径更小,单分散性更好,PDI低至0.044,防止产品堵塞通道,实现产品的连续化长时间生产。

## 附图说明

[0022] 图1、本发明纳米药物制备工艺流程简图;

[0023] 图2、实施例1-6纳米药物制备工艺流程简图;

[0024] 图3、实施例1动态光散射粒径分布;

[0025] 图4、实施例1与对比例1的动态光散射粒径分布对比;

[0026] 图中,1-水相溶液,2-有机相溶液,3-缓冲溶液,4-超声微反应器,5-T型三通混合器,6-搅拌釜,7-切向流过滤系统,8-滤出废液。

## 具体实施方式

[0027] 图1为本发明纳米药物制备工艺流程简图,具体流程如下:首先,称取一定量的纳米药物前驱体溶解于有机溶剂中形成有机相溶液,称取一定量的药物活性组分溶解于水或缓冲溶液中形成水相溶液;或者称取一定量的纳米药物前驱体和药物活性组分溶解于有机溶剂中形成有机相溶液,水相溶液为水或缓冲溶液。利用泵分别输送两种溶液(有机相溶液和水相溶液)进入超声微反应器实现超声快速混合。混合后的反应物进入超混合器与缓冲溶液进行混合稀释,降低反应体系中有机溶剂的含量至10%以下。稀释后的粗产品通过泵送入切向过滤系统,同时通过泵不断向切向流过滤系统补充新鲜的缓冲溶液以实现溶剂的置换,除去多余的有机溶剂。停止向切向流系统补充新鲜的缓冲溶液,粗产品在切向流系统内循环实现产品的浓缩。最终经过0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜进行无菌过滤得到产品。

[0028] 图2为实施例1-6的纳米药物超声微反应制备工艺流程简图,即采用郎之万式换能器为超声源的超声微反应器4实现超声混合,通道选用内径1mm、外径6mm、长50mm的截面为圆形的石英玻璃管,采用T型三通混合器5实现在线稀释,采用切向流过滤系统实现渗滤、产品浓缩。具体的方法是:称取一定量的纳米药物前驱体溶解于有机溶剂中,得到溶有纳米药物前驱体的有机相溶液2,或者称取一定量的纳米药物前驱体和药物活性组分溶解于有机溶剂中,得到溶有纳米药物前驱体和药物活性成分的有机相溶液2;称取一定量的药物活性组分溶解于缓冲溶液中,得到溶有药物活性组分的水相溶液1,或者水相溶液1为缓冲溶液。利用注射器吸取两组溶液(水相溶液1和有机相溶液2),溶液分别经注射泵连续地通入超声微反应器4内,超声微反应器在一定的功率下工作,使两相流体快速混合。混合后的反应物进入T型三通混合器5与缓冲溶液3进行混合稀释,降低反应体系中有机溶剂的含量至10%以下,稀释后的产品进入搅拌釜6内搅拌。搅拌釜6内的粗产品通过蠕动泵送入切向过滤系统7,同时通过蠕动泵不断向搅拌釜6内补充新鲜的缓冲溶液以实现溶剂的置换,除去多余的有机溶剂。最后停止向切向流系统7补充新鲜的缓冲溶液,粗产品在切向流系统7内循环

实现产品的浓缩。最终经过0.22 $\mu$ m滤膜进行无菌过滤,滤出废液8,得到纳米药物产品。

[0029] 实施例1-4,脂质纳米颗粒纳米药物(siRNA)制备

[0030] 实验过程遵循图2所示的工艺流程。其中纳米药物前驱体选用DOTAP((2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺,阳离子脂质)、DSPC(二硬脂酰基磷脂酰胆碱,结构脂质)、胆固醇、PEG2000-DMG(1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇2000,修饰有聚乙二醇脂质)体系作为脂类物质,其中各组分含量DOTAP: DSPC:胆固醇:PEG2000-DMG=50:10:38.5:1.5(摩尔比);其中DOTAP、DSPC、胆固醇为分析纯,购自AVT艾伟拓,PEG2000-DMG购自Avanti。将脂类物质溶解于无水乙醇中作为有机相溶液,水相溶液为双链siRNA(19nt)(购自通用生物)溶解于柠檬酸盐缓冲液(10mM,pH=4.0)内;siRNA与脂类物质摩尔比为1:8,有机相溶液与水相溶液的流量比为1:3,室温下在超声微反应器内的停留时间为1s。缓冲溶液选用磷酸盐缓冲溶液(20mM,pH=7.4),混合后的产品在线稀释过程稀释10倍,切向过滤过程用5倍于产品体积的缓冲溶液进行溶液置换,浓缩10倍,无菌过滤采用0.22 $\mu$ m PES聚醚砜滤膜进行过滤,得到纳米药物产品。实施例1-4原料的总流量、总浓度、超声微反应器频率及功率、以及产品纳米药物的平均粒径、单分散性PDI数据见表1。实施例1产品动态光散射粒径分布数据见图3。

[0031] 实施例5-6,聚合物纳米颗粒纳米药物制备

[0032] 实验过程遵循图2所示的工艺流程。其中纳米药物前驱体选用mPEG5K-PLGA10K(甲基聚乙二醇10k聚乳酸-羟基乙酸5k-嵌段共聚物,购自上海亚亦生物科技有限公司),药物活性成分选用姜黄素(购自上海麦克林生化科技有限公司),其中mPEG5K-PLGA10K与姜黄素溶解于二甲基甲酰胺中作为有机相溶液,姜黄素与mPEG5K-PLGA10K摩尔比为1:5,水相溶液为磷酸盐缓冲溶液(20mM,pH=7.4),有机相溶液与水相溶液的流量比为1:3,室温下在超声微反应器内的停留时间为0.5s。缓冲溶液选用磷酸盐缓冲溶液(20mM,pH=7.4),混合后的产品在线稀释过程稀释10倍,切向过滤过程用10倍于产品体积的缓冲溶液进行溶液置换,浓缩10倍,无菌过滤采用0.45 $\mu$ m PES聚醚砜滤膜进行过滤,得到纳米药物产品。实施例5-6原料的总流量、总浓度、超声微反应器频率及功率以及产品纳米药物的平均粒径、单分散性PDI数据见表1。

[0033] 实施例7-8,脂质纳米颗粒纳米药物(mRNA)制备

[0034] 实验过程遵循图2所示的工艺流程。其中纳米药物前驱体选用DOTAP((2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺,阳离子脂质)、DSPC(二硬脂酰基磷脂酰胆碱,结构脂质)、胆固醇、PEG2000-DMG(1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇2000,修饰有聚乙二醇脂质)体系作为脂类物质,其中各组分含量DOTAP: DSPC:胆固醇:PEG2000-DMG=50:10:38.5:1.5(摩尔比);其中DOTAP、DSPC、胆固醇为分析纯,购自AVT艾伟拓,PEG2000-DMG购自Avanti。将脂类物质溶解于无水乙醇中作为有机相溶液,水相溶液为ARCA EGFP mRNA(用ARCA修饰的增强型绿色荧光蛋白的mRNA)(购自蓝鹊生物)溶解于柠檬酸盐缓冲液(10mM,pH=4.0)内;mRNA与脂类物质摩尔比为1:20,有机相与水相的流量比为1:3,室温下在超声微反应器内的停留时间为0.8s。缓冲溶液选用磷酸盐缓冲溶液(20mM,pH=7.4),混合后的产品在线稀释过程稀释10倍,切向过滤过程用5倍于产品体积的缓冲溶液进行溶液置换,浓缩10倍,无菌过滤采用0.22 $\mu$ m PES聚醚砜滤膜进行过滤,得到纳米药物产品。实施例7-8原料的总流量、总浓度、超声微反应器频率及功率以及产品纳米药物的平均粒径、单分散性PDI数据见表1。

[0035] 实施例9,无稀释过程脂质纳米颗粒纳米药物(siRNA)制备

[0036] 实验过程遵循图1所示的工艺流程。其中纳米药物前驱体选用DOTAP((2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺,阳离子脂质)、DSPC(二硬脂酰基磷脂酰胆碱,结构脂质)、胆固醇、PEG2000-DMG(1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇2000,修饰有聚乙二醇脂质)体系作为脂类物质,其中各组分含量DOTAP: DSPC:胆固醇:PEG2000-DMG=50:10:38.5:1.5(摩尔比);其中DOTAP、DSPC、胆固醇为分析纯,购自AVT艾伟拓,PEG2000-DMG购自Avanti。将脂类物质溶解于无水乙醇中作为有机相溶液,水相溶液为双链siRNA(19nt)(购自通用生物)溶解于柠檬酸盐缓冲液(10mM,pH=4.0)内;siRNA与脂类物质摩尔比为1:8,有机相溶液与水相溶液的流量比为1:9,室温下在超声微反应器内的停留时间为1s。缓冲溶液选用磷酸盐缓冲溶液(20mM,pH=7.4),混合后不经稀释直接进入切向过滤系统,过程用5倍于产品体积的缓冲溶液进行溶液置换,浓缩10倍,无菌过滤采用0.22um PES聚醚砜滤膜进行过滤,得到纳米药物产品。实施例9原料的总流量、总浓度、超声微反应器频率及功率、以及产品纳米药物的平均粒径、单分散性PDI数据见表1。

[0037] 表1:实施例1-9工艺参数与产品结果表征

实施例	超声功率, W	频率, kHz	总流量, ml/min	总浓度, mg/ml	纳米药物表征	
					平均粒径, nm	PDI
1	30	21.5	16	0.5	79.39	0.044
2	30	21.5	4	0.5	77.49	0.135
3	30	40	2	0.5	71.89	0.160
[0038] 4	40	21.5	16	1	86.33	0.098
5	30	60	16	3	63.88	0.078
6	40	21.5	16	6	66.37	0.083
7	30	21.5	12	1	100.32	0.102
8	20	21.5	12	1	92.33	0.133
[0039] 9	40	21.5	16	0.1	98.21	0.143

[0040] 对比例1,无超声作用下脂质纳米颗粒纳米药物制备

[0041] 与实施例1相同条件下,不施加超声进行脂质纳米颗粒纳米药物制备,并对其结果

进行表征。其平均粒径为179.4nm,PDI为0.341,对比例1与实施例1的动态光散射粒径分布数据对比见图4。可以看出利用超声微反应器进行纳米药物的合成可以得到平均粒径小、分布窄的高品质纳米药物。



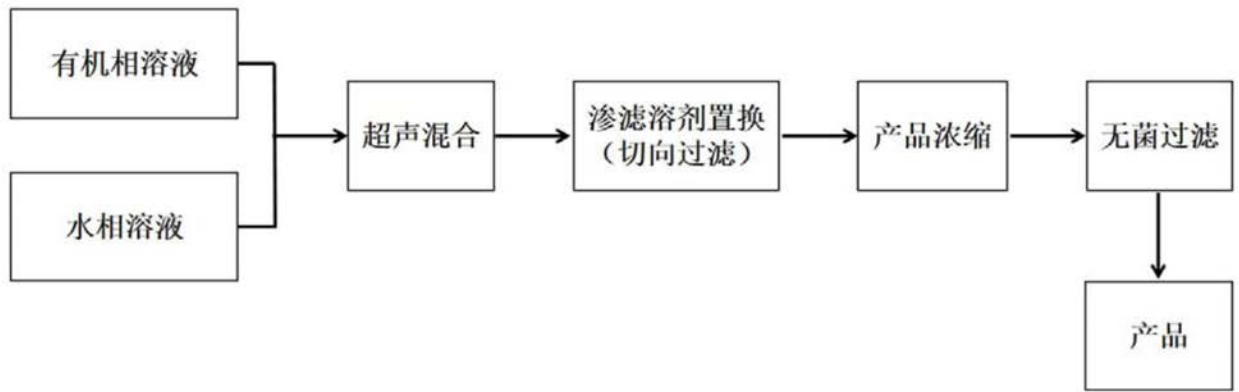


图1

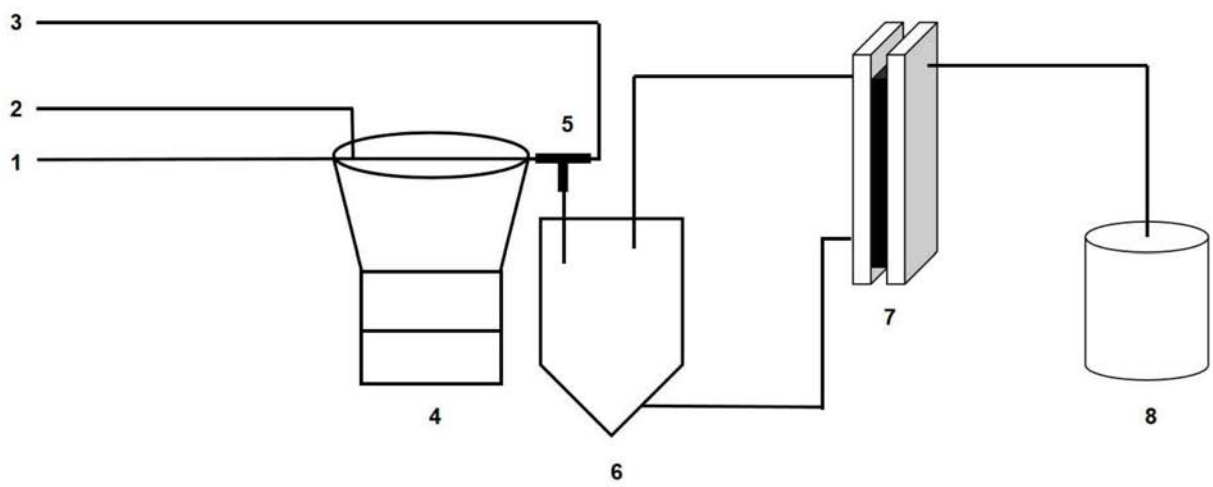


图2

	Size(d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 79.39	Peak 1: 84.44	100.0	21.87
Pdl: 0.044	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.942	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Good

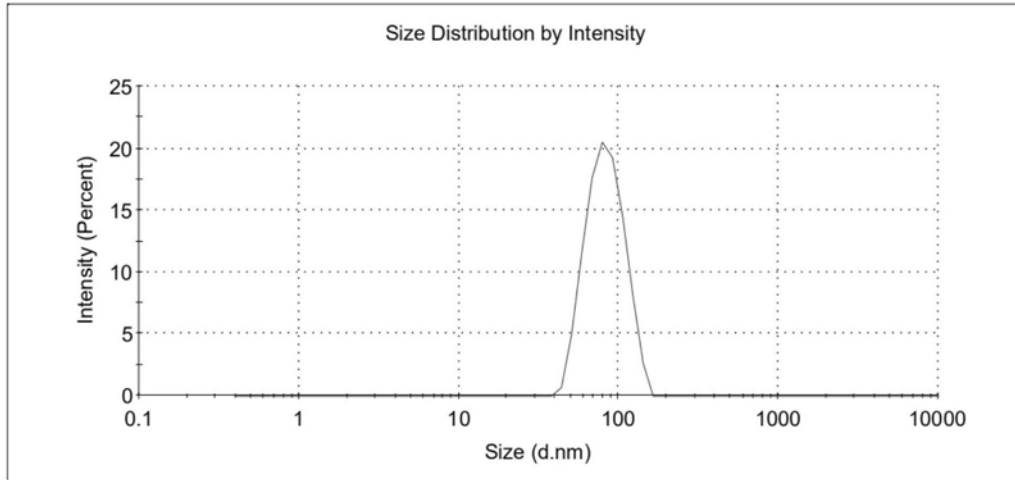


图3

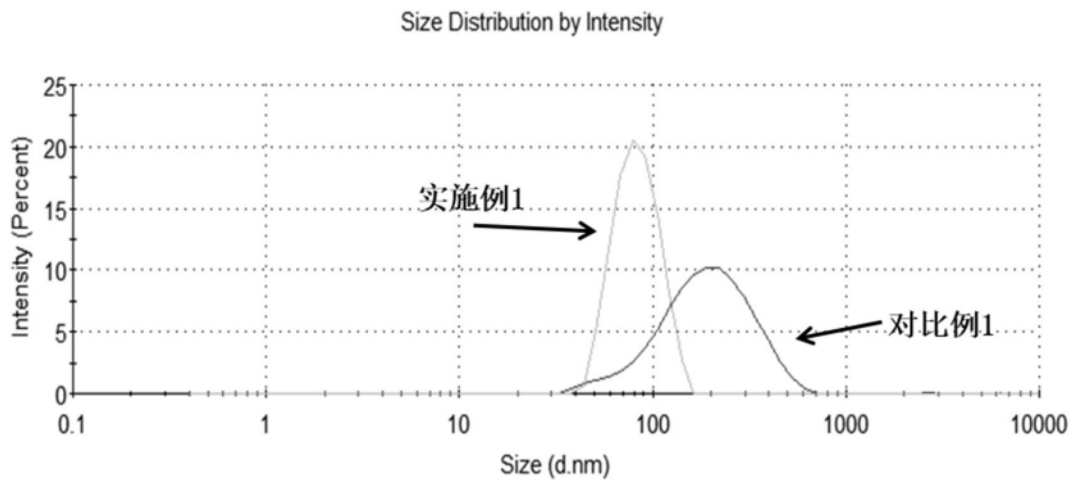


图4