

在 GxP 框架下， 如何将 NMR 应用于 药物研发和生产中

Kerry Hughes 博士, Almac (*);
Ian Clegg 博士, 布鲁克 BioSpin (**)

摘要

本文总结了 NMR 在监管环境下 (即, 药品非临床研究质量管理规范 GLP 和药品生产质量管理规范 GMP ——合称为 GxP) 的多个应用实例, 并阐述了该技术在化合物研究、开发以及商业生产的各个阶段所做出的突出贡献。

本文将详细论述一系列的经典小分子靶向药物以及生物靶向药物的实例。

这些药物分析中不仅使用了常见的一维 NMR 表征 (^1H 或 ^{13}C), 亦有如 ^1H - ^1H COSY、 ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC 等更为复杂的二维 NMR 实验。

总而言之, NMR 技术无疑已在质量管理规范——GxP 框架下得到了广泛应用, 对药物研发与生产来说至关重要。



* Almac 成立了一个 NMR 专项团队, 负责运营两台布鲁克 NMR 波谱仪, 既可满足外部客户的制药需求, 也可支持内部药物生产和研发流程。除了这些谱仪, Almac 还拥有一套专用于药物发现管线的布鲁克 NMR 系统。从新药研发到上市, NMR 分析涉及药物生命周期中的方方面面。下文将详细介绍 NMR 系统在药品生产质量管理规范 GMP 下使用的几项关键要求, 并探讨 NMR 将如何应用于药物发现、研发以及生产过程中的各个阶段。

** 布鲁克 BioSpin 成立了制药业务专项团队, 该团队在制药和生物制药领域中积极研发磁共振的多种不同应用。涵盖了早期的先导物发现和优化、药物化学支持、代谢物/杂质鉴定和表征、药物效价测定、相纯度等, 以及药物周期的最后阶段, 如非接触式小瓶和注射器灌注检查。专项团队的一大主旨是, 为布鲁克 BioSpin 进一步扩充那些可在合规环境下运行的产品组合。

引言

从研发阶段到商业生产，制药和生物制药行业采用的所有分析方法都需精心设计，合理验证，并由经过合格培训的工作人员按照相关标准作业程序 SOP 进行操作。

此外，所有方法都必须接受内部审计员和外部监管机构的多次评估和考核。外部监管机构包括美国食品药品监督管理局（FDA）和英国药品和医疗产品监管署（MHRA）等。监管机构在新产品备案过程中即会进行初始评估，并在生产运营中定期考核。

通常情况下，公开文献并不会报道 GxP 框架下使用的分析方法的细节。一部分是因为这些技术细节可能包含商业机密。但更多是因为，对于常用分析技术而言（例如基于分离科学的分析手段），某个特定方法的执行细节并不包含太多普遍适用的信息。换言之，这些细节并不能“传授”关于该分析技术的任何重要内容。

但是，当提起 NMR，除了少数技术专家外，似乎该技术在 GxP 规范下的使用鲜为人知 [文献 1]。这一认知着实出乎意料。因为在过去几十年中，NMR 技术早已广泛应用于 GLP 与 GMP 环境下。制药和生物制药行业中众多重要技术职能，包括药品发布，均是仰仗 NMR 的分析测定。本文将通过阐述该领域目前正在使用的多种方法，以纠正这一观念偏差。文中将细节展示多个行业实例，其中大多数来自 Almac 制药公司的工作成果 [文献 2]。此外，本文亦囊括多份参考文献，包括《美国药典》中定义的一系列方法（附录 1）。

药物发现阶段

在药物发现中对于 NMR 使用的管控并不像药物生产阶段那样严格。通常情况下，用于药物发现的仪器并不需要符合 GMP 规范要求。

本章节将简要描述药物的早期发现阶段，主旨于背景介绍，同时也为讨论后续阶段中为达到 GxP 规范所需的各种更改做铺垫。值得强调的是，将质量管理规范引入药物发现阶段正成为一股业界潮流，例如，遵守数据完整性原则。

此处需要特别指出的是，NMR 对那些致力于新药发现的化学家而言是不可或缺的，但同时它也被广泛使用于药物发现阶段。当然，药物发现阶段并不是本文的重点，因此本文将只列举几个例子。

随着片段库的可用性不断增加，NMR 已成为开发新药靶点的关键 [文献 3]。Almac 公司专门配备了带有 Prodigy TCI 低温探头的 500 MHz 布鲁克 AVANCE NMR 波谱仪。该仪器除了执行药物化学方面的常规分析外，还可用于基于片段的筛选。片段筛选可为药物发现管线甄选靶标，为研发化学家们提供关键信息。

药物研发概述

图 1 显示了从药物研发到商业生产的各个阶段，涵盖了最初的发现过程，然后到活性药物成分（API），直到最终产品。NMR 的使用贯穿整个研发过程的各个阶段。值得一提的是，在生产过程中进行的多种类型的分析都直接来自于在早期阶段进行的 NMR 方法的开发和验证。

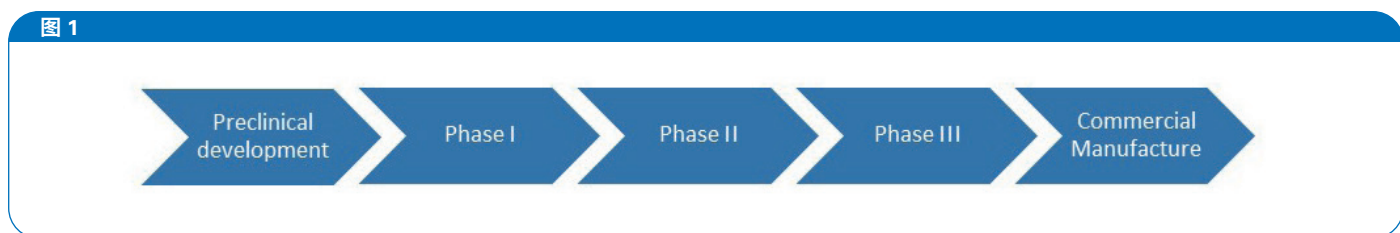


图 1: 药物研发阶段示意图

¹Kellenbach, E., Dani, P., “NMR 在制药中的应用”, eMagRes, 4(2), 2015. DOI: 10.1002/9780470034590.emrstm1397

²本文的部分内容依据 Kerry Hughes 博士 2020 年 1 月 28 日的网络讲座。点击下列链接即可观看: <https://www.bruker.com/events/webinars/the-application-of-nmr-for-drug-development-and-manufacturing-in-a-good-manufacturing-practice-setting.html>, 访问时间: 2020 年 3 月 30 日

³<https://www.theresonance.com/fragment-screening-by-ligand-observed-nmr>, 访问时间: 2020 年 3 月 30 日

向GxP “过渡”

在从药物发现阶段向工艺开发和生产环节推进时，需要引入质量管理规范 GxP。换言之，监管要求需随材料使用阶段的变化而逐步升级。

为了在后续阶段中能够继续使用 NMR，必须采取一系列措施使仪器设备达到 GxP 规范的相关要求。具体步骤详见于监管部门发布的指南 [文献 4]。使 NMR（或其他任何）设备符合 GxP 规范的过程被称为仪器确认。

仪器确认

仪器确认必须全面且详尽。这一过程可为期数月。图 2 显示了 GMP 规范下的仪器确认步骤。近日，Almac 公司采用该流程对一台配备 Prodigy 低温探头的 500 MHz AVANCE NEO NMR 波谱仪进行了确认。确认过程甚至在购买仪器之前就已经开始了。在甄选 NMR 波谱仪时，首先需要考量的是设备性能可否达到未来测试的技术要求。为达到甄选目的，需起草一份能够系统性地评估仪器使用目的的用户需求说明（URS）。并且，该说明需符合各种监管要求，例如美国食品药品监督管理局发布的联邦法规（CFR）第 21 章第 11 条款。鉴于购买 NMR 也是一笔大额投资，购买前还需要考虑设备能否满足企业未来的需求。当然，这些需求可能会不断发展和变化。在与布鲁克的合作中，所有组件产品（即磁体、探头、机柜、配件和维护服务）均能够与 Almac 拟定的用户需求说明相匹配。一旦确定符合要求，即可以进行购买。

图 2

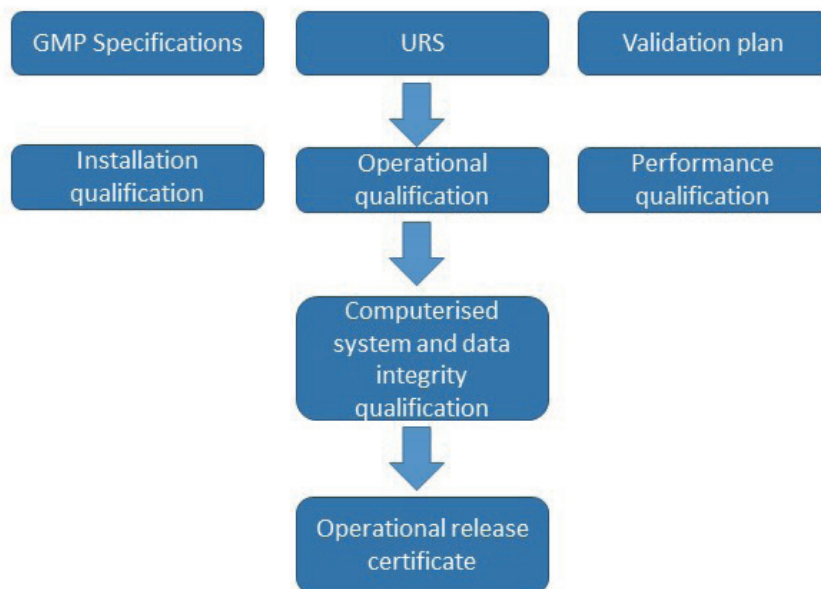


图 2: 仪器确认流程图

⁴<https://www.fda.gov/media/92841/download> 访问时间: 2019 年 12 月 9 日 (在访问当日, 本页面显示最后更新时间为 2015 年 7 月)

仪器正式投入使用前，需经历严格的现场安装与运行确认阶段。这项工作由受过 GxP 培训的布鲁克工程师完成。工作内容包括系统运行测试，以确定仪器符合布鲁克公司的出厂规格，以及计算机系统测试，以确保符合 FDA 的 21CFR Part 11 标准。为保证仪器在整个使用寿命内均能达到要求的参数，Almac 公司内部的仪器性能确认体系也部分借鉴了布鲁克的评定标准。

此外，为保证能够达到 GxP 规范要求，还需进行详细的影响评估和数据完整性评估。该测试还包括评估与过去测量方法的可比性，以确保在新设备上可获得与先前测试相同的结果。就 Almac 而言，这意味着需要在新的 AVANCE NEO 500 MHz NMR 上运行多种方法，并与早先在 AVANCE I 500 MHz NMR 和 AVANCE I 400 MHz NMR 上的测量结果进行对比，以确保新旧结果的可比性。以图 3 为例，在仪器确认过程中，我们分别通过 AVANCE NEO 500 MHz NMR（配备 Prodigy 低温探头）和 AVANCE II 400 MHz NMR（配备 QNP 探头）对某商业化化合物进行 ¹H NMR 分析，并将两组谱图进行对比。进一步，图4展示了上述两台设备获取的二维 NMR 谱图。

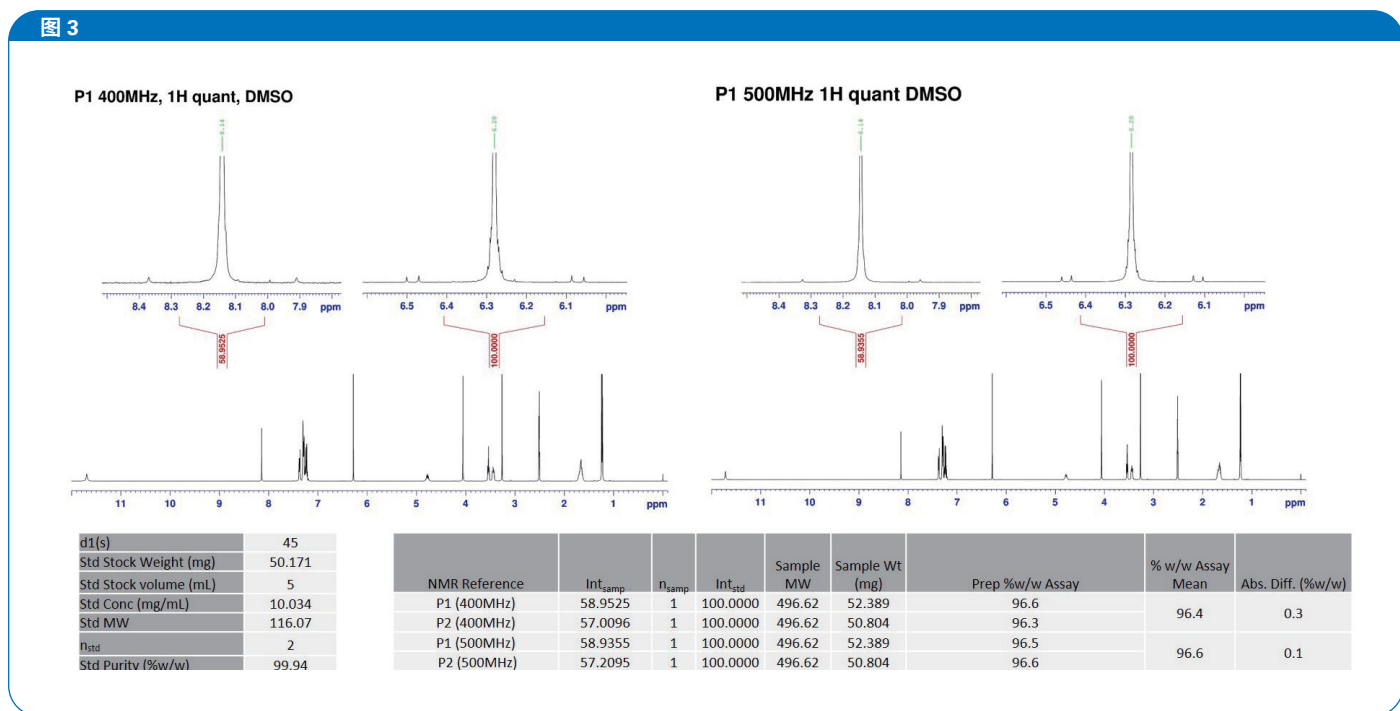


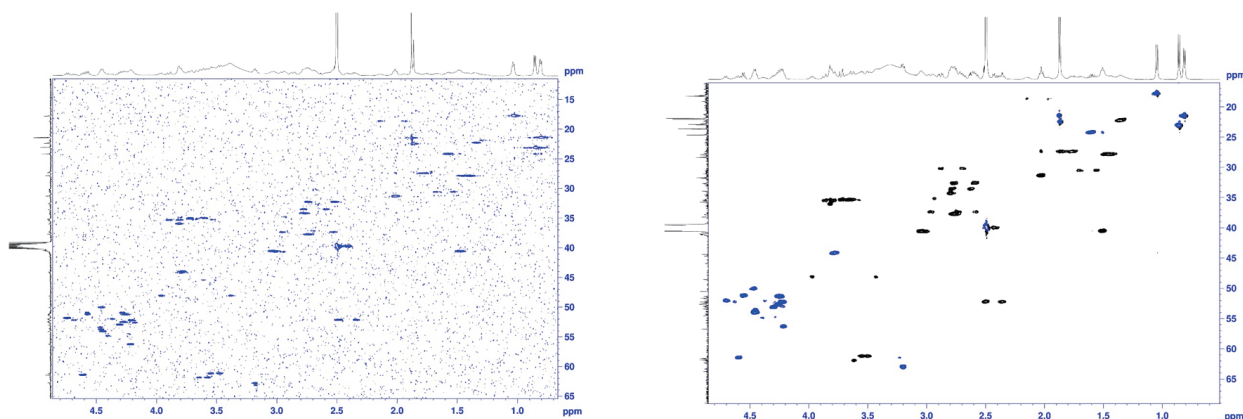
图 3: 仪器确认过程中的 NMR 谱图比较

可以看出，新旧仪器在定性分析方面具有高度可比性。但与旧系统相比，配备了 Prodigy 低温探头的最新款 NEO 可明显提升谱图的信噪比与采集速度（所需时间仅为过去的 10%）。

在通过数据完整性评估和性能确认后，该仪器即可获得运行许可证并正式投入使用。

需要注意的是，在获得符合 GMP 规范的运行许可后，NMR 仪器的性能测试仍将继续。在良好规范环境中使用的系统，必须定期对其进行维护和性能确认 (PQ)。其中包括每天和每周对线性和灵敏度进行检查，还有季度、半年度和年度的维护和校准，使仪器始终保持初始确认时的参数标准。此外，任何计划外的维护和修理，包括为了消除故障隐患所采取的预防措施，都必须记录在案。因为这些举措日后可能会影响仪器的性能，甚至最终涉及病人安全。

图 4



^1H - ^{13}C HSQC, QNP, ns=8 run time = 4.5 hours.
Scaled in order to see all peaks of interest, high background noise clearly visible.

^1H - ^{13}C HSQC, Prodigy, ns=2 run time = 20 mins.
Scaled in order to see all peaks of interest, no background noise visible

图 4: 仪器确认过程中, 新旧仪器二维 NMR 谱图对比

鉴于每台仪器在获得 GMP 环境运行许可前, 都需经过高标准的确认过程, 如果需要更换仪器的任何部件, 都必须使用“同类”部件。如若不然, 则需进行额外的变更控制 [文献 5] 和性能验证, 以确保仪器始终符合 GMP 规范要求。

参照标准品

在药品上市前, 需要制备参照标准品以确保后续生产的药品始终符合最初的标准。此外, 还需制备杂质参照标准品。一种原料药通常需配备多个杂质参照标准品。在全面表征参照标准品的过程中, NMR 常被用于药物鉴定。例如, 可通过定量 NMR 技术 [文献 6], 并辅以其他量化检测 (如气相色谱和水含量), 对药物纯度进行测定。参照标准品亦必须标注失效期。即便在有效期内, 也需定期对其进行再认证, 以保证参照标准品始终符合预定的质量标准。通过分析对比连续几年内的 NMR 数据, 可及时发现潜在的趋势变化, 因此, NMR 鉴定是再认证过程中不可或缺的一环。在日后的生产过程中, 对药品中杂质的定性或定量鉴

定也至关重要。所以杂质参照标准品的认证要求与原料药参照标准品同样严格。需要注意的是, 对药品的测试数量和测试类型取决于其最终用途: 对定性参照标准品只需进行成分鉴定, 而对定量参照标准品则需同时进行成分与量化分析 (例如纯度评定)。

稳定性测试

在获得监管部门的商用批准之前, 原料药和成品药都需经过适量的稳定性测试。测试不仅要考量药品预期的贮藏环境, 还需通过在设定时间内改变贮藏温度和湿度等条件, 对药品进行强化试验。贮藏温度及湿度条件可参照 ICH 指南 Q1A (R2) 至 Q1E [文献 7]。为获取足量数据以达到监管要求, 稳定性测试通常为期数年。图 5 示例了一个原料药/成品药的稳定性测试协议。在测试中, 需比较强化试验样品与参照标准品的 NMR 谱图。若二者一致, 则可证明药品结构没有发生改变。若药品出现降解, NMR 亦可用于确定降解产物成分及其在母体材料中的比例。

⁵https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/MagneticResonance/NMR/brochures/T173714_pharma-change-control.pdf, 访问时间: 2020 年 3 月 30 日

⁶Goda, Y., “将定量 NMR 引入《日本药典》用于规范中药标准化中使用的标记化合物”, *Planta Med*, 79 - SL79, 2013. DOI: 10.1055/s-0033-1351904. <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0033-1351904>, 访问时间: 2020 年 3 月 30 日

⁷ICH 主题 Q 1 A (R2) 新药物和药品的稳定性测试 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf (检索时间: 2020 年 4 月)

图 5

- Storage conditions:
 - 25°C ± 2°C/60% ± 5% relative humidity (RH) over a period of 36 months
 - 40°C ± 2°C/75% ± 5% RH over a period of 6 months.
 - With samples at 30°C ± 2°C/65% ± 5% RH over a period of 6 months and samples at 5°C ± 3°C over a period of 36 months. As backup in case of failure at the above conditions.
- Testing requirements:
 - Appearance
 - Identity by ¹H NMR
 - Purity and Impurities by HPLC
 - Water Content by KF titrator
 - Melting Point (DSC)
 - Particle Size Distribution
- Time points:
 - T=0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 months

图 5: 原料药/成品药稳定性测试方案示例⁸

工艺开发

工艺开发是药物发现向药物生产过渡的一个重要步骤，涵盖了需要在临床前和临床试验中开展的多项研究。这些研究往往是在全面投产之前，与小规模示范批次的生产同时进行。研究过程中开发制定的参数将被用于后续的合成、生产和稳定性测试流程中。而该阶段产生的数据也通常会药物申报过程中上报给 FDA 或 MHRA 等监管机构。NMR 被广泛用于这一阶段内中间产物、成品药和杂质的表征。这同时也涉及对 NMR 鉴定方法的验证。同期进行的还有药物纯度测定和杂质定量分析。这些测试亦有助于建立可靠的定量分析方法，以便在后续的生产中使用。

验证中的技术要求遵循国际协调理事会 (ICH) 关于人用药品的指导文件。该指导文件融汇了全球监管机构的具体要求以及制药业内的经典实例。

图 6 详细列举了 NMR 在整个药物生产流程中的应用范畴。每批次的生产规模可从数千克到数吨不等。下文提及的多种 NMR 鉴定与定量的方法开发，来源于药物开发初期，在克级到百克级的试验批次基础上进行。

图 6

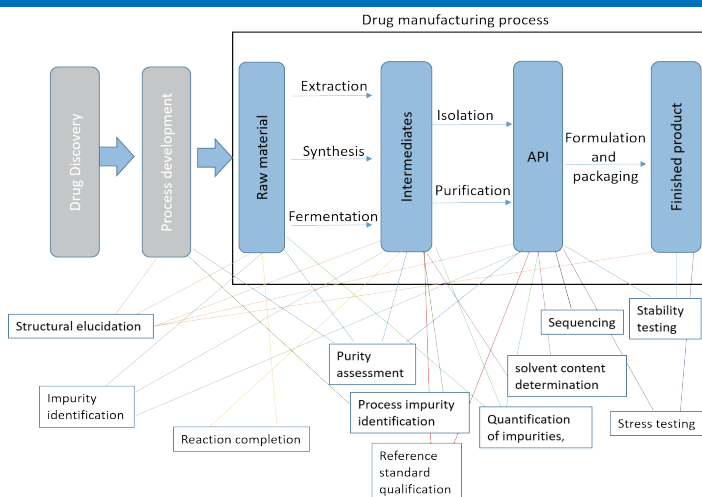


图 6: 药物生产过程中的 NMR

⁸细节来自于 Almac 所使用的稳定性方案

⁹ICH 主题 Q 2 (R1) 分析程序验证: 文本和方法 https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf (检索时间: 2020 年 4 月)

药物生产

图 6 方框中展示了药物生产流程以及 NMR 在该过程中的应用。下文将详细探讨 NMR 在原材料, 中间产物, 原料药和成品药中的应用。

原材料

原材料测试涉及到原材料的表征, 以确保其成分组成符合预期, 并且还能对原材料进行纯度评估, 以确保反应器装载了足量的原材料。利用 NMR, 可快速高效地对不同批次内的原材料进行测试。通常情况下, 该类测试通过对比一维 ^1H NMR 谱 (测试时间 < 1分钟) 与参考谱图即可完成。纯度评估则往往使用外标法进行定量 NMR 分析。测试完成后, 符合纯度与适

用性标准的原材料即可进入后续的生产环节。由于生产过程中需要大量原材料, 这类测试是确保原材料供给的质量与稳定性的关键。在选择一级二级供应商之前, 对每个候选供应商的原材料进行多批次测试也是必不可少的。对于生产中使用的“关键原材料”来说, 这一步骤尤为重要。图 7 为供应商资格鉴定测试示例, 利用 NMR 对生产中使用的关键原材料进行分析测定。从 ^1H NMR 数据可以看出, 两个供应商的原材料存在一定差异。但很显然右侧供应商的原材料存在更大的批次品质差异 (特别是在 1-2 ppm 区域)。通过比对不同原材料中的杂质数据, 公司可选择最优供应商, 为日后千克级生产提供原料。对于生产化学家和化学工程师来说, 原材料测试的结果也极其重要, 并有助于更有效地管理生产流程并把控最终原料药的品质。

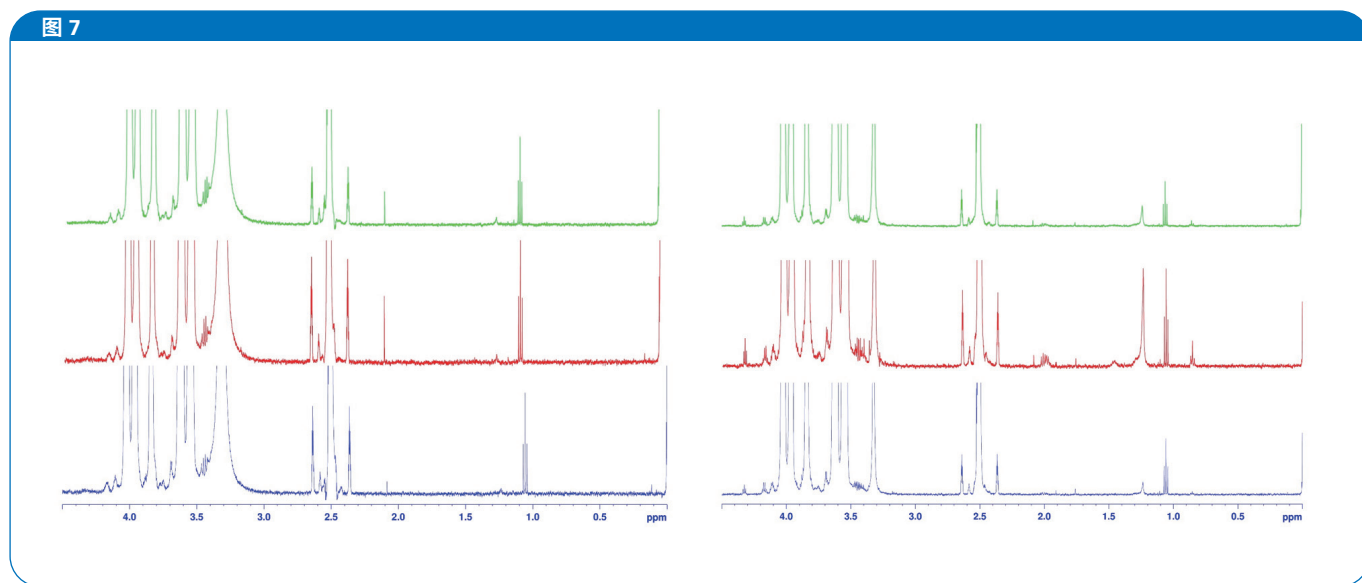


图 7: 对两个供应商 (左右) 不同批次的 (上下) 关键原材料进行的 ^1H NMR 表征。

生产过程中的测试

药品生产过程中的测试也同样不可或缺。测试内容取决于具体生产步骤, 该步骤的关键程度, 以及后续生产环节中生产的物质类型。这些测试往往是确保顺利生产的关键, 而且随着生产的全天候运行, 测试的及时性也尤为重要。测试可由工厂化学家使用生产指令进行, 或者由轮班质量检测员使用先前开发

验证过的分析方法来进行。在生产中, 作为过程控制 (IPC) 测试的一项, 可通过简单的化合物核对以确保形成所需的产品, 并确认化学反应的完成。大多数情况下, 还需对可分离中间体 (IIR) 进行检测, 以保证下一步生产中所使用的材料准确无误。用于成分鉴定的化合物核对, ICP 或 IRR 相对简单。通过检测 ^1H NMR, 并与参考谱图定性对比即可。由于中间体的纯度将决定后续反应器装料的细节, 因此纯度测定也是必需的。

测定方法为：使用预先确定的实验参数，对样品进行定量 NMR 分析，并将量化结果与已知纯度的参照标准品进行对比。检测分析需在两到三个平行样品上进行，以确保结果的重复性，并保证达到 2% 的绝对精度标准。图 8 展示了一个 IIR 的定量分析的例子。图中详细列出了常用的样品量和实验参数。并给出了两个平行样品的分析结果（重量百分比，即 % w/w），以及样品稳定性的测试结果。所有结果均达到要求的精度标准。此外，测试结果还必须符合该物质预先规定的参数标准范围。有时候，这就是一个简单的报告结果，然后基于该数值进行反应器装料计算。例如，预设的参数标准可能规定，纯度高于 95% w/w 时才可以进入下一个生产环节。

在某些情况下，还需要进行溶剂含量测定，因为溶剂水平往往会影响到后续加工。溶剂含量测定的结果将决定在继续加工前是否需要进一步处理（例如干燥）。许多溶剂含量测定是基于 NMR 的相对定量分析。将样品峰的积分与溶剂峰的积分相比，即可确定溶剂浓度。NMR 方法简单高效。无论是成分鉴定还是定量分析，均不需要复杂的样品制备。由于分析和处理的周期短，且基本上不需要方法研发，因此使用 NMR 可最大限度地缩短生产延误。Almac 公司的许多生产活动中都采用了这些方法，比如用以评估可分离中间体。图 9 为测定原料药中甲醇含量的示例。在开发针对 IPC 或 IIR 的溶剂含量方法时，也采取了类似的步骤。在指定范围内利用加标法，确保测定方法在使用范围内得到可重复的结果。

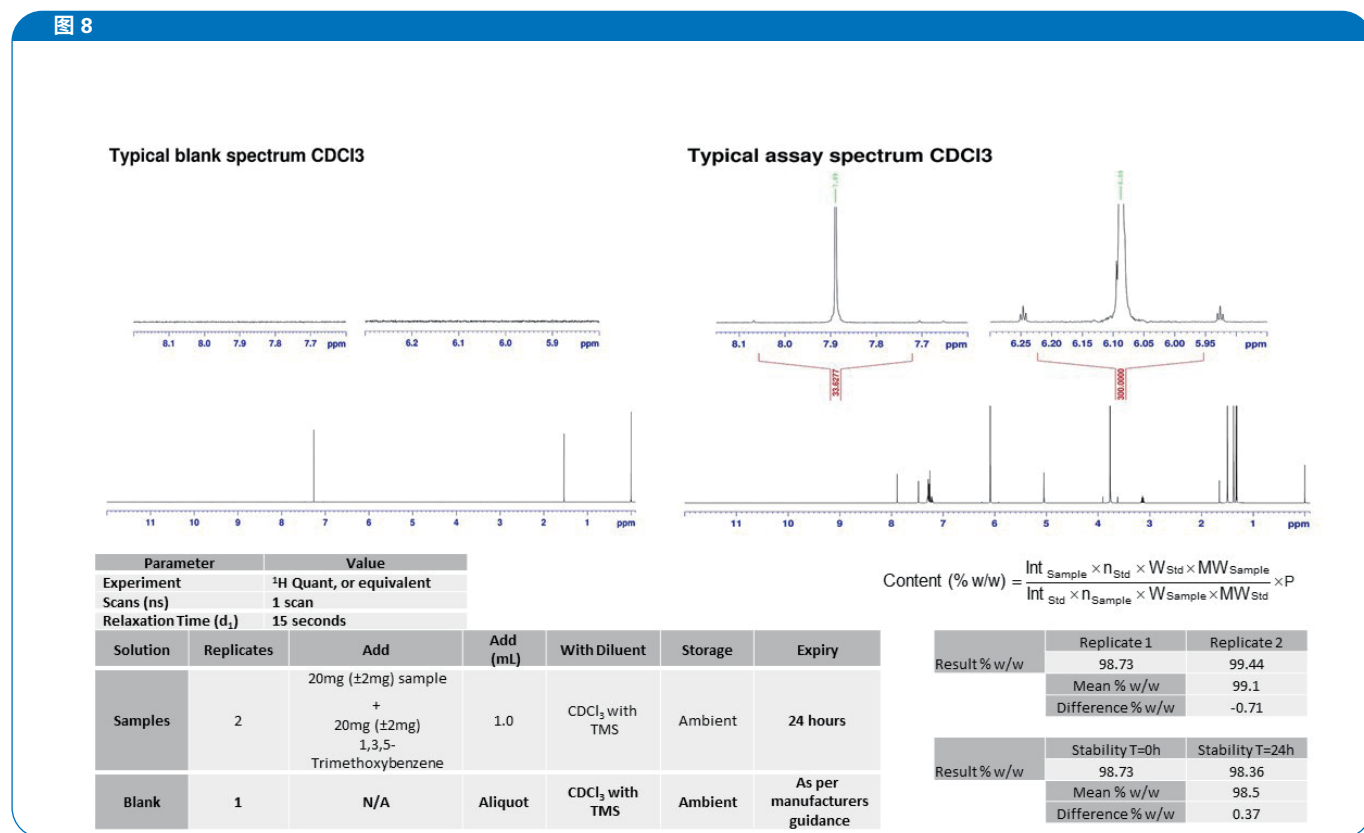
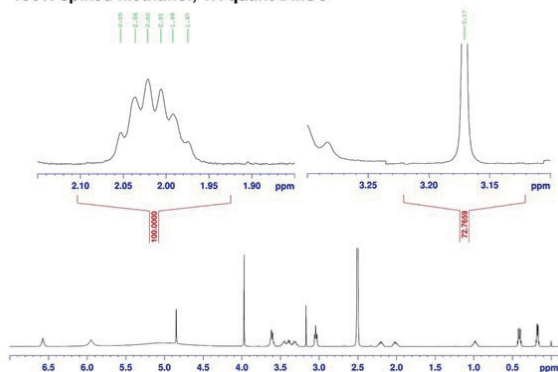


图 8: 利用 ¹H NMR 对 IIR 进行定量分析

150% spiked Methanol, 1H quant DMSO



Sample	Signal :Noise	Mean Signal :Noise
LOD-1	11.2	11.7
LOD-2	10.6	
LOD-3	13.4	

Sample	Spiked Recovery (%)	Mean spiked recovery (%)	RSD (%)	Overall RSD (%)
50% P1	104.8	102.8	1.8	7.8
50% P2	103.0			
50% P3	100.4			
100% P1	88.2	89.9	2.4	
100% P2	88.1			
100% P3	93.2			
150% P1	93.5	104.3	6.7	
150% P2	104.9			
150% P3	111.8			
150% P4	107.0			

LOD determination 1H quant, DMSO

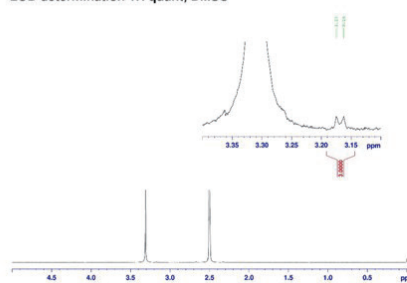


图 9: 原料药中甲醇含量验证

最终产品: 原料药

最终原料药的分析取决于监管机构的要求和成品药投入的市场。这种测试通常需要引入大量不同的分析手段,以涵盖药品分析各个方面。每个分析方法均具有单独的参数标准范围,只有在满足全部标准时才可将药品投入市场。测试很大程度上依赖于国际协调理事会 (ICH) 指南中规定的验证方法和参数标准范围。NMR 方法的验证与其他分析方法的验证相同。例如,对于成分鉴别测试,需要验证特异性。而对于定量方法,则需要验证准确度、精确度、特异性、线性、稳定性和测量范围。此外,根据要求还需鉴别在制造原料药过程中形成的所有杂质 (高于 0.1%) [文献 10],并量化原料药批次中这些杂质的具体含量。同时必须评估最终原料药的溶剂含量。该测试通常是与气相色谱结合进行的。对于 NMR 来说,可通过与外部标准品对比或限度测试,对溶剂含量进行定量分析。该测试同样依循国际协调理事会

(ICH) 指南中规定的验证方法。图 9 以 Almac 生产的某种物质为例,展示了甲醇含量测定的 NMR 方法验证。根据 ICH 指南的规定,杂质水平的测定需使用限度试验法,期间必须验证特异性

和检测限这两个参数。本例显示了在 50-150% 的甲醇标准浓度下对样品进行加标回收的分析,评估了加标回收率和相对标准偏差 (%RSD)。使用 NMR 得到 %RSD 与气相色谱的结果一致。因此,利用 NMR 经验证的限度测试不仅可替代气相色谱,而且还能大幅缩短开发时间。

在药物上市前,需要使用成分鉴别与定量分析技术,对原料药进行全面的表征。NMR 是一种非常常用的手段。通过一系列的 NMR 实验,可全面准确地获取所研究物质的化学结构。最基本的实验类型包括: ^1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC 以及 ^1H - ^{13}C HMBC。这些实验通常基于 ^1H 和 ^{13}C NMR,用于小分子的结构解析。

对于在生产车间定期生产的批次,通常会有一个参考谱图,可用于快速确认批次间的化合物结构是否一致。图 10 显示了,在上述所列 NMR 实验的协助下,对小肽分子进行结构指认的 ^1H - ^{13}C

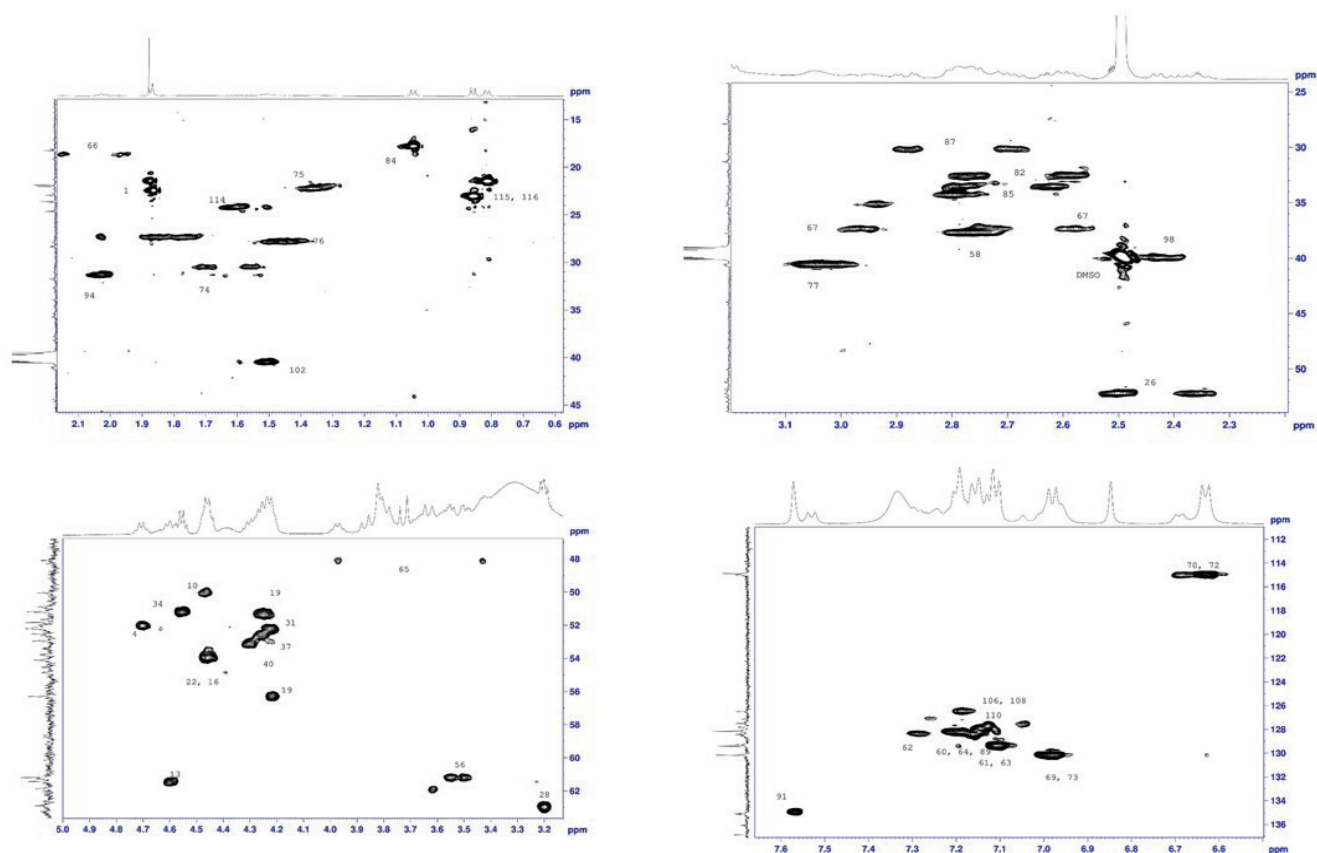


图 10: 小肽分子的HSQC谱图指认

相关实验 (HSQC) 的结果。然而, 原料药不一定是小分子, 也有可能是合成的更大分子。事实上, 已经有越来越多的大肽分子被发现并进入早期临床试验环节。除了多肽测序, 这些大分子同样需要全面的表征。随着过去十年来 NMR 技术的不断发展, 大肽分子的表征可同时兼顾速度、灵敏度和分辨率。使用 Prodigy 冷却低温探头, Almac 公司能够对由 10 至 40 个氨基酸组成的多肽分子进行表征和测序。在购入低温探头前, 多肽的表征是个难题, 在某些情况下大分子的分析也常常受限。现在, 多肽分子的表征已成为 Almac 公司的常规业务。为了对这些多肽进行全面的表征与测序, 除采集上述的基本实验外, 还需进行 ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{15}N HSQC、 ^1H - ^1H ROESY 和 ^1H - ^1H NOESY 实验。图 11 显示了使用上述的 NMR 实验对一个包含 13 个氨基酸的多肽进行的测序。

最终产品: 疫苗

多个应用会议论文集和书篇章 [文献 11] 已对 NMR 分析多糖结合疫苗进行了论述。书中提到:

“从多糖体抗原到最终产品, 高场 NMR 波谱可高效可靠地对疫苗整个生产过程进行追踪管控。

位于意大利锡耶纳的 GSK 疫苗部门最近发表了一篇颇有见地的论文 [文献 12], 题为:

“利用 NMR 评估四价结合疫苗制剂中脑膜炎球菌多糖血清组 A 的 O-乙酰基含量”

¹¹Berti, F., Ravenscroft, N., “碳水化合物疫苗表征”。摘自: Lepenies, B. (编辑) “基于碳水化合物的疫苗”。分子生物学方法, 2015, 第 1331 卷。Humana Press, 纽约州纽约市。

¹²Berti, F.等人, “核磁共振检验用于估计四价结合疫苗制剂中脑膜炎球菌多糖血清群 A 的 O-乙酰基含量”, ACS Omega, 2019, 12, 12827-12832。

图 11

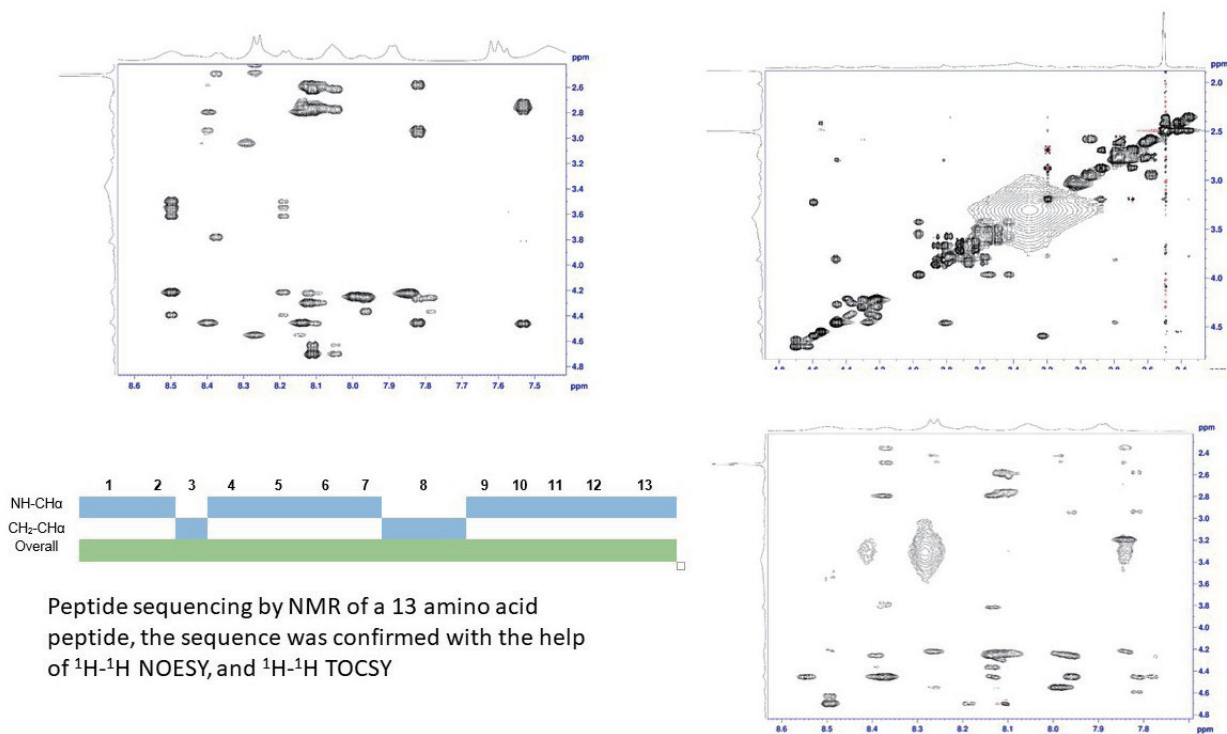


图 11: NMR 多肽测序

药品上市后的分析研究

在完成生产后，仍需对原料药的药物质量进行追踪分析。这些额外的测试可以保证未来生产过程中的药物质量以及产品上市后的质量。按照监管机构要求，在此阶段中，需对药品进行连续的分析测试，以保证药物在整个保质期内的质量与数据完整性。有时候，药物产品上市的国家也会有额外的测试要求，以确保药品符合某些质量标准。作为海关查验的一部分，这些测试需在药物入境前执行。该国监管机构可能要求对所有批次的药品进行测试，但也可能是随机抽查。

一个知名范例是，在污染危机之后对肝素的检测。大概在 2006 年，某肝素产品（用于若干适应症的 12-15 KD 糖胺聚糖）存在质量问题，这一事件在技术文献中被多次报道，并广为人知。也许不太为人所知的是，NMR 在确定这些质量问题的原因方面发

挥了重要作用。现将当时的一份重要出版物 [文献 13] 的节选转载如下。

“最近，多项分析测试均发现了可疑批次与对照批次的差异 (5)。通过旋光度、毛细管电泳和一维 NMR 的组合对肝素批次进行筛选，在此过程中研究人员发现了一种特定的模式，可用来区分可疑批次和对照批次。在毛细管电泳的结果中，除了与肝素有关的宽峰外，可疑批次还包含一个额外的前缘峰。¹H NMR 分析表明，可疑批次和对照批次之间存在明显的差异，尤其是在谱图的乙酰基区域 (2-2.2 ppm)。鉴于这些分析技术的性质，以及在比较可疑批次和对照批次时观察到的差异，可推断主要污染物来源于一种高度硫酸化的“类肝素” (5)。

为了进一步了解特定批次肝素中存在的污染物的结构，我们尝试对主要污染物进行化学结构鉴定。因为肝素本身由复杂的糖胺聚糖链混合物组成，鉴定工作需要使用包括多维 NMR 在内的多

项技术，以克服复杂多糖（包括肝素）鉴定中的固有挑战。在此过程中，我们能够明确地确定污染物的结构。为进一步证实鉴定的结果，我们还将污染物分离出来，并与化学合成的标准品进行对比。”

由于肝素污染事件，每一批运往美国市场的产品都要进行污染测试。运输文件中必须包含污染测试的结果，并在入关时接受检查 [文献 14]。经过验证，¹H NMR 方法可有效地确保污染物含量低于规定水平。在合规性测试方面，Almac 与许多制药公司合作，使用 NMR 来确保药物产品符合监管要求并顺利通过海关检查。

还有一个例子是非格司亭，这是一种用于治疗低血中性粒细胞的 18.8 kDa 生物分子。美国食品和药物管理局在网上公布了他们使用 NMR 评估非格司亭高级结构 (HOS) 的工作，标题为“药物评价与研究中心 (CDER) 科学家使用现代测量工具实现复杂药物的质量保证和相似性研究” [文献 15]。该网页上的节选转载如下。值得一提的是，节选片段中还包含了一篇颇有价值的参考文献 [文献 16]:

“为测试 NMR 方法的可变性和可靠性，OTR 科学家与美国和国外的科研人员合作进行了一系列实验，在四个独立的 NMR 实验室中对不同的非格司亭生物仿制药的结构进行研究。科学家们发现，即使样品检测由来自不同国家的研究人员完成，且 NMR 的磁场强度也不同，只要 NMR 仪器的校准无误，他们可以在四个独立的实验室环境中获得一致的结果。鉴于 NMR 数据的高精度与可重复性，其获得的结构信息可以在未来几年内安全使用。这为将来更多的非格司亭生物仿制药产品的开发提供了坚实的成本效益基础。”

结语

经初步考察，正式报道的 NMR 方法数量似乎相对较少。然而，本文中列举的示例涵盖了各种大小的分子以及多样的测试目标。总之，这些示例已清晰地表明，NMR 在临床前、后期制药研发和生产中都不可或缺，并已经在 GLP 和 GMP 质量管理规范条件下得到使用。

本文阐述了 Almac 在药物研发和生产中所使用的多种 NMR 技术，这其中不仅包含数个《美国药典》(USP) 中公开的标准方法，也包括近期对大分子（分子量达 18.8kDa）表征技术。

基础 NMR 是基于一维或二维方法，通常使用氢和碳作为观察核。文中所描述的 NMR 方法专门用于分析原材料、赋形剂、可分离中间体，原料药和最终产品。这些检测的具体目的为：确定主要药物成分的化学组成，鉴定并量化杂质成分，以及确定药物含量。迄今为止，Almac 公司已对包含多达 40 个氨基酸的多肽大分子进行了鉴定和测序。此外，文献中也给出了利用 NMR 确定高级结构的例子。很明显，NMR 已被广泛用于 GxP 环境，且近年来，其应用的多样性也大幅增加。NMR 提供了一种方便、快速、且成本低效益高的分析技术，并可被应用于多个生产环节。

¹⁴Szajek, A.Y 等人，“美国法规和药典对全球肝素污染危机的回应”，*Nat Biotechnol.* 2016, 34(6), 625–630. doi: 10.1038/nbt.3606”

¹⁵<https://www.fda.gov/Drugs/NewsEvents/ucm603877.htm> 访问时间: 2018 年 10 月 24 日 (在访问当日, 本页面显示最后更新时间为 2018 年 4 月 6 日)

¹⁶Ghasriani, H., Hodgson, D.J., Brinson, R.G., McEwen, I., Buhse, L.F., Kozlowski, S., Marino, J.P., Aubin, Y., Keire, D., *Nat Biotechnol.*, “2D-核磁共振在非格司亭生物仿制药结构评估中应用的精确度和稳健性”, 2016, 34(2), 139-141.

¹⁷<http://www.usppf.com> - 访问时间: 2020 年 1 月 (注: 新用户必须注册一个账户)

附录 1: 《美国药典》中的方法

我们注意到《美国药典》(USP) [文献17]中描述了多种 NMR 测试方法,用以衡量这些技术在 GxP 环境中使用的成熟度。这些范例测试的目标包括:确认物质成分(可能是原料药或赋形剂)和确定原料药的含量。值得一提的是,所描述的方法均是基于使用 ^1H 或 ^{13}C 作为观察核的一维实验(见下文表1)。

Substance	Function	Method Objective	NMR method Details
Gadoversetamide Injection	MRI Contrast Agent	Determine Performance	Relaxometry
Poloxamer	Excipient	Composition	^1H method
Hydroxypropyl Betadex	Excipient		^1H method
Orphenadrine Citrate	API	Impurity	^1H method
Enoxaparin Sodium	API	Identification	^1H method
Dalteparin Sodium	API	Identification	^1H method
Goserelin Acetate	API	Identification	^{13}C
Polyoxyl 10 Oleyl Ether	Excipient	Polymer Length	^1H method
Polyoxyl 20 Cetostearyl Ether	Excipient	Polymer Length	^1H method
Goserelin Acetate	API	Amino Acid Content	^{13}C method (Quantitative)
Oxytocin	API	Identification	^1H method
Chitosan	Excipient	Composition	^1H method
Heparin Sodium	API	Identification	^1H method
Hydroxypropyl Pea Starch	Excipient	Assay	^1H method
Hydroxypropyl Potato Starch	Excipient	Assay	^1H method

关于 Almac

Almac 集团是一家医药合同定制研发生产企业,在药物研发生命周期内,为全球制药和生物技术领域提供综合性服务。Almac 的科学业务部提供的服务包括:原料药开发和制造、放射性标记、生物催化方案、多肽和蛋白质技术、预制剂、固态和分析服务。

作为一家私营跨国企业,Almac 在过去五十年中不断成长,现已在欧洲、美国和亚洲等 18 个厂区内雇用了 5600 多名高能人员。

关于布鲁克

布鲁克一直致力于支持科学家取得突破性科学发现,并不断研发新的应用以提高人们的生活质量。布鲁克出品的高性能科研仪器以及高价值分析和诊断解决方案,让科学家能够在分子、细胞和微观层面探索生命和物质的奥秘。凭借与客户的密切合作,布鲁克在诸多领域实现了创新突破和生产提升,并创造了大量客户成功案例,如在生命科学分子研究、制药应用以及显微镜、纳米分析和工业应用,以及细胞生物学、临床前成像、临床表型学、蛋白质组学研究和临床微生物学等。



布鲁克 NMR 微信公众号

布鲁克(北京)科技有限公司

网址: www.bruker.com
E-mail: sales.bbco.cn@bruker.com
布鲁克应用技术咨询:
400-898-5858
布鲁克售后技术支持:
400-898-1088

布鲁克(北京)科技有限公司
北京市海淀区西小口路66号
中关村东升科技园B-6号楼C座8层
邮编: 100192
电话: (010) 58333000
传真: (010) 58333299

上海办公室
上海市闵行区合川路
2570号1号楼9楼
邮编: 200233
电话: (021) 51720800
传真: (021) 51720810

广州办公室
广州市海珠区新港东路
618号南丰汇6楼A12单元
电话: (020) 22365885/
(020) 22365886