

药物逆向工程分析方法

化学科学

在本白皮书中，我们将介绍如何使用拉曼成像技术对现有药物制剂进行逆向工程分析。

背景

美国食品及药物管理局 (FDA) 建有多個監管通道供製藥公司申報仿製藥註冊。

其中最值得称道的是简略新药申请 (ANDA) 通道，此审批通道允许仿制药公司开发原研药的复制品并在仿制药申报资料中纳入原研药的安全性和有效性数据。二十世纪八十年代，《药品价格竞争与专利期补偿法案》颁布，建立了简略新药申请通道。上述法案俗称《Hatch-Waxman法案》，取名于提议此法案的保守共和党参议员Orrin Hatch和自由民主党众议员Henry Waxman。

当时，美国政府正对仿制药获批数量极低的问题深感担忧。在《Hatch-Waxman法案》颁布之前，原研药公司可以轻易地设置很多法律障碍阻止其他公司开发仿制药，这导致仿制药研发行业非常不景气。《Hatch-Waxman法案》扫清了其中的很多法律障碍，成功地激励仿制药公司生产平价仿制药；同时，通过允许原研药公司在药品首次上市后享有足够长的独家经营期，也为原研药公司提供了保护，保障了原研药公司可以通过创新盈利。

另一个仿制药审批通道是505(b)(2)程序。在以下情况下可以通过该通道进行药物申报：申报资料中包含从先前对所选参照品进行的研究中获得的安全性和有效性研究报告，但是该药物的制备方法有意与参照品不同。505(b)(2)申请的典型示例是：申请为已上市药品增加新适应症，或者通过改变已上市药品的制备方式改变其给药途径。在这些情况下，药品生产商可以使用已上市参照品的API毒理和安全性数据，但是仍然必须证明其药物制剂的安全性和有效性。

在ANDA中，生物等效豁免越来越受关注。生物等效豁免是一种仅仅通过体外测试而无需进行生物等效性研究即可证明仿制药与参照品等效的监管途径。仿制药必须具有Q1、Q2和Q3同一性，方能获得生物等效豁免。

Q1	定性相似性：被测品和参照品包含的活性及非活性成分相同。
Q2	成分的定量相似性：活性及非活性成分的含量相同。
Q3	结构同一性（目前仅限于外用药物）：微观结构具有等同性。

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4365090/>

为了证明固体制剂的Q1和Q2等同性，配方设计师需要证明仿制药中的成分及其含量与原研药相同。

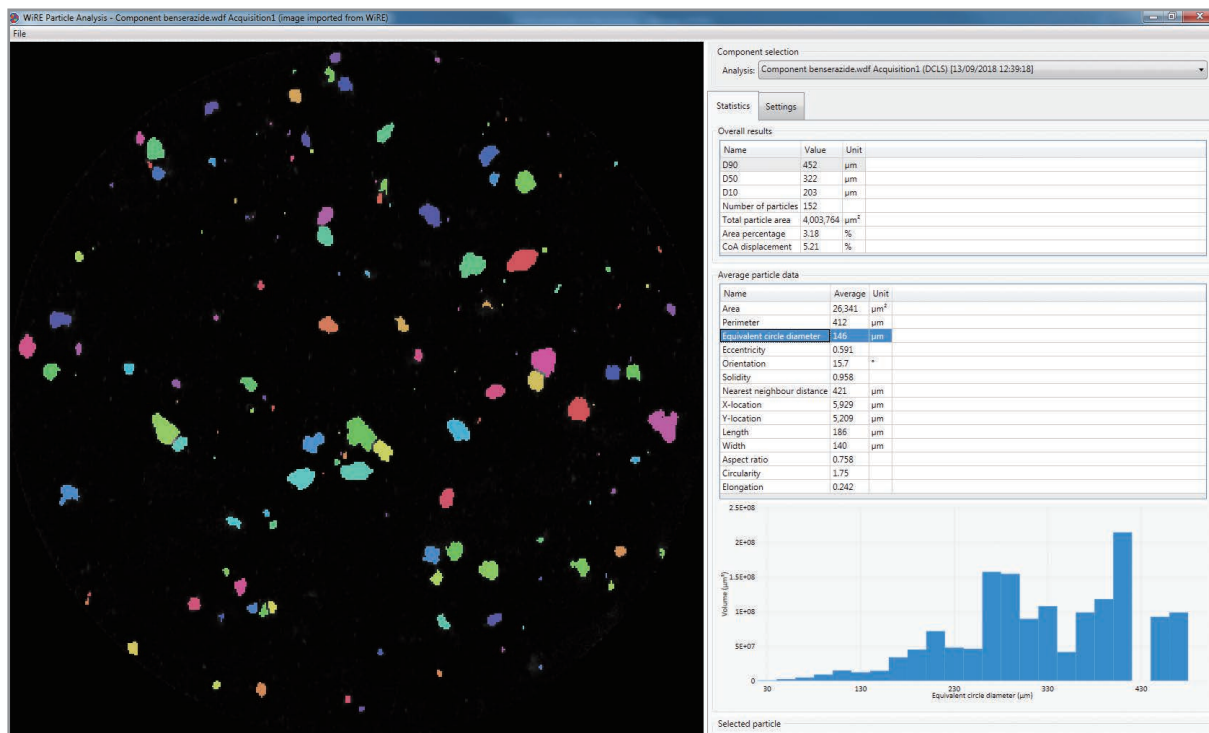
通常利用HPLC等定量分析方法进行分析。

Q3同一性 — 获得生物等效豁免的最后一道门槛 — 目前仅限于外用药物，因为外用药物的全身性暴露风险小，因此给药方式发生小的变化并不会给患者带来风险。

拉曼成像

拉曼成像技术识别成分和量化含量的能力使其非常适合鉴定Q1和Q2同一性。

Q3同一性，即微观结构同一性，目前不适用于口服固体制剂。但是，拉曼成像可以量化固体剂型的微观结构，包括颗粒尺寸、均匀性和相对百分含量。未来或许可以使用拉曼成像技术证明Q3同一性，并将此作为支持口服固体制剂获得生物等效豁免的其中一项测试？

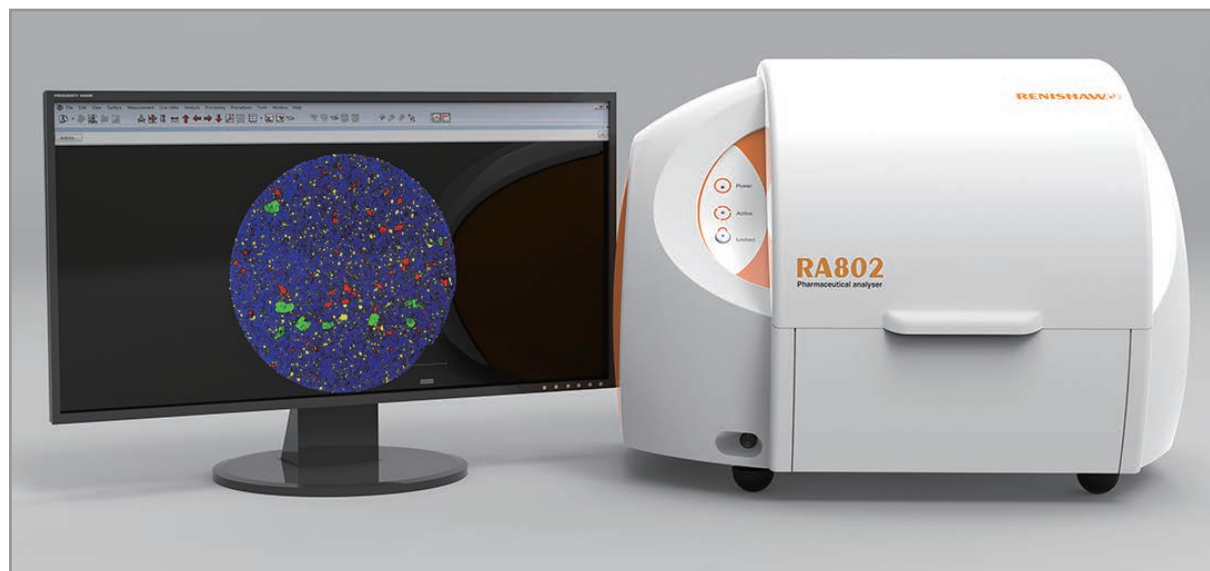


雷尼绍WIRE软件生成的颗粒统计信息

为了确定某个制剂的微观结构，我们会采集样品表面的数千张拉曼光谱。每个像元都是一个完整的拉曼光谱，包含该采样点的所有化学信息。

雷尼绍RA802药物分析仪采用雷尼绍独特的StreamLine™和LiveTrack™技术，能够在保持实时聚焦的同时高速分析任何粗糙或光滑的表面。RA802全速运行时每秒可以采集多达1,500张光谱，与传统拉曼仪器相比，大幅缩短了分析时间。

采集了足够多的光谱之后即可生成样品的完整化学图像，包括API、多晶型物、赋形剂、降解物和污染物，并采用不同的颜色分别标记所有必要成分。



雷尼绍RA802药物分析仪

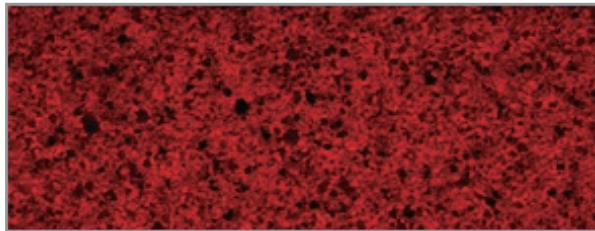
原研药和仿制药对比

我们对比了一个原研药片及其仿制药片的拉曼图像。

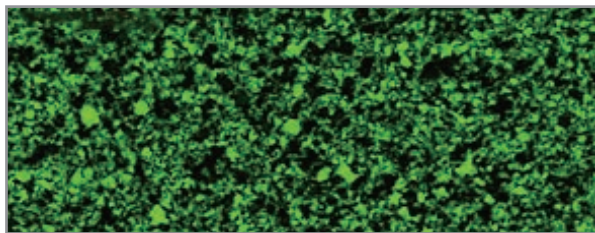
我们利用采集的拉曼光谱识别了两种药片中包含的各种成分，并采用不同的颜色分别标记，然后将各种成分的图像单独显示出来，以便对比。

识别出每个成分之后，即可对图像上的区块和颗粒进行颗粒统计分析。这些统计数据可以用于对比不同药片、批次和产品，以识别主要差异并分析造成差异的原因。

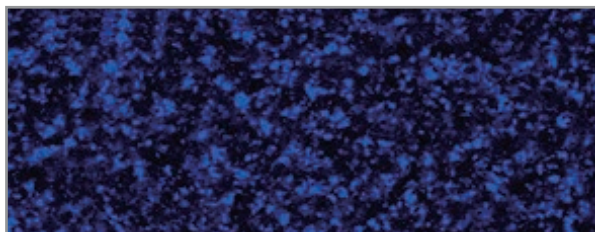
原研药



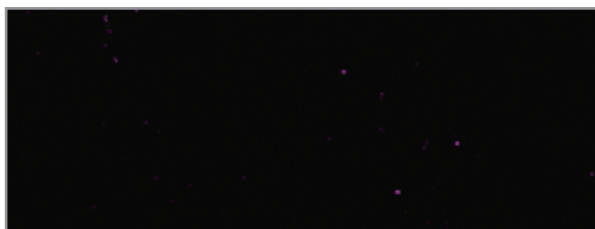
API



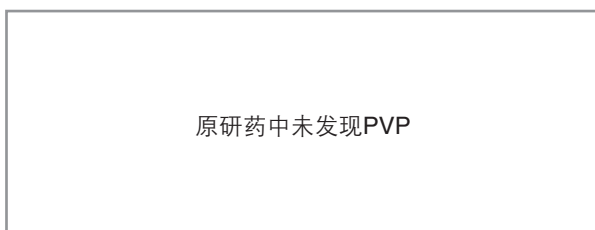
乳糖一水合物



微晶纤维素



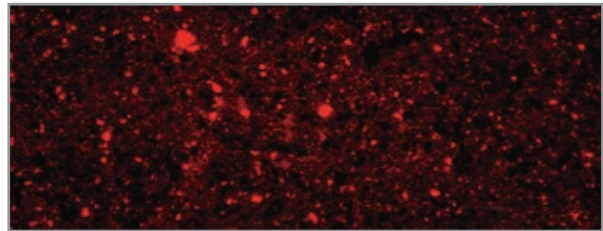
二氧化钛（锐钛矿）



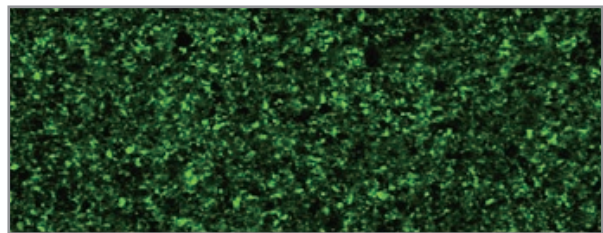
PVP

原研药中未发现PVP

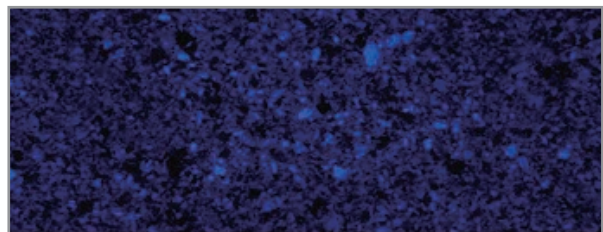
仿制药



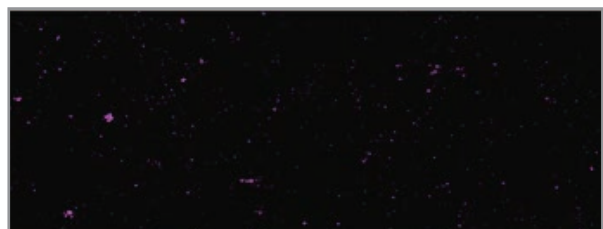
API



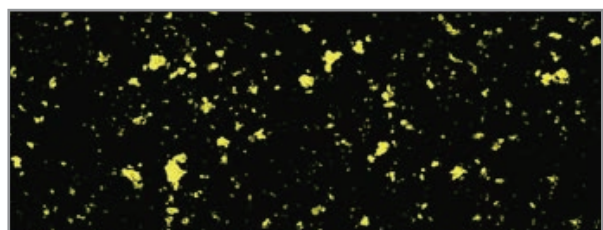
乳糖一水合物



微晶纤维素



二氧化钛（锐钛矿）

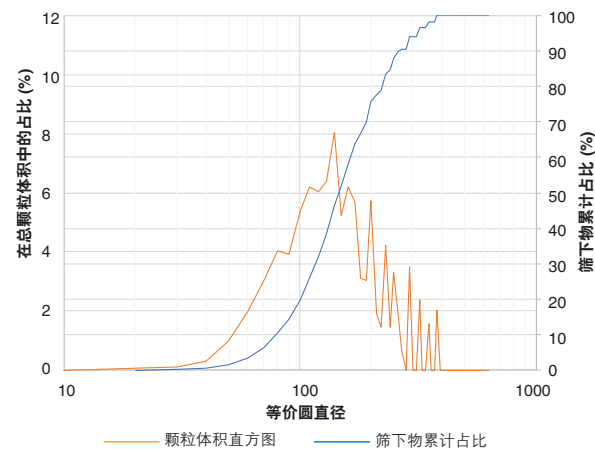


PVP

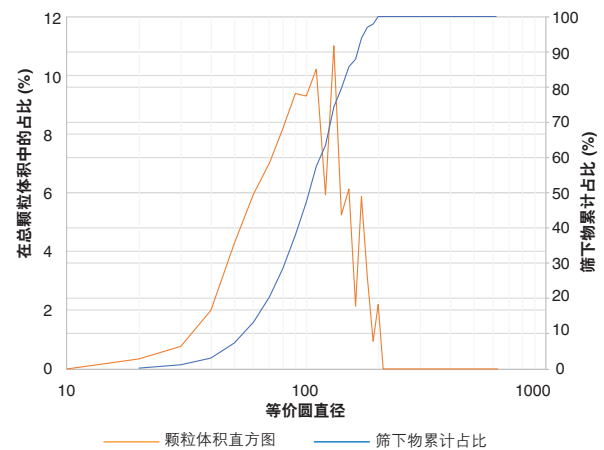
颗粒尺寸

我们使用从拉曼图像得出的数据对比了原研药与仿制药中微晶纤维素 (MCC) 和乳糖的颗粒尺寸，以确定原研药与仿制药之间是否存在明显差异。

原研药与仿制药中乳糖的颗粒体积直方图

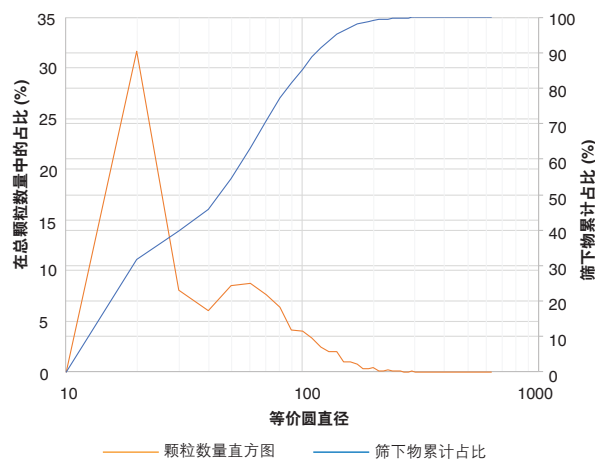


原研药中乳糖的颗粒体积直方图及筛下物累计分布曲线

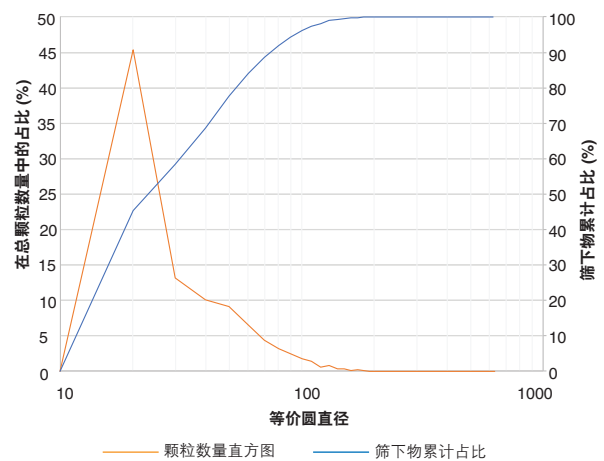


仿制药中乳糖的颗粒体积直方图及筛下物累计分布曲线

原研药与仿制药中乳糖的颗粒数量直方图

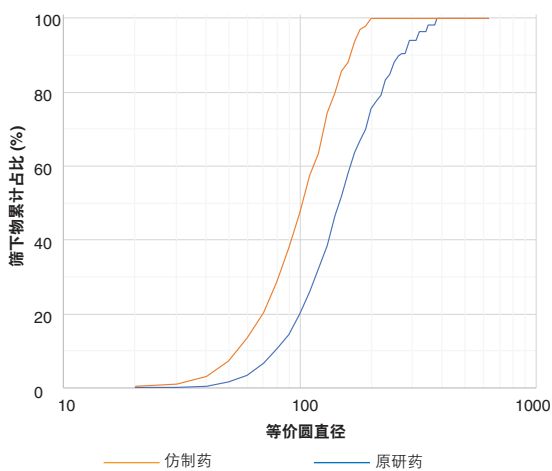


原研药中乳糖的颗粒数量直方图及筛下物累计分布曲线

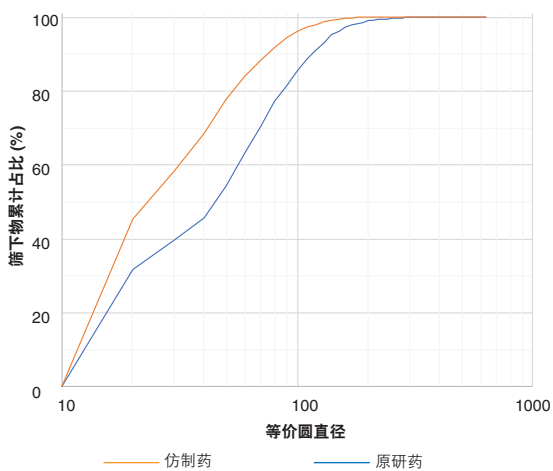


仿制药中乳糖的颗粒数量直方图及筛下物累计分布曲线

原研药与仿制药中乳糖的筛下物累计占比对比图

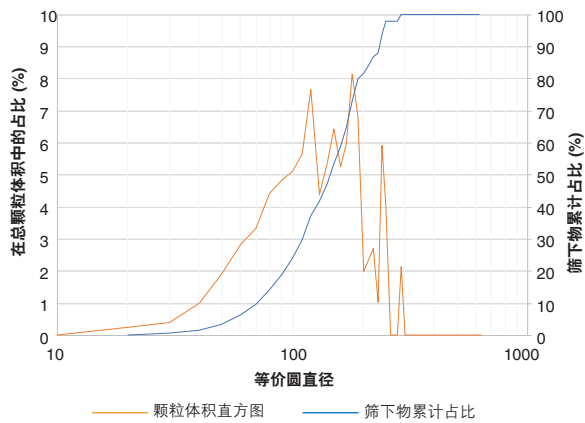


原研药与仿制药中乳糖的颗粒体积加权对比图

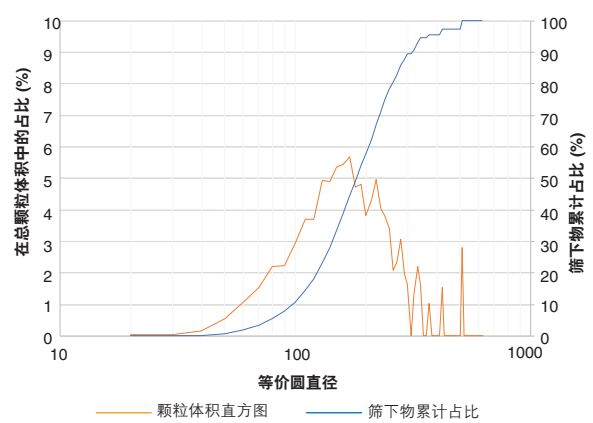


原研药与仿制药中乳糖的颗粒数量加权对比图

原研药与仿制药中MCC的颗粒体积直方图

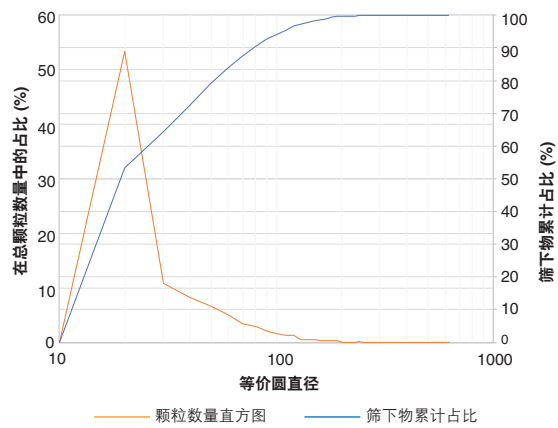


原研药中MCC的颗粒体积直方图及筛下物累计分布曲线

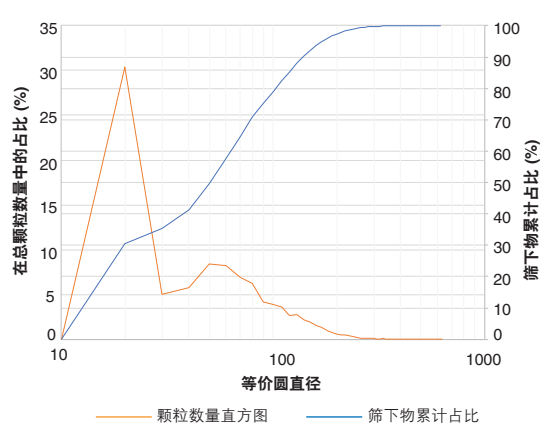


仿制药中MCC的颗粒体积直方图及筛下物累计分布曲线

原研药与仿制药中MCC的颗粒数量直方图

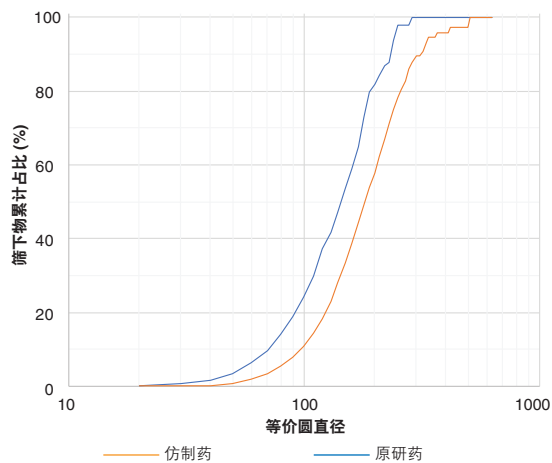


原研药中MCC的颗粒数量直方图及筛下物累计分布曲线

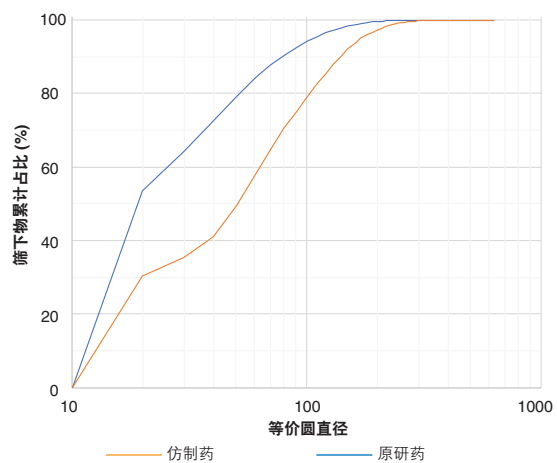


仿制药中MCC的颗粒数量直方图及筛下物累计分布曲线

原研药与仿制药中MCC的筛下物累计占比对比图



原研药与仿制药中MCC的颗粒体积加权对比图



原研药与仿制药中MCC的颗粒数量加权对比图

原研药与仿制药对比结果

	乳糖		MCC	
	仿制药	原研药	仿制药	原研药
D90	164 μm	253 μm	298 μm	218 μm
D50	100 μm	142 μm	178 μm	135 μm
D10	49 μm	76 μm	92 μm	63 μm
颗粒数量	7385	4702	4614	5936
CoA	1.37%	1.13%	0.18%	3.16%

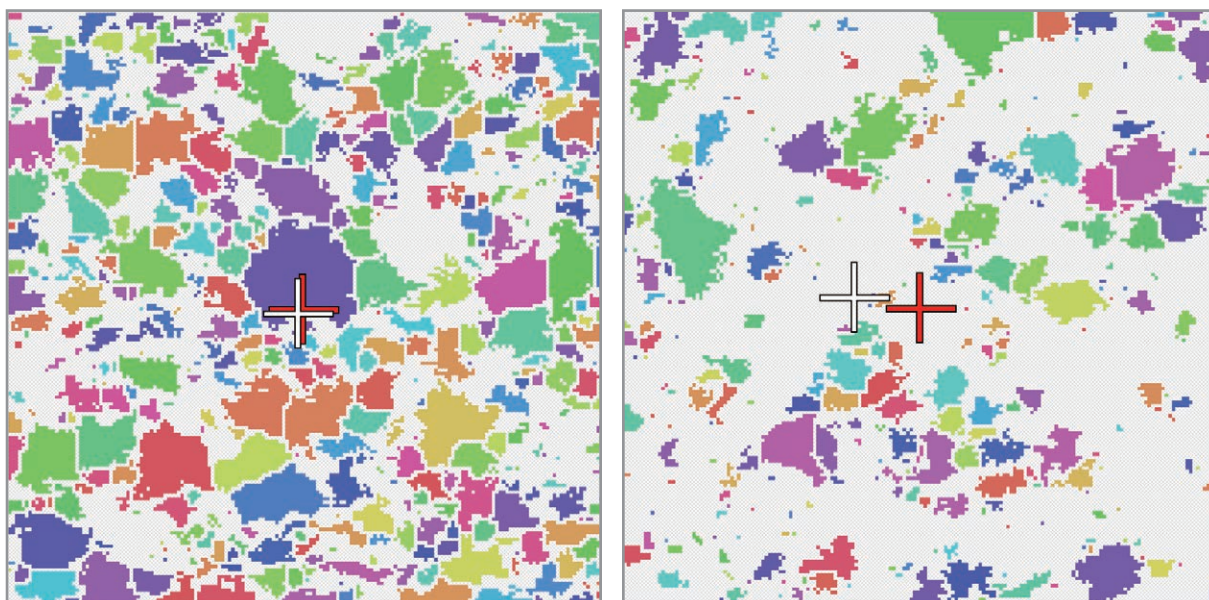
仿制药中乳糖的颗粒尺寸始终小于原研药中乳糖的颗粒尺寸。然而，仿制药中MCC的颗粒尺寸却大于原研药中MCC的颗粒尺寸——虽然MCC的颗粒尺寸差异不如乳糖的颗粒尺寸差异明显。颗粒体积直方图在较大粒径位置的变化性表明：少量非常大的聚集物的体积占总体积的比例很大。

图示数据表明：仿制药与原研药中MCC和乳糖颗粒的分布都是高度分散的；从数量上来说，绝大部分颗粒的粒径介于10 μm – 20 μm 之间（10 μm 是为此特定样本采集图谱设定的最小颗粒尺寸分辨率）。然而，这些颗粒的体积仅占总体积的一小部分。仿制药与原研药中乳糖和MCC颗粒的体积加权D50值均介于100 μm – 200 μm 之间。

原研药中乳糖的颗粒数量直方图以及仿制药中MCC的颗粒数量直方图均显示出一些双峰特征：绝大多数颗粒的粒径介于10 μm – 20 μm 之间；但是，两个图表都在50 μm – 60 μm 之间出现一个次级峰。这表明颗粒可能在加入到片剂混合物中之前进行了筛分，以形成特定的颗粒尺寸分布。

颗粒分布区域中心 (CoA) 是一个成分分布均匀性指标。CoA为0%表示所检测的成分在整个采样区域内均匀分布，所有颗粒分布的区域中心与采样中心重叠。CoA大于0%即表示该成分的分布不均匀，而且很大一部分颗粒的分布偏离采样中心。

仿制药与原研药中乳糖的CoA高度相似，但是MCC的CoA差异明显。从图像上可以清楚地看出为何存在这一差异——与原研药相比，仿制药的网状结构更为密集而且颗粒之间的距离更小。



仿制药（左）与原研药（右）中MCC的CoA放大截图。红色的十字叉表示采样中心，白色的十字叉表示CoA。我们可以看到原研药的CoA偏离采样中心更远。

讨论

原研药的成分	仿制药的成分
API	API
乳糖一水合物	乳糖一水合物
二氧化钛（锐钛矿）	二氧化钛（锐钛矿）
	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)

有趣的是，这两种药片的差别非常大。

从图像可以清楚地看出两种药片中API的分布完全不同。这一点充分展现了拉曼成像技术的神奇 — 即使不知道这两种药片的任何其他信息，我们也可以清楚地看到这两个产品的制造工艺差别很大。

这种API分布差异可能是由于两种药片的混合和压片工艺之间的差异造成的。原研药中API的分布极为分散而且稀疏，然而仿制药中API的分布集中且密集。仿制药中的API分布是比较常见的典型API分布。

原研药可能采用了湿法制粒工艺，将API完全或部分溶解后再结晶，使其在整个制剂中的分布更均匀且分散。

拉曼图像显示仿制药中混合有粒径低至1 μm的API颗粒以及大的聚集物，这很好地展现了拉曼成像技术的灵敏度，而使用其他技术是很难识别这些特征的。仿制药似乎是采用简单的干粉压实工艺制备的，因为其中包含的API未呈颗粒状。

这两种药片中均包含乳糖一水合物、微晶纤维素以及二氧化钛。RA802上有常见赋形剂的拉曼光谱数据库，能够轻松识别上述成分。

令人诧异的是，我们还发现仿制药中含有另外一种成分：聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。

这一点非常出乎我们的意料，因为我们原本以为该仿制药是直接复制原研药的。该仿制药有可能计划进驻原研药尚未进军的市场或者申请505(b)(2)审批。

PVP是一种黏合剂。很可能是因为仿制的多晶型物不够“黏”，因此配方设计师多加了一种黏合剂以提高片剂的稳健性。这只是推测。

虽然可能性很低，但是在某些特殊情况下也存在这样一种可能 — FDA可能会受理包含另外一种赋形剂的仿制药的ANDA申请，前提是仿制药公司有合理的理由采用该赋形剂，而且最终可以证明仿制药在溶出度和生物等效性方面与原研药等效。

结论

RA802能够成功鉴别原研药和仿制药，并加快药物逆向工程分析。

RA802能够识别原研制剂的成分及其相对百分含量、颗粒尺寸和分布，方便仿制药制造商调整工艺，以制造出同等产品或者策略不同的产品。

雷尼绍（上海）贸易有限公司
中国上海市静安区江场三路288号
18幢楼1楼
200436

T +86 21 6180 6416
F +86 21 6180 6418
E shanghai@renishaw.com
www.renishaw.com.cn



雷尼绍拉曼领域的创新者

雷尼绍生产一系列高性能光谱产品，包括采用高速化学成像技术的共焦显微拉曼光谱仪、专用拉曼分析仪、扫描电镜和原子力显微镜接口、光谱仪用固体激光器、以及先进的冷却式CCD探测器。

这些产品为不同的领域和应用提供最高水平的性能、灵敏度和可靠性，满足用户的需求，帮助用户轻松自信地应对最具挑战性的分析难题。

遍布世界各地的子公司及经销商为用户提供优质服务和技术支持。

更多信息请访问 www.renishaw.com.cn/chemicals。

雷尼绍提供各种相关资料。更多信息，请咨询当地的雷尼绍业务代表。



扫描关注雷尼绍官方微信

RENISHAW已尽力确保发布之日此文档的内容准确无误，但对其内容不做任何担保或陈述。RENISHAW不承担任何由本文档中的不准确之处以及无论什么原因所引发的问题的相关责任。

© 2019 Renishaw plc. 版权所有。
Renishaw保留更改产品规格的权利，恕不另行通知。
RENISHAW标识中使用的**RENISHAW**和测头图案为Renishaw plc在英国及其他国家或地区的注册商标。
apply innovation及Renishaw其他产品和技术的名称与标识为Renishaw plc或其子公司的商标。
本文件中使用的任何其他品牌名称和产品名称均为其各自所有者的商品名、商标或注册商标。



WP002-01-A

文档编号：WP002(ZH)-01-A
发布：2019.03