

## 微生物发酵来源化学创新药申请上市药学研究的一般考虑

赵一飞, 刘宗英

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

**[摘要]** 微生物发酵来源化学创新药的生产工艺复杂, 质量控制难度较大。本文参考国内外已发布的化学药品药学研究技术要求, 围绕微生物发酵来源化学创新药的质量控制特点, 探讨该类物质生产工艺、结构确证、质量标准等研究的一般考虑, 为该类药物的研究提供参考。

**[关键词]** 微生物发酵; 创新药; 工艺研究; 质量标准

**[中图分类号]** R95     **[文献标志码]** A     **[文章编号]** 1003-3734(2023)02-0159-04

## General considerations on the chemistry, manufacturing, and control research of fermented new drugs for market authorization

ZHAO Yi-fei, LIU Zong-ying

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

**[Abstract]** The manufacturing process of fermented new drugs is complicated, and the quality control is difficult. Referring to the relevant technical guidances of new drug chemistry, manufacturing, and control research, centering on the quality control characteristics of fermented new drugs, this article discusses the general considerations on the manufacturing process, elucidation of structure, specification research, to provide a reference for the research of fermented new drugs.

**[Key words]** fermentation; new drugs; process development; specification

微生物的初级代谢产物与次级代谢产物结构多样, 部分代谢产物具有独特的药理活性, 可直接作为药物或药物的先导化合物, 是创新药的重要来源之一。2010年以来, 获得批准上市的微生物发酵来源化学创新药包括非达霉素 (fidaxomicin, 2011)、达巴万星 (dalbavancin, 2014)、奥利万星 (oritavancin, 2014)、奥玛环素 (omadacycline, 2018)、可利霉素 (carrimycin, 2019)、拉法姆林 (lefamulin, 2019)、优替德隆 (utidelone, 2021) 等<sup>[1-3]</sup>, 在细菌与真菌感染、恶性肿瘤等治疗领域发挥不可替代的作用。

微生物在生长与繁殖的生命活动中, 伴随着大

量的生物酶催化反应以维持自身的物质与能量代谢, 与化学合成药物相比, 影响微生物发酵工艺的因素众多且复杂, 生产与质量控制存在较大难度。本文结合化学创新药技术审评实践, 从生产工艺、结构确证、质量研究等方面, 探讨微生物发酵来源化学创新药上市申请药学研究的一般考虑。

### 1 生产工艺

微生物按照自身固有的遗传信息, 在特定的培养条件下进行复杂精细的生化反应产生初级代谢产物与次级代谢产物。由于细胞代谢的复杂性, 难以从宏观上对细胞水平的生化反应实施精准调控, 通常通过对菌种种属、培养与发酵工艺条件的控制, 间接实现生化反应的过程控制<sup>[4]</sup>。为保证药品的质量, 建议重点加强菌种的控制、起始原料与生产物料的质量控制、生产工艺过程的控制。

#### 1.1 菌种的控制 发酵产物通过菌种的初级或次

**[作者简介]** 赵一飞, 男, 审评员, 主要从事药品技术审评工作。联系电话: (010)85242796, E-mail: zhaoyf@cde.org.cn。

**[通讯作者]** 刘宗英, 女, 主任药师, 主要从事药品技术审评工作。联系电话: (010)85242865, E-mail: liuzy@cde.org.cn。

级代谢产生,菌种的种属、遗传特性等直接影响发酵产物的杂质水平、含量等关键质量属性,种属鉴定、储存稳定性与传代稳定性是需要重点研究的内容。

用于 GMP 生产的微生物菌种应建立主菌种库和工作菌种库,一般采用形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞壁化学成分分析、16S/26S rRNA 序列分析等方法开展菌种鉴定;如果发酵菌种经过插入基因等分子生物学改造,需对改造后的特定基因序列进行表征,以证明主菌种库与工作菌种库的种属一致<sup>[5]</sup>。

菌种应妥善保存,制定菌种纯度控制要求,研究证明菌种传代稳定;应根据菌种的生理生化特点选择适宜的保存条件,定期进行发酵产物产量以及产物谱分析比对,保证菌种在储存期间的代谢活力持续稳定<sup>[5]</sup>。

**1.2 起始原料的选择与质量控制** ICH Q11 指导原则(原料药的开发和生产)明确了化学药品原料药选择起始原料的具体原则。将微生物发酵产物与化学合成方法相结合制备的半合成原料药,通常从源物质(微生物)开始描述生产工艺;如果能够证明合成工艺中的一个已分离的中间体符合化学合成原料药起始原料的选择原则,在充分研究论证发酵过程对原料药杂质谱的影响,评估并控制来自微生物和其他污染的安全风险的前提下,该中间体可作为起始原料<sup>[6]</sup>。由于微生物发酵工艺复杂,关键工艺参数的微小变化可能导致批间产品质量波动,进一步影响原料药的质量,因此对于半合成原料药而言,通常需将发酵产物的完整制备工艺(包括种子培养、发酵、分离纯化等)纳入原料药生产企业的生产工艺以及质量管理体系;对于结构相对简单(如氨基酸)或生产历史较长、已作为起始原料用于多种原料药的生产工艺的发酵来源物料(如 7-ACA、硫氰酸红霉素),在质量控制满足要求的前提下,可参照 ICH Q11 指定为起始原料。

**1.3 生产物料的控制** 生产物料是影响目标产物质量的关键因素之一,需结合生产物料的来源、制备工艺等分析生产物料质量对产品质量可控性的影响,制定针对性的生产物料内控标准,开展动物来源物料的生物安全性的风险评估与控制;加强生产物料供应商的质量审计,制定合理的贮藏条件与使用期限。

发酵过程通常加入生物合成底物以促进次级代谢产物的形成,底物引入的杂质可能参与微生物代

谢反应产生工艺杂质,需要对底物引入的杂质进行针对性控制,例如:达托霉素发酵工艺中需流加癸酸以引入分子结构中的脂肪链,癸酸中残留的壬酸参与发酵过程产生达托霉素的结构类似物,导致达托霉素纯度下降,因此需要在癸酸的质量标准中控制壬酸的残留<sup>[7]</sup>。

**1.4 生产工艺过程控制** 化学创新药工艺研究与控制具有阶段性特点,伴随着临床试验进展和对原料药工艺研究及认知的逐步丰富,工艺过程控制也逐渐完善。建议围绕原料药目标质量概况(QTPP)与关键质量属性(CQA),参照 ICH Q11 关于原料药开发与过程控制策略的原则,基于发酵与分离纯化工艺特点开展针对性研究,根据研究结果研究确认生产的关键步骤、关键工艺参数控制范围与中间体内控标准,通过工艺验证确认生产工艺的持续稳定。开展工艺验证批次样品与动物安全性试验、临床试验批次样品质量对比研究,证明不同研究阶段产品质量的可衔接性。

## 2 结构确证

对于化学药物的结构确证,总体上参考《化学药物原料药制备和结构确证研究技术指导原则》开展研究。微生物发酵制备的原料药结构较复杂,常含有环肽、长脂肪链、糖苷等结构单元,除了采用常规的红外吸收、紫外吸收、核磁共振、质谱等方法解析结构外,还应当结合原料药的结构特点进行针对性确证,如肽链的氨基酸组成与序列测定、脂肪链的碳原子排列方式、碳碳双键顺反异构等。对于立体结构确证,通常通过单晶 X 射线衍射确证立体结构;如果制备单晶存在困难,可结合原料药结构特点考虑采用手性氨基酸分析、圆二色谱等方法间接确证立体结构<sup>[8-9]</sup>。如果采用已批准上市的发酵来源原料药作为起始原料,且目标产物后续的合成工艺不涉及立体构型的产生或转换,可以不再进行目标产物的立体结构的的确证。

## 3 质量研究与质量标准

建议参照 ICH Q6A 等指导原则开展质量研究。质量标准项目的设置既要有通用性,又要有针对性,能够反映产品质量的变化,重点关注有关物质、效价测定、发酵工艺引入杂质等的研究与控制。

**3.1 有关物质** 微生物发酵制备的化学药物有关物质复杂,分析方法研究应与纯化工艺研究紧密关联,建议结合生产工艺与降解途径分析原料药中的潜在杂质,采用具有代表产品杂质特征的样品(如

纯化前和不同纯化阶段样品、结晶母液、适度降解样品、加速/长期试验样品等)考察不同分离原理色谱方法,对色谱柱填料类型、流动相组成与比例、梯度洗脱程序、检测器、检测波长等进行比较筛选,考察结构与活性成分相近的杂质之间的分离度,优选对杂质分离和检出能力强的有关物质分析方法,同时根据杂质分离与方法重现性的需要合理制定系统适用性要求。

参照 ICH Q2 等指导原则进行有关物质方法验证(包括方法转移验证),方法的专属性应满足杂质的分离检出,方法的检出限、定量限应与杂质控制限度相适应;如果采用相对保留时间对杂质进行定位,需加强方法耐用性考察,考察流动相比例、pH、流速、柱温、色谱柱品牌等检测条件的波动对杂质准确定位的影响,根据研究结果在质量标准中固定相关检测条件以保证杂质准确识别;如果杂质的相对保留时间变化较大,建议使用杂质对照品进行定位。杂质对照品可通过母液分离、定向合成等方法制备,采用 NMR, HPLC-MS 等方法确证结构。

EMA 于 2010 年发布了“Guideline on setting specifications for related impurities in antibiotics”,为国际上首个针对发酵与半合成抗生素杂质限度制定的指导原则,与 ICH Q3A/Q3B 相比,该指导原则明确了半合成抗生素、发酵制备单一组分抗生素、发酵制备多组分抗生素、肽类抗生素原料药与制剂中杂质的报告限、鉴定限和界定限。建议参照该指导原则开展杂质研究,原料药与制剂中超过鉴定限(identification threshold)的杂质需确证结构;其中超过界定限(qualification threshold)的杂质按照特定杂质控制,限度不应高于动物安全性试验支持水平;超过鉴定限但未超过界定限的杂质限度应不高于界定限;如果杂质为药物在动物或人体的重要代谢产物,通常可视为通过了安全界定;未超过鉴定限的单个杂质可按照非特定杂质控制,限度不高于鉴定限<sup>[10]</sup>。

创新药开发过程中,通常伴随产地与生产批量的变化,需注意开展不同研发阶段、不同产地制备样品的杂质对比研究,证明动物安全性试验样品、临床试验样品和工艺验证样品质量的可衔接性。

**3.2 效价测定** 多组分抗生素中不同活性组分的生物活性可能存在差异,效价测定能够反映组分组成/含量与生物活性的关系。效价法与化学分析方法互补,对多组分抗生素质量控制具有重要意义。

多组分抗生素的效价研究应重点关注以下几个方面:结合活性组分的抗菌活性以及量效关系对检验菌、缓冲液 pH 等进行筛选,优选对不同组分具有相似剂量反应的检验菌;标准品与供试品应具备同质性<sup>[11-12]</sup>,选择合理的标准品,准确标定标准品效价;积累临床试验样品效价测定结果,制定合理的效价控制限度。

**3.3 发酵工艺引入杂质的控制** 由发酵工艺中使用的微生物细胞或培养基组分引入并残留在药物中的杂质(如蛋白、核酸、组胺等)可能引起药物不良反应,需加强发酵工艺引入杂质的研究与控制,证明分离纯化工艺可有效去除该类杂质;根据杂质的结构特点选择适宜的检查方法,验证方法的分离检出能力。发酵工艺引入杂质的残留限度应有安全性数据的支持,应结合原料药生产工艺制定杂质的风险控制措施,必要时在质量标准中增加杂质残留的控制<sup>[5]</sup>;对于已有明确限度要求的杂质,其残留限度需符合有关技术要求。

#### 4 稳定性研究

参照 ICH Q1 指导原则开展稳定性研究。考察项目应能反映样品的质量变化情况,根据质量控制需要重点关注性状、晶型、酸碱度、溶液澄清度与颜色、有关物质、水分、含量(或效价)等,分析方法需经过验证,根据研究结果制定储存条件与有效期。

#### 5 总结

药品质量的可控是其安全有效的基础,是通过良好的生产工艺与过程控制实现的。微生物发酵药物的制备工艺复杂,质量控制难度大,需要通过系统而深入的生产工艺和质量研究,建立能够持续生产出预期质量产品的生产工艺与质量控制策略,保证产品质量的稳定可控。

#### [参 考 文 献]

- [1] 王玉丽,张洪兵,刘昌孝,等. 回顾分析:2011-2020 年美国批准上市的抗感染药物[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(1): 1-14.
- [2] 国家药品监督管理局. 2019 年度药品审评报告[EB/OL]. [2022-08-20]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20200731114330106.html>.
- [3] 国家药品监督管理局. 2021 年度药品审评报告[EB/OL]. [2022-08-22]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20220601110541120.html>.
- [4] 刘宗英,马磊. 微生物药物生产工艺研究的基本考虑[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(18): 2090-2093.
- [5] 国家食品药品监督管理局药品认证管理中心. 药品 GMP 指南-原料药[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 282-285.

- [6] ICH Q11. Development and manufacture of drug substances[EB/OL]. [2022 - 09 - 08]. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q11%20Guideline.pdf>.
- [7] 夏兴, 邵东, 孙新强. 达托霉素新杂质及其来源研究[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(5): 574 - 579.
- [8] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药物原料药制备和结构确证研究技术指导原则[EB/OL]. [2022 - 08 - 30]. <https://www.cde.org.cn/zdyyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=93b9f98168d771be1cb5b590ef2e715>.
- [9] ZHOU CC, STONER EJ, KRISTENSEN EW, *et al.* Formation, isolation and characterization of an AB-biaryl atropisomer of oritavancin[J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(47): 10611 - 10618.
- [10] EMA. Guideline on setting specifications for related impurities in antibiotics[EB/OL]. [2022 - 09 - 23]. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/adopted-guideline-setting-specifications-related-impurities-antibiotics\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/adopted-guideline-setting-specifications-related-impurities-antibiotics_en.pdf).
- [11] 胡昌勤, 成双红. 抗生素生物标准品的确定[J]. 中国药事, 2001, 15(4): 263 - 266.
- [12] 韩宁宁, 戴青, 于丽娜, 等. 庆大霉素组分差异对效价测定可靠性测验的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(2): 211 - 215.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-12-21