

## 浅析以体外结合试验作为评价指标的仿制药生物等效性评价方法

刘倩, 南楠\*, 马玲云, 牛剑钊, 许鸣镝

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

**摘要:** 研究美国食品药品监督管理局(FDA)对以体外结合试验作为生物等效性评价指标的仿制药品种, 分析其关键质量属性及生物等效性试验的要求及相关指导原则, 并结合文献数据和FDA审评情况总结了需要关注的问题, 以期为此类产品的开发提供有益的参考, 为我国该类仿制药研发和正在开展的仿制药质量和疗效一致性评价提供技术支持。

**关键词:** 体外结合试验; 磷酸结合剂; 胆酸结合剂; 生物等效性试验; 仿制药质量和疗效一致性评价

**中图分类号:** R969 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2019)12-2377-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.12.016

## Analysis of bioequivalence evaluation method of generic drugs with *in vitro* binding test

LIU Qian, NAN Nan, MA Lingyun, NIU Jianzhao, XU Mingdi

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

**Abstract:** To study the requirements and relevant guiding principles of Food and Drug Administration on the generic drugs with *in vitro* binding test as the bioequivalence evaluation index, and analyze the key quality attributes and bioequivalence test requirements. The bioequivalence guidance issued by FDA and the important considerations of some published articles are summarized. To guide the development and consistency evaluation of these preparations and to have important inspiration of the agreement evaluation of generic drug products in China.

**Key words:** *In vitro* binding test; phosphate binding agent; bile acid binding agent; bioequivalence; consistency evaluation of generic drug products

对于全身吸收并运送到作用部位的药物, 一般通过测量可获得的生物体液如血浆中的药物浓度来评价其生物等效性, 然而对于一些结合磷酸盐或胆汁酸在胃肠道(Gastrointestinal, GI)发挥其治疗效果并且不在血液吸收的药物, 生物等效性的评价较为复杂。临床上使用磷酸盐结合剂是维持磷酸平衡、预防高磷酸盐血症的主要治疗方法, 常用药物有传统的含铝、含钙、含铁、含镁磷结合剂, 以及近年得到临床应用的稀土元素镧制剂等<sup>[1]</sup>。胆酸螯合剂(包括带烷基季铵盐、苄基季铵盐活性基团的阴离子交换树脂等)是一类阴离子交换化合物, 在肠道内与胆汁酸呈不可逆性结合, 阻碍胆汁酸的肠肝循环, 促进胆汁酸从粪便排出, 从而加速胆固醇向胆汁酸的转化, 降低肝内和血浆内胆固醇水平<sup>[2]</sup>。

本文对FDA公布的用药指南以及相关文献资料进行了梳理, 对该类胃肠道局部作用制剂采用的体外结合研究用于评估生物等效性的实验设计和评价要点进行了总结, 同时结合FDA审评的实际情况, 讨论了此类研究需要关注的内容, 旨在为后续此类品种的研究和申报提供有价值的参考。

### 1 生物等效评价方法

胃肠道局部作用的药物口服给药时在胃肠道解离, 与摄取的磷酸盐或胆汁酸结合形成不溶不能被吸收的络合物, 并从粪便中排出。该类药物的生物利用度很低, 因此无法采用传统的药动学终点体内生物等效性方法。FDA对胃肠道局部作用药物推荐了不同的等效性评价策略(表1), 在特定药物生物等效性指南中建议仿制药品申请人可开

收稿日期: 2019-07-23

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2017ZX09101001)

第一作者: 刘倩, 女, 研究员, 主要从事化学药品检验研究。Tel: (010) 67095626 E-mail: liuqian@nifdc.org.cn

\*通信作者: 南楠, 女, 主任药师, 主要从事化学药品检验研究。Tel: (010) 67095204 E-mail: nannan@nifdc.org.cn

表1 FDA收录的磷酸盐/胆酸盐结合剂仿制药品种规格及评价方法

英文名称	中文名称	剂型	规格	生物等效性评价方法
Calcium Acetate	醋酸钙	片/胶囊	667 mg 相当于 169 mg 钙	体外磷酸盐平衡及动力学试验
Cholestyramine	考来烯胺	口服混悬粉末	4 g/袋	体外胆汁酸盐平衡及动力学试验
Colesevelam hydrochloride	考来维仑	片	625 mg	体外胆汁酸盐平衡及动力学试验
		口服混悬粉末	3.75 g/袋	
Colestipol Hydrochloride	盐酸考来替泊	片	1 g/片	体外胆汁酸盐平衡及动力学试验
Ferric Citrate	枸橼酸铁	片	相当于 210 mg 铁离子	体外磷酸盐平衡及动力学试验
Lanthanum carbonate	碳酸镧	口服混悬粉末	1 000 mg	体外磷酸盐平衡及动力学试验,或以临床终点为指标的体内等效性试验
		咀嚼片	1 000 mg	
Sevelamer Carbonate	碳酸司维拉姆	片	800 mg/片	体外磷酸盐平衡及动力学试验
		口服混悬粉末	2.4 g/袋	
Sevelamer Hydrochloride	盐酸司维拉姆	片	800 mg	体外磷酸盐平衡及动力学试验
Sucralfate	蔗糖铝	口服混悬液	1 g/10 mL	BSA 蛋白结合试验、胃蛋白酶结合试验、体外磷酸盐平衡及动力学试验
Sucroferric oxyhydroxide	蔗糖氢氧化铁	咀嚼片	500 mg/片	体外磷酸盐平衡及动力学试验

展:(1)高溶解性物质直接豁免;(2)体外溶出试验和磷酸盐/胆酸盐结合研究,采用不同的pH代表预期通过胃肠道的环境,比较仿制药品和参比制剂;或(3)在健康受试者中采用药效学终点证明生物等效性<sup>[3]</sup>。

## 2 溶出试验

体外溶出试验是检测制造工艺差异的最为灵敏的方法,也是检测磷酸盐/胆汁酸结合剂在局部作用部位有效可用的速率与程度相关差异的最为灵敏的方法。使用相似因子( $f_2$ )比较pH范围内溶出特性的等效性,可以确保仿制药品与参比制剂在溶出特性方面无显著差异。

FDA溶出曲线数据库<sup>[4]</sup>中共收录了12个该品种的溶出方法(表2)。要求采用12个单位受试制剂进行分析,受试制剂和参比制剂(RLD)产品均需进行相应的试验,提供两种制剂单个剂量单位的释放度测定结果、均值、各时间点的释放度范围和CV(%)的数据。根据品种的特性,溶出/崩解方法、实验体积、缓冲液、转速、采样点均有所不同。

以碳酸镧为例,碳酸镧几乎不溶于水。其在碱性pH条件下水溶性低,而在酸性环境中溶解度升高。碳酸镧咀嚼片不含任何崩解剂,有时一些患者可能不会按要求咀嚼而直接将碳酸镧咀嚼片吞服。因此有必要检测整片药剂和碾碎药品的释药过程。为了模拟咀嚼条件,试验中用研钵和研杵将片剂碾压成非常小而均匀的碎片而不是磨成碎末。确定模拟胃肠道环境不同pH条件下的溶出特性非常重要。选用pH为1.2、3.0、4.5、6.8的溶出介质,开展碳

酸镧咀嚼片药物释放研究。由于该药可与磷酸盐结合形成不溶性络合物从而阻碍溶出过程,因此不适用含有磷酸盐的溶出介质可选用醋酸盐和硼酸盐缓冲液。应用经过验证的方法分析所有受试制剂和参比制剂。

## 3 磷酸盐结合研究<sup>[5-9]</sup>

体外磷酸盐结合试验可用于比较仿制药品和参比制剂结合磷酸的速率和程度。通过仿制药品(T)和参比制剂(R)的结合亲和力常数 $k_1$ 的比率和容量结合常数 $k_2$ 的90%置信区间比较结合程度的等效性,可以确保两种药品的非活性成分在结合磷酸盐程度上发挥的作用等效。仿制药品和参比制剂的 $k_2$ 的90%置信区间应落于80%~120%。通过 $f_2$ 比较pH范围内动力学结合特性的等效性,可以确保仿制药和参比制剂在结合速率和特性方面无显著差异。

### 3.1 磷酸盐平衡结合研究

平衡研究用于确定 $k_1$ 常数和 $k_2$ 常数。试验条件应保持时间恒定,而磷酸盐浓度不断变化。恒定时间表示达到结合平衡的时间,由动力学结合研究确定。为达到准确测量的目的,必须选取足够数量的不同浓度的磷酸盐溶液进行实验。因此,从线性结合区域开始沿浓度谱取间隔,直到明确达到最大结合量为止。在恒定温度下,溶液中的磷酸盐分子与药物的结合可以用下述的Langmuir型方程描述:

$$\frac{x}{m} = \frac{k_1 k_2 C_{eq}}{1 + k_1 C_{eq}}; \text{重排后,得到公式 } \frac{C_{eq}}{x/m} = \frac{1}{k_1 k_2} +$$

表2 美国FDA溶出数据库收录的磷酸盐/胆酸盐结合剂溶出方法

Table 2 Dissolution method of phosphate/cholate bond included in FDA dissolution database

药品名称	USP 溶出/ 崩解方法	转速(转· min <sup>-1</sup> )	溶出介质	容积/ mL	推荐采样时间/min
碳酸镧咀嚼片	往复筒法	10	0.25 mol/L HCl	900	10、20、30、45
碳酸司维拉姆片	崩解试验	/	0.1 mol/L HCl	/	/
盐酸司维拉姆胶囊/片	崩解试验	/	0.1 mol/L HCl	/	/
枸橼酸铁片	浆法	100	EDTA 溶液(2.0 g EDTA Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O用纯化水定容至1 000 mL)	900	10、20、30、45、60
醋酸钙胶囊/片	浆法	50	0.1 mol/L HCl, pH4.5 醋酸缓冲液, pH 值6.8 硼酸盐缓冲液	900	5、10、15、20、30
蔗糖氢氧化铁片/咀嚼片	浆法	50	0.1 mol/L HCl	900	10、15、20、30、45、60
盐酸考来维仑片	崩解试验		去离子水、模拟胃液、模拟肠液等多种介质	/	/
硫糖铝片	浆法	75	0.1 mol/L HCl/0.067 mol/L KCl, pH 1.0	900	15、30、45、60, 180, 240、480
硫糖铝口服混悬液	浆法	75	0.1 mol/L HCl/0.067 mol/L KCl, pH 1.0	900	10、20、30、45

$\frac{1}{k_2}C_{eq}$ 。式中： $C_{eq}$ =达到平衡时溶液中剩余的磷酸盐的浓度， $x$ =达到平衡时药品结合的磷酸盐的浓度， $m$ =所用的药品量， $k_1$ =结合亲和力常数，与结合过程中亲和力的量级有关； $k_2$ =Langmuir-容量常数，表示每单位质量药品可结合的磷酸盐的最大表观量。平衡结合试验中，可测得以  $\mu\text{mol}$  为单位的  $C_{eq}$ ；以  $g$  为单位的  $m$  是已知因子；而所加磷酸盐总量减去  $C_{eq}$  即可得到  $x$ 。在直角坐标中以  $C_{eq}/(x/m)$  对  $C_{eq}$  作图可得到一条直线。应用回归分析可得到该直线的斜率( $a$ )和截距( $b$ )。由斜率和截距计算得出  $k_1$  和  $k_2$ ： $k_1=a/b$ ； $k_2=1/a$ 。申请者在申报材料中需要在上述条件下重复实验 12 次，得到 12 组数据，分别对 T 和 R 相关参数的 12 个测定值取平均值+SD，包括：每种磷酸盐浓度下与药物结合的百分比(表格和图表形式)；每种浓度下与药物的磷酸盐的微摩尔浓度(表格和图形式)； $k_1$ ； $k_2$ ；用线性回归法计算  $k_1$  和  $k_2$  时的确定系数  $r^2$ 。

### 3.2 磷酸盐动力学结合试验

动力学结合试验的目的是评价结合速率以及磷酸盐结合溶液的浓度稳定时达到平衡的时间。正常人在低热量无刺激性餐饮条件下，平均胃排空时间约为 30 min，而在高脂肪餐饮条件下，胃排空时间为 3.5 h 左右。正常人小肠驻留时间为 20~30 h。为模拟生理相关环境，应在 pH 1.2~5.0 并在 24 h 温育时间内至少 8 个时间点开展动力学结合研究。一般情况下，每日正常饮食后，可摄入 1 000~1 200 mg 的磷酸盐。假定该磷酸盐混合物的存在形式为： $\text{PO}_4^{3-}$ 、

$\text{HPO}_4^{2-}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  或  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ，那么 250 mL 中 345~1 000 mg 的磷酸盐就等于 14~41 mmol。所以，动力学结合研究中磷酸盐的浓度应在 14~41 mmol。结合到药物上的磷酸盐的量是根据系统中引入磷酸盐的初始浓度和指定时间点滤液中游离磷酸盐的浓度来计算的，在上述条件下重复实验 12 次，得到 12 组数据，分别对 T 和 R 的相关参数的 12 个测定值取平均值+SD，计算磷酸盐与药物在每个时间点结合的百分比(表格和图形式)；每个时间点与药物结合的磷酸盐的微摩尔浓度(表格和图形式)。

### 4 胆汁酸盐结合试验<sup>[10-11]</sup>

体外胆酸盐结合研究是基于胆酸盐结合剂的生理学功能开展的，考来烯胺等阴离子树脂在胃肠道内与胆汁酸结合，形成非吸收性络合物，然后被清除，其临床疗效取决于其与胃肠道内胆汁酸结合的能力。体外通过评价胆酸盐结合剂与胆汁酸钠盐的结合力——包括与甘氨酸(GCA)、甘氨酸鹅氧胆酸(GCDA)和牛磺脱氧胆酸(TDCA)钠盐的结合力，来反映这类药物的临床疗效。

对于硫糖铝这种在临床上用于胃黏膜保护作用的口服制剂，其作用机制之一为在胃酸作用下，硫糖铝能解离为氢氧化铝阳离子和具有高度极性的硫酸蔗糖复合阴离子。其中，硫酸蔗糖阴离子选择性地与蛋白质(主要是白蛋白和纤维蛋白原)或胆汁酸形成大分子复合物，覆盖于溃疡表面，形成一层保护膜，阻止胃酸、胃蛋白酶和胆汁酸对溃疡的渗透，所以该品种也可通过胆汁酸盐结合试验来评价其抗溃疡的临床疗效。

#### 4.1 胆汁酸盐平衡试验

体外平衡研究被认为是评价胆酸盐结合剂关键的生物等效性试验,在温育时间恒定的条件下对受试和参比制剂进行研究,初始胆汁酸钠盐的浓度为变量。应采用至少8种不同浓度的总胆盐,进行酸预处理和不进行酸预处理的条件下,每一种含胆盐的孵育液中应含有不同浓度的甘氨酸胆酸(GCA)、甘氨酸鹅脱氧胆酸(GCDA)和牛磺脱氧胆酸(TDCA)。总胆盐浓度应根据其光谱吸收值变化而设定,直到确定达到最大结合量为止。此外,还应提供数据证明在该时间内,在该总胆盐介质条件下已达到最大结合。基于总胆盐(GCA+GCDA+TDCA)结合平衡试验,参考上述磷酸盐平衡试验的计算方法,确定 $k_1$ 和 $k_2$ ,分别用受试和参比的 $k_1$ 值计算受试/参比制剂的 $k_1$ 比值,计算 $k_2$ 的90%置信区间,可接受标准为80%~120%。

#### 4.2 胆汁酸盐动力学结合试验

动力学结合研究用于支持关键平衡结合研究,是在初始胆汁酸钠盐浓度维持恒定的条件下开展的,为时间函数。试验应在无酸预处理的条件下,选择两个不同浓度的总胆盐介质,至少8个孵育时间点对受试和参比制剂进行研究。试验时间应根据光谱吸收值变化而设定,直到确定达到最大结合量为止。相关的具体试验方法可参考磷酸盐动力学结合试验。

### 5 其他体外试验

#### 5.1 原料药质量关键属性要求

对于原料药是高分子药物的药物如司维拉姆,含铁制剂如枸橼酸铁、蔗糖氢氧化铁等,还需要对T和R的活性成分(API)理化性质进行对比研究。以盐酸考来维仑为例,作为阴离子树脂类胆酸结合剂是一种高分子物质,其合成路线和性质比较特殊,API本身的一致性也需要进行考虑,因此FDA于2015年9月发布了盐酸考来维仑的生物等效性研究指南<sup>[12]</sup>,其中除了对制剂的体外评价做出了要求以外,同时还要求进行API的一致性研究,包括:(1)鼓励申请人采用相同的合成路线来生产API;(2)固体核磁共振检测交联度、检测玻璃化转变温度(T<sub>g</sub>)、烷基化试验等确定T和R的化学结构及分子式的一致性;(3)物理化学性质的一致性:<sup>13</sup>C SSNMR光谱,C、H、N、Cl和Br的元素分析,采用热重分析法检测质子化程度(碳酸盐含量),滴定法测定氯的含量来定量质子化的程度,滴定法测定总可滴定胺,粒径分布、溶胀指数范围等。除此以外,其他一些研究

数据可以提供用于参考,如傅里叶变换红外光谱、拉曼光谱、X射线衍射、差示扫描量热法等。为了更好的表征API的一致性和质量稳定性,至少应对3批参比的API和3批仿制的API进行确证研究。

蔗糖铝的作用机制之一为胃酸解离后的氢氧化铝阳离子中和或吸附胃酸,减弱胃酸对溃疡面的刺激和腐蚀,所以制酸力检查是其制剂的关键质量属性之一。在FDA发布的蔗糖铝混悬液生物等效性研究指南<sup>[13]</sup>中,除了对要求仿制和参比制剂的活性成分一致外,还要求对受试制剂和参比制剂理化特征进行比较,包括pH值、比重、黏度分布、表观黏度随酸度增加的变化情况、再分散性(重新分散的时间、沉降时间和体积)、比较酸中和能力以及铝在pH1.2时的释放等。

#### 5.2 其他体外结合试验

蔗糖铝在酸性条件下,解离出的硫酸蔗糖阴离子选择性地与溃疡面带正电荷的蛋白质渗出物(主要是白蛋白和纤维蛋白原)相结合,形成保护膜促进溃疡愈合;还具有吸附胃蛋白酶和胆汁酸的作用。在FDA发布的蔗糖铝混悬液生物等效性研究指南中,除了上述胆汁酸盐平衡及动力结合实验外,还建议申请者考察酸预处理后仿制制剂和参比制剂与人血清白蛋白(HSA)或牛血清白蛋白(BSA)的平衡结合研究和体外酶(胃蛋白酶)活性研究<sup>[13]</sup>。在白蛋白平衡结合研究中,建议至少使用8种不同浓度的HAS或BSA,如果可能的话,考虑在与体内生理条件相应的条件下进行试验。体外酶(胃蛋白酶)活性研究中,建议至少使用5种不同浓度的受试制剂和参比制剂,基于蔗糖铝对胃蛋白酶活性降低百分比,对仿制制剂和参比制剂进行定性比较。

### 6 FDA审评缺陷总结

FDA仿制药审评部门对自1992年3月至2015年2月受理的11个胃肠道局部作用药品的95个仿制药上市申请进行了分析<sup>[14]</sup>,对递交的以体外结合试验作为生物等效性评价指标的申请材料共归纳总结出712项缺陷。其中,研究期间样本分析(27.8%)、研究前方法验证(17.3%)、数据提交(16.7%)和研究设计(15.7%)这4类缺陷最多。在研究期间的样本分析类别中,未提交完整的原始数据或分析运行被列为最大缺陷(32.8%)。在研究设计类别中,使用不可接受的替代研究设计(26.8%)是最常见的不足。在这个类别中,其他常见的缺陷包括不正确的/数量不足的样品配制浓度,酸预处理后样品试验失败,试验中平行样品数量不足, $k_1$ 和 $k_2$

值计算不正确,剂量或混合样本使用不正确,试验介质pH值不正确等。

目前国内尚无专门以体外结合试验作为评价指标的生物等效性研究指导原则,因此新申请仿制药以及仿制药质量与疗效一致性评价工作中,涉及该类品种生物等效性研究需要更加深入的研讨。本文就国外对于该类品种的关键质量属性和FDA《单项品种的生物等效性指导原则》中的生物等效性体内试验作分析和介绍,希望对我国该类仿制药研发和正在开展的仿制药质量和疗效一致性评价工作的顺利开展提供借鉴和帮助。

#### 参考文献

- [1] 刘永贵,于鹏,吴疆,等. 新型磷结合剂的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(2): 201-205.
- [2] 江文文. 胆汁酸螯合剂类降血脂药研究进展[J]. 中国民康医学, 2015, 27(11): 67-69.
- [3] FDA. Guidance for Industry Bioequivalence Recommendations for Specific Products [EB/OL]. (2011-06-10) [2019-07-10]. <https://www.fda.gov/media/71401/download>.
- [4] FDA, CDER. Guidance for Industry-Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms [EB/OL]. (1997-08-01) [2019-07-10]. <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/dissolution-methods-database>.
- [5] Yang Y S, Shah R B, Yu L X, et al. *In vitro* bioequivalence approach for a locally acting gastrointestinal drug: lanthanum carbonate [J]. Mol Pharmaceutics, 2013, 10(2): 544-550.
- [6] 石靖. FDA对磷结合剂的体外等效性评价要求[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(21): 2588-2592.
- [7] Yang Y S, Mohammad A, Berendt R T, et al. Evaluation of the *in vitro* efficacy of sevelamer hydrochloride and sevelamer carbonate [J]. J Pharm Sci, 2016, 105(2): 864-875.
- [8] Yang Y S, Shah R B, Yu L X, et al. *In vitro* bioequivalence approach for a locally acting gastrointestinal drug: lanthanum carbonate [J]. Mol Pharmaceutics, 2013, 10(2): 544-550.
- [9] FDA. Draft guidance on lanthanum carbonate [EB/OL]. (2017-05-01) [2019-07-10]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/psg/Lanthanum\\_carbonate\\_draft\\_Oral\\_powder\\_RLD\\_204734\\_RC06-15.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Lanthanum_carbonate_draft_Oral_powder_RLD_204734_RC06-15.pdf).
- [10] Krishnaiah Y S R, Yang Y S, Bykadi S, et al. Comparative evaluation of *in vitro* efficacy of colesevelam hydrochloride tablets [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2014, 40(9): 1173-1179.
- [11] FDA. Draft guidance on Cholestyramine [EB/OL]. (2015-06-01) [2019-07-10]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/psg/Cholestyramine\\_oral\\_powder\\_74557\\_and\\_74558\\_RV06-15.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Cholestyramine_oral_powder_74557_and_74558_RV06-15.pdf).
- [12] FDA. Draft guidance on Colesevelam hydrochloride [EB/OL]. (2015-06-01) [2019-07-10]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/psg/Colesevelam\\_hydrochloride\\_oral\\_suspension\\_022362\\_RV01-16.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Colesevelam_hydrochloride_oral_suspension_022362_RV01-16.pdf).
- [13] FDA. Draft guidance on Sucralfate [EB/OL]. (2017-10-01) [2019-07-10]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/psg/Sucralfate\\_oral\\_suspension\\_NDA\\_019183\\_RV08-17.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Sucralfate_oral_suspension_NDA_019183_RV08-17.pdf).
- [14] Lu D M, Vivian D, Ren P, et al. Common deficiencies of *in vitro* binding bioequivalence(BE) studies submitted in abbreviated new drug applications(ANDAs) [J]. AAPS J, 2018, 20(2): 26.