瑞戈非尼片在健康受试者体内的生物等效性研究

吕 朗[1]，程 玲[1]，于文雪[1]，张晶波[1]，罗素平[1]，赵 卉[2]，胡 伟[2]，徐 满[1*]

1. 江西青峰药业有限公司，江西 赣州 341000

2. 安徽医科大学第二附属医院，安徽 合肥 230601

摘 要：目的 考察在空腹、餐后状态下健康受试者口服瑞戈非尼片受试制剂或参比制剂体内瑞戈非尼的血药浓度和药动学参数，评价瑞戈非尼片的生物等效性和安全性。**方法** 采用单中心、单剂量、双制剂、随机、开放、双序列、双周期、自身交叉的试验设计，112例受试者分别在空腹（n=64）或餐后（n=48）口服40 mg的瑞戈非尼受试制剂或参比制剂，并在规定的时间点采集血样。以LC-MS/MS法测定血浆中瑞戈非尼的浓度，Phoenix WinNonlin 8.3软件的非房室模型计算各受试者的药动学参数，SAS 9.4软件进行临床安全性统计分析。**结果** 受试者空腹、餐后单次口服瑞戈非尼受试制剂及参比制剂后，药动学参数C_{max}分别是（599±245）、（569±209），（507±152）、（572±161）ng·mL^{-1}；$AUC_{0\sim t}$分别是（8 688±2 459）、（8 600±2 584），（12 203±3 973）、（13 495±3 910）h·ng·mL^{-1}；$AUC_{0\sim\infty}$分别是（9 107±2 692）、（9 078±2 832），（12 834±4 422）、（14 121±4 391）h·ng·mL^{-1}。两制剂主要药动学参数的几何均值比均在等效范围内。空腹、餐后试验组的不良事件发生率分别是39.06%、41.67%，均未发生严重不良事件。**结论** 瑞戈非尼药时曲线出现二次达峰现象，认为与肝肠循环有关。高脂饮食可提高瑞戈非尼暴露量。受试制剂和参比制剂生物等效，单次服用安全且耐受性良好。

关键词： 瑞戈非尼；药动学；生物等效性；LC-MS/MS；安全性

中图分类号： R969.1 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674-6376（2023）11-2427-05

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.11.020

Bioequivalence of Regorafenib Tablets in healthy subjects

LÜ Lang[1], CHENG Ling[1], YU Wenxue[1], ZHANG Jingbo[1], LUO Suping[1], ZHAO Hui[2], HU Wei[2], XU Man[1]

1. Jiangxi Qingfeng Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Ganzhou 341000, China

2. The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China

Abstract: Objective To investigate the plasma concentrations and pharmacokinetic parameters of regorafenib in human body of healthy subjects taking the test or reference preparation of Regorafenib Tablets under fasting and fed conditions, and evaluate the bioequivalence and safety of two drugs. **Methods** A single center, single dose, two preparations, randomized, open-label, two-sequence, two-cycle, and self-cross trial design was used. Tatolly 112 subjects were given the test or reference reagent of 40 mg Regorafenib Tablets in fasting (n = 64) and fed states (n = 48), respectively. And the vein blood was collected at specified time-points. The concentrations of regorafenib in plasma were determined by LC-MS/MS method. The pharmacokinetic parameters of subjects were calculated by non-compartment model of Phoenix WinNonlin 8.3. And the statistical analyses of clinical safety were evaluated by SAS 9.4 software. **Results** After single oral administration of the test or reference regorafenib in fasting and fed states, subjects' pharmacokinetics parameters were as follows: C_{max} were (599 ± 245), (569 ± 209), (507 ± 152) and (572 ± 161) ng·mL^{-1}. $AUC_{0\sim t}$ were (8 688 ± 2 459), (8 600 ± 2 584), (12 203 ± 3 973) and (13 495 ± 3 910) h·ng·mL^{-1}. $AUC_{0\sim\infty}$ were (9 107 ± 2 692), (9 078 ± 2 832), (12 834 ± 4 422) and (14 121 ± 4 391) h·ng·mL^{-1}. The geometric mean rations of the main pharmacokinetic parameters taking the two drugs were within the bioequivalence range. The incidences of adverse events under the fasting and fed conditions were 39.06% and 41.67%, respectively. There isn't serious adverse event. **Conclusion** There is a secondary peak in the concentration-time curves of regorafenib, which is thought to be related to hepatoenteric circulation. A high-fat diet increases the exposure of regorafenib. The test and reference preparations are bioequivalent, safe and well tolerated at a single dose.

Key words: regorafenib; pharmacokinetics; bioequivalence; LC-MS/MS; safety

收稿日期： 2023-06-06

第一作者： 吕 朗（1978—），男，工程师，硕士，主要从事临床研究。E-mail：lulang@qfyy.com.cn

***通信作者：** 徐 满（1991—），女，助理工程师，本科，主要从事临床研究。E-mail：xuman@qfyy.com.cn

肝癌即发生于肝脏内的恶性肿瘤，目前已成为全球最常见的恶性肿瘤之一。每年因肝癌死亡的患者总数已位居全球因癌症死亡人数的第4位[1]。GLOBOCAN统计报告显示，2020年全球新发肝癌总计905 777例，发病率是9.5/10万。我国新发肝癌为410 038例，约占全球总数的45.3%；发病率较高，达到18.2/10万[2]。男性的发病率高于女性，并且发病率随年龄的增长而逐渐升高。目前治疗的方法包括手术切除、肝移植、局部消融、肝动脉化疗栓塞（TACE）及索拉非尼等药物治疗[3]。由于绝大部分患者在确诊时已处于中晚期，治疗方式的选择较为有限。系统治疗通常与外科治疗或介入治疗联用，用于中晚期肝癌的治疗。目前的系统治疗包括靶向药和免疫药2类。瑞戈非尼片是由德国拜耳（Bayer AG）开发的一种口服小分子、多靶点的酪氨酸激酶抑制剂（TKI），属于靶向药物。通过抑制VEGFR1/2、PDGFR-β、FGFR1和KIT等多种促进癌组织生长的酶，抑制肿瘤细胞增殖及肿瘤血管生成。瑞戈非尼最早在2012年9月于美国上市，用于标准治疗失败的转移性结直肠癌（mCRC）患者。随后获批用于一线标准治疗失败的进展期胃肠道间质瘤和肝细胞癌（HCC）患者。2017年3月，瑞戈非尼在国内上市。国内外指南均对瑞戈非尼的使用进行了推荐，瑞戈非尼成为首个能够显著改善HCC患者总生存期的二线药物，mCRC和胃肠道间质瘤的三线治疗药物。

以往药动学研究显示，单次口服瑞戈非尼160 mg，3～4 h可达到平均血浆峰浓度（约2.5 mg·mL^{-1}）。单剂量给药60 mg或100 mg瑞戈非尼，平均相对生物利用度为69%。与空腹条件下相比，高脂饮食可使瑞戈非尼的暴露量增加48%。瑞戈非尼和人血浆蛋白的体外蛋白结合率是99.5%，主要在肝脏内经CYP3A4代谢。随后大部分经粪便排泄，另有部分经尿液排泄。瑞戈非尼给药后达峰中位时间t_{max}为4 h，预计终末半衰期为20～30 h内；峰浓度（C_{max}）个体内变异系数是27.29%[4]。已上市的瑞戈非尼为每片40 mg，指导原则[5]中指出“对于常释片剂和胶囊，建议采用申报的最高规格进行单次给药的空腹及餐后生物等效性研究”。因此本研究采用单中心、随机、开放、双制剂、双序列、双周期的交叉设计，考察受试者空腹、餐后单次服用40 mg瑞戈非尼片后药动学特点，评价受试制剂和参比制剂的生物等效性和安全性。

1 材料与对象

1.1 仪器与药品

ExionLC液相色谱系统（日本岛津公司）；ESI离子源（加拿大Sciex公司）；Triple Quad 5500+型三重四极杆串联质谱仪（加拿大Sciex公司）。受试制剂：瑞戈非尼片，规格40 mg，批号220401，江西青峰药业有限公司；参比制剂：瑞戈非尼片，商品名：拜万戈，规格40 mg，批号BXJKNJ2，BAYER AG。瑞戈非尼对照品，质量分数96.1%，批号510180-202001，中国食品药品检定研究院。内标瑞戈非尼-^{13}C-d_3对照品，质量分数96.7%，批号1883-025A2，TLC Pharmaceutical Standards。

1.2 研究对象

既往研究[4]显示，空腹及餐后研究中瑞戈非尼C_{max}的个体内变异系数分别是27.29%和20.45%。因此假定双单侧α＝0.05，β＝0.2，空腹和餐后的Intra-CV为27%和21%，把握度为80%，受试制剂和参比制剂几何均值比（GMR）为90%、95%、110%，脱落率为15%，经确切法估算估计例数。最终确定本研究空腹试验入组64例，餐后试验入组48例。参照《药物制剂人体生物利用度和生物等效性试验指导原则》等[5-6]进行受试者筛选。该研究已通过安徽医科大学第二附属医院药物临床试验伦理委员会的审查同意（伦理审查批件编号：YW2022-081），所有受试者已自愿签署知情同意书。

2 方法与结果

2.1 给药和样本采集

本研究采用单中心、单剂量、双制剂、随机、开放、双序列、双周期、自身交叉设计。

受试者于每周期服药前2 d入住药物临床试验研究中心，给药前禁食不禁水至少10 h。空腹试验入组64例受试者，空腹口服受试制剂或参比制剂40 mg；餐后试验入组48例受试者，高脂饮食后口服受试制剂或参比制剂40 mg。两试验均以240 mL温水送服，给药间清洗期均为14 d。

空腹组受试者于给药前0 h及给药后0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、10.0、12.0、24.0、30.0、36.0、48.0、72.0、96.0、120.0、168.0 h采集上肢静脉血，餐后组于给药前0 h及给药后0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0、10.0、12.0、24.0、30.0、36.0、48.0、72.0、96.0、120.0、168.0 h采集上肢静脉血，每次约4 mL。所采集的血样置于含抗凝剂乙二胺四乙酸二钾（K_2EDTA）的采血管中，1.5 h内放入4 ℃离心

机（2～8 ℃，1 700×*g*）离心10 min。分离的血浆分装至检测管和备份管中，其中检测管至少0.8 mL，剩余分装至备份管。采血后2 h内将分装样本转移至−80 ℃超低温冰箱（−60～−90 ℃）保存待测。

2.2 样品处理和数据处理

2.2.1 色谱条件 Luna-PFP（2）色谱柱（50 mm×2.0 mm，3 μm）；KrudKatcher ULTRA HPLC In-Line Filter预柱（0.5 μm Depth Filter×0.004 in ID）；流动相A：含0.2%甲酸和5 mmol·L^{-1}醋酸铵水溶液，流动相B：含0.1%甲酸的乙腈，等度洗脱（60% B，2 min）；体积流量：0.4 mL·min^{-1}；柱温：40 ℃；进样量：3.00 μL；切换阀程序：0～0.5 min，A位（废液流路）；0.5～2 min，B位（质谱流路）。

2.2.2 质谱条件 正离子电喷雾电离（ESI）模式，多反应监测模式（MRM）扫描模式；离子源喷雾电压（IS）：5 500 V；离子源温度（TEM）：550 ℃；去簇电压（DP）：40 V；用于定量分析的离子对瑞戈非尼*m*/*z* 483.0→270.1，瑞戈非尼-^{13}C-d$_3$ *m*/*z* 487.0→274.1。

2.2.3 样品处理 以沉淀蛋白法对样品进行前处理。向96孔板中加入50.0 μL血浆样品、50.0 μL内标溶液（50.0 ng·mL^{-1}的瑞戈非尼-^{13}C-d$_3$溶液）和300 μL含0.1%甲酸的乙腈。涡流10 min，4 ℃、3 900 r·min^{-1}条件下离心10 min。取200 μL上清液到另一干净96孔板中。

2.2.4 数据处理 采用Analyst软件（版本1.7.2）进行色谱图采集和积分，对待测物浓度和响应值（待测物与内标的峰面积比值）进行线性回归，权重因子是1/x^2。

2.3 LC-MS/MS法检测瑞戈非尼的方法学考察[6]

2.3.1 选择性考察 选择6种不同来源的空白正常基质、1种来源的空白高脂基质和1种来源的空白溶血基质，检测其内源性物质对待测物和内标的干扰。干扰最大值为0.2%，认为检测不受基质中其他物质的干扰。

2.3.2 基质效应 选择6种不同来源的空白正常基质、1种来源的空白高脂基质和1种来源的空白溶血基质，使用低浓度及高浓度的质控样品评价基质效应。瑞戈非尼内标归一化基质效应因子均值分别是101.9%和99.9%，基质效应接近，不影响分析物的定量分析。高脂效应的相对偏差分别是−2.7%和−3.1%，溶血效应的相对偏差分别是−1.8%和−3.8%，均符合接受标准。

2.3.3 标准曲线与定量下限 使用空白基质制备瑞戈非尼标准曲线质量浓度分别是5.00、10.0、25.0、75.0、250、500、1 000、1 200 ng·mL^{-1}，对理论质量浓度与响应值进行线性回归，用最小二乘法对标准曲线所有浓度点进行拟合，斜率的平均值为0.018 8（R^2=0.999 3，n=10）。瑞戈非尼线性范围为5.00～1 200 ng·mL^{-1}，定量下限为5.00 ng·mL^{-1}。

2.3.4 准确度与精密度试验 依次配制定量下限、低、次中、中、高质量浓度质控样品，质量浓度分别是5.00、15.0、100、600、900 ng·mL^{-1}。各浓度质控样品的批内、批间精密度最大值（CV）是3.5%，准确度（与理论质量浓度的相对偏差）范围是−1.4%～3.2%，符合标准规定。

2.3.5 稳定性试验 待测物储备液和内标储备液在棕色玻璃瓶中分别室温放置24 h，4℃条件下放置43、65 d；待测物工作液在EP管中分别室温放置21 h，4 ℃条件下放置43 d；内标工作液在透明玻璃瓶中分别室温放置24 h，4℃条件下放置43、65 d；全血样品离心分离前基质中待测物室温放置2 h；血浆样品分别于室温放置24 h，−20 ℃放置42、64 d；制备后样品4 ℃放置97 h；分析批4 ℃放置110 h重新进样均稳定性良好。

2.3.6 提取回收率试验 瑞戈非尼在高、中、低质量浓度下的提取回收率均值分别是100.1%、102.1%、95.6%。内标提取回收率均值是99.6%。

2.3.7 残留试验 批量检测时的残留结果显示待测物残留不大于0.6%，内标无残留，待测物与内标残留可忽略，不影响定量。

2.4 药动学数据及统计学处理

采用Phoenix WinNonlin 8.3软件的非房室模型计算受试者的PK参数，SAS 9.4软件进行临床安全性的统计分析。PK参数经对数转换后进行方差分析，计算90%置信区间以及双单侧t检验。

2.4.1 血药浓度-时间曲线 除空腹组1例受试者在第2周期服药时发生不良事件而退出试验，空腹及餐后组余下受试者均完成试验。受试者在空腹、餐后试验中口服受试制剂和参比制剂后血药浓度-时间曲线见图1。无论空腹或餐后，瑞戈非尼血药浓度均在10 h时出现二次吸收现象。

2.4.2 药动学参数 以非房室模型计算受试者主要药动学参数。空腹试验瑞戈非尼的t_{max}中位数（最小值，最大值）是4.0 h（1.5 h，10.0 h），平均$t_{1/2}$是32.170 h，C_{max}、AUC$_{0\sim t}$及AUC$_{0\sim\infty}$的算数均值分别是599 ng·mL^{-1}、8 688 h·ng·mL^{-1}及9 107 h·ng·mL^{-1}。餐后瑞戈非尼的t_{max}中位数（最小值，最大值）是

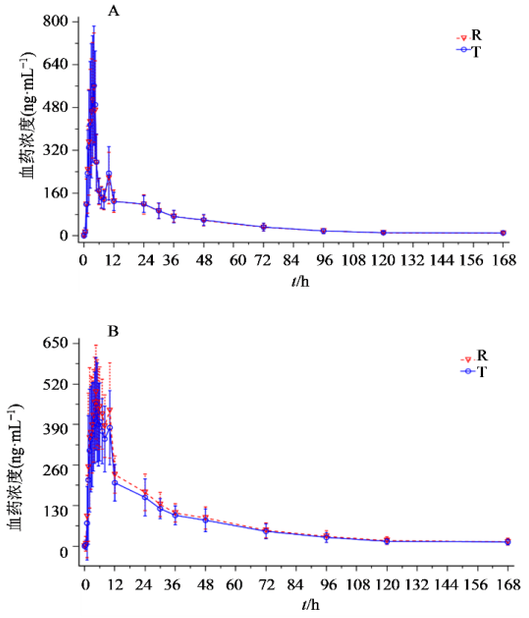

图 1 空腹（A）及餐后（B）状态下口服受试制剂（T）、参比制剂（R）后平均血药浓度-时间曲线

Fig. 1 Mean plasma concentration-time curves of test (T) and reference (R) products in fasting (A) and fed (B) states

4.5 h（1.5 h，10.0 h），平均 $t_{1/2}$ 是 35.858 h，C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 及 $AUC_{0\sim\infty}$ 的算数均值分别是 507 ng·mL^{-1}、12 203 h·ng·mL^{-1} 及 12 834 h·ng·mL^{-1}。高脂饮食后服药，参比和受试制剂瑞戈非尼的暴露量分别升高约 57% 和 40%，t_{max} 延长约 30 min。

2.5 生物等效性评价

文献报道[4]中显示，瑞戈非尼属于低变异性药物；采用平均生物等效性评价方法对受试制剂及参比制剂进行药动学参数比较。空腹条件下 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 及 $AUC_{0\sim\infty}$ 的 GMR（90%CI）分别是 104.35%（96.99%～112.25%）、102.08%（96.71%～107.73%）、101.44%（96.41%～106.73%）；餐后条件下 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 及 $AUC_{0\sim\infty}$ 的 GMR（90%CI）分别是 88.20%（80.89%～96.16%）、89.82%（84.22%～95.78%）、90.61%（84.91%～96.67%）；均完全落入 80.00%～125.00% 内。

空腹及餐后条件下自研的瑞戈非尼仿制药（受试制剂）和原研药（参比制剂）达到生物等效标准，两制剂的吸收速度、吸收程度基本一致，具有生物等效性。

2.6 安全性评价

空腹试验不良事件发生率为 39.06%（25/64），餐后试验不良事件发生率为 41.67%（20/48）。所有不良事件严重程度均为 I 级或 II 级，无非预期的、严重的、与研究药物有关的不良事件发生。两制剂均具有良好的耐受性和安全性。

3 讨论

瑞戈非尼是一种靶向抗癌药物，对于结直肠癌、肝癌及胃肠道间质瘤的治疗均具有重要作用。目前瑞戈非尼片已在欧、美、日等多国上市，具有良好的耐受性和安全性。参照《以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则》[5]，FDA 关于瑞戈非尼片生物等效性试验的指导原则《Draft Guidance on Regorafenib》[7] 以及既往开展的瑞戈非尼生物等效性研究[4]，本研究在中国健康受试者体内开展空腹及餐后服用瑞戈非尼片 40 mg 的生物等效性研究，以验证过的 LC-MS/MS 方法测定给药前后不同时间点人血浆中瑞戈非尼的浓度，该方法在选择性、准确度及精确度等方面均符合生物等效性评价的标准，且操作简单、快速，可为瑞戈非尼的治疗药物监测提供技术支持。

观察空腹和餐后试验瑞戈非尼的药时曲线可知，无论受试或参比制剂，在给药后 10 h 均出现二次吸收现象。推测该现象与瑞戈非尼的代谢途径有关。瑞戈非尼主要在肝脏中经 CYP3A4 介导的氧化代谢和 UGT1A9 介导的葡萄糖醛酸苷化代谢途径进行代谢，其与肝肠循环（EHC）密切相关。代谢过程中未结合的瑞戈非尼或其代谢物被胃肠道中的微生物还原或水解，使药物再吸收从而出现二次吸收峰。

高脂饮食后受试者血浆中瑞戈非尼的暴露量显著升高，而 C_{max} 变化不明显，t_{max} 略有延后。瑞戈非尼的清除速率降低，延长了药物停留在体内的时间。

本研究中发生率大于 2% 的不良反应主要包括胃肠系统、呼吸系统、胸及纵膈疾病等，与原研说明书中不良反应类似，且均为轻症；无严重的不良事件发生。

综上所述，本研究采用单中心、单剂量、双制剂、随机、开放、双序列、双周期、自身交叉的试验设计对空腹及餐后服用瑞戈非尼仿制药和原研药的主要药动学参数进行对比评价，认为两制剂生物等效；对瑞戈非尼片在中国健康受试者中的药动学研究和该药物的应用具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 曹毛毛, 李贺, 孙殿钦, 等. 全球肝癌2020年流行病学现状 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2022, 29(5): 322-328.
Cao M M, Li H, Sun D Q, et al. Global epidemiology of liver cancer in 2020 [J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2022, 29(5): 322-328.

[2] 单天昊, 安澜, 徐梦圆, 等. 2020年全球肝癌和胆囊癌发病死亡分析 [J]. 肝癌电子杂志, 2022, 9(4): 46-51.
Shan T H, An L, Xu M Y, et al. Global liver cancer and gallbladder cancer incidence and mortality in 2020 [J]. Electron J Liver Tumor, 2022, 9(4): 46-51.

[3] Ding X X, Zhu Q G, Zhang S M, et al. Precision medicine for hepatocellular carcinoma: Driver mutations and targeted therapy [J]. Oncotarget, 2017, 8(33): 55715-55730.

[4] Zhang Q, Wang Z Q, Wu J Y, et al. Bioequivalence and pharmacokinetic evaluation of two oral formulations of regorafenib: An open-label, randomised, single-dose, two-period, two-way crossover clinical trial in healthy Chinese volunteers under fasting and fed conditions [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 3277-3288.

[5] 国家药品监督管理局. 以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则 [EB/OL]. (2016-03-18) [2022-03-03]. https://www.nmpa.gov. cn/directory/web/nmpa/xxgk/ggtg/qtggtg/20160318210001725.html.
National Medical Products Administration. Technical guidelines for the study of human bioequivalence of chemical drug genetics with pharmacokinetic parameters as endpoint evaluation indicators [EB/OL]. (2016-03-18) [2022-03-03]. https://www. nmpa. gov. cn/directory/web/nmpa/xxgk/ggtg/qtggtg/20160318210001725.html.

[6] 中国药典 [S]. 四部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020

[7] FDA. Draft Guidance on Regorafenib [S]. 2013.

[责任编辑 刘东博]