

依非韦伦片在中国健康受试者中空腹给药条件下的药代动力学和生物等效性研究

夏玉明^{1,2}, 许 杨³, 马陶陶^{1*}

(1. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032; 2. 安徽贝克生物制药有限公司, 安徽 合肥 230088;
3. 安徽万邦医药科技股份有限公司, 安徽 合肥 230601)

摘要: 采用随机、开放、空腹、单剂量、两序列、两周期、双交叉给药试验设计, 单次口服依非韦伦试验制剂或参比制剂200 mg, 用液相-二级质谱联用法(LC-MS/MS法)测定健康受试者血浆中依非韦伦的药物浓度。使用WinNonLin8.1软件计算依非韦伦主要药理学参数, 并评价生物等效性。试验制剂和参比制剂72 h内主要药理学参数: t_{\max} 分别为 2.574 ± 0.871 和 2.808 ± 0.912 h; C_{\max} 分别为 $1\ 586.732 \pm 424.538$ 和 $1\ 549.518 \pm 366.086$ ng·mL⁻¹; AUC_{0-72h} 分别为 $28\ 464.672 \pm 5\ 682.518$ 和 $27\ 828.826 \pm 5\ 082.487$ h·ng·mL⁻¹; $t_{1/2}$ 分别为 63.524 ± 26.037 和 58.748 ± 20.950 h; λ_z 分别为 0.013 ± 0.006 和 0.013 ± 0.005 h⁻¹。主要生物等效性指标: C_{\max} 的90%置信区间为95.62%~107.15%, 几何均值比为101.22%; AUC_{0-72h} 的90%置信区间为100.43%~104.38%, 几何均值比为102.38%。结果表明, 受试药物和参比药物的主要药代动力学参数相近, 且两种制剂具有生物等效性。本次人体生物等效性临床研究经安徽医科大学第二附属医院药物临床试验伦理委员会核准(伦理批件号: YW2021-110)。

关键词: 依非韦伦片; 中国健康受试者; 空腹; 药代动力学; 生物等效性

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)07-2166-05

Pharmacokinetics and bioequivalence study of efavirenz tablets in healthy Chinese subjects under fasting administration

XIA Yu-ming^{1,2}, XU Yang³, MA Tao-tao^{1*}

(1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Anhui Bio-Pharmaceutical Co., Ltd., Hefei 230088, China; 3. Anhui Wanbang Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Hefei 230601, China)

Abstract: A randomized, open, fasting, single dose, two sequence, two cycle and double cross administration trial design was adopted. Took the test or reference efavirenz tablets of 200 mg orally in a single time. The plasma concentration of efavirenz in healthy subjects was determined by LC-MS/MS. WinNonLin8.1 software was used to calculate the main pharmacokinetic parameters of efavirenz and to evaluate the bioequivalence. The main pharmacokinetic parameters within 72 h: t_{\max} were 2.574 ± 0.871 and 2.808 ± 0.912 h; C_{\max} were $1\ 586.732 \pm 424.538$ and $1\ 549.518 \pm 366.086$ ng·mL⁻¹; AUC_{0-72h} were $28\ 464.672 \pm 5\ 682.518$ and $27\ 828.826 \pm 5\ 082.487$ h·ng·mL⁻¹; $t_{1/2}$ were 63.524 ± 26.037 and 58.748 ± 20.950 h; λ_z were 0.013 ± 0.006 and 0.013 ± 0.005 h⁻¹. The main bioequivalence indicators were as follows: The 90% confidence interval of C_{\max} was 95.62%–107.15%, and the geometric mean ratio was 101.22%; The 90% confidence interval of AUC_{0-72h} was 100.43%–104.38%, and the geometric mean ratio was 102.38%. The results showed that the main pharmacokinetic parameters of the test drug and the reference drug were similar, and the two preparations had bioequivalence. This human bioequivalence clinical study was approved by the drug clinical trials ethics committee of the Second Hospital of Anhui Medical University (ethics approval

No.: YW2021-110).

Key words: efavirenz tablet; healthy Chinese subject; fasting; pharmacokinetic; bioequivalence

依非韦伦是人免疫缺陷病毒-1型(HIV-1)的选择性非核苷反转录酶抑制剂,通过非竞争性结合并抑制HIV-1反转录酶活性,主要作用于模版、引物或三磷酸核苷,兼有小部分竞争性的抑制作用,主要用于艾滋病患者的抗病毒治疗。依非韦伦相关单方制剂最早由美国 Bristol-Myers Squibb 及 Merck Sharp & Dohme Pty. Ltd. 等公司联合研发,原研药物以片剂及口服溶液为主。实际临床应用过程中,远远超过临床治疗剂量的依非韦伦对 HIV-2 反转录酶和人细胞 DNA 多聚酶 α 、 β 、 γ 和 δ 无抑制作用^[1,2]。目前国内依非韦伦制剂是由 Merck Sharp & Dohme (Australia) Pty. Ltd. 进口注册上市,2016 年实现本品原研国产化。

本品国内临床用药过程中,主要以 600 mg 产品为主,但临床专家多次指出国内 HIV 患者应用依非韦伦日剂量 600 mg 过大^[3,4],容易产生耐药性,同时增加本品不良反应发生率,建议本品最佳临床使用日剂量应在 200~400 mg 之间,因此国内市场急需研制出依非韦伦片小规格制剂产品,供国内临床 HIV 患者使用。

材料与方法

药品与仪器 受试制剂:依非韦伦片(规格:200 mg,批号:210701),由安徽贝克生物制药有限公司生产;参比制剂:依非韦伦片(商品名:施多宁,规格:200 mg,批号:T023612),由 MSD K.K 株式会社生产;依非韦伦对照品(批号:101441-202001,含量:99.9%),中国食品药品检定研究院;依非韦伦同位素内标(rac-efavirenz- d_5 ,批号:1866-041A4,化学纯度:94.6%,同位素纯度:99.0%),加拿大 TLC Pharmaceutical Standards。主要仪器:Dionex Ultimate 3000 UHPLC 液相色谱仪(美国 Thermo Scientific 公司);AB API 4000 质谱仪(美国 AB 公司);G-16C/4-16KS 台式高速冷冻离心机(德国 Sartorius 公司);XP6 百万分之一电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)等。

受试者选择 本次人体生物等效性临床研究经安徽医科大学第二附属医院药物临床试验伦理委员会核准(伦理批件号:YW2021-110)后,依据核准临床试验方案开展。所有受试者入组前均需签署知情同意书,并严格按试验方案入/排标准进行筛选。

主要入选标准:① 年龄在 18~60 周岁的男性或女性自愿受试者;② 男性体重不低于 50.0 kg、女性体重不低于 45.0 kg,体重指数(BMI)在 19.0~26.0 kg·m⁻²

范围内;③ 受试者愿意自筛选前 2 周至研究药物最后一次给药后 6 个月内无生育计划;④ 自愿受试者试验前签署知情同意书,并对试验内容、过程及可能出现的不良反应充分了解,自愿参加且能够按照试验要求完成研究。

主要排除标准:① 在筛选期间存在系统疾病者;② 曾有过癫痫病史者;③ 临床上有食物、药物等过敏史,尤其已知对依非韦伦及其辅料中任何成分过敏者;④ 在筛选前 3 个月内接受过手术或者计划在研究期间进行手术者;⑤ 筛选前 3 个月内献血包括成分血或大量失血(≥ 400 mL);⑥ 在筛选前 28 天内使用过任何抑制或诱导肝脏对药物代谢的药物;⑦ 筛选前 2 周内使用过任何处方药、非处方药、中草药和维生素者;⑧ 筛选前 3 个月内参加过其他的药物临床试验或非本人来参加临床试验者;⑨ 其他研究者认为不适宜参加临床试验者。

试验设计 依据美国 FDA《Guidance on Efavirenz》相关信息^[5]及原研产品说明书信息^[2],明确本品与食物同时服用会增加其暴露,并增加不良反应的发生,因此本品仅需开展单剂量空腹生物等效性试验。参考 2020 版中国药典中《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》等法规及相关文献^[6]要求,本次试验拟采用:空腹、随机、开放、单剂量、两序列、两周期、双交叉生物等效性试验设计,计划入组 36 例健康受试者,男女比例适中。受试者入组后随机分为两组,每组 18 人,每周期给药一次,给药剂量 200 mg,试验清洗期为 35 天。

血样采集及预处理 入组受试者在给药前 2 天入住规定 GCP 病房,进行饮食控制管理,并于次日早晨按照试验随机表,在空腹给药条件下用 240 mL 水送服受试制剂 1 片或参比制剂 1 片(剂量 200 mg)。分别于给药前(给药前 1.00 h 内)及给药后 0.50、1.00、1.33、1.67、2.00、2.33、2.67、3.00、3.33、3.67、4.00、4.50、5.00、5.50、6.00、7.00、8.00、10.00、12.00、24.00、48.00 和 72.00 h 采集静脉血约 4 mL,分别注入含 K₂EDTA 抗凝剂的真空采血管置于冰水浴中。采集后的受试者全血样本要求 1 h 内置于低温离心机(设置:温度 4 °C,离心力 2 500 $\times g$)离心 10 min,冰水浴条件下,取离心后的上清血浆加入到检测管中。2 h 内需要将血浆样本置于 -90 °C~-60 °C 超低温冰箱保存,直至生物样本检测使用。

色谱条件 色谱柱: Welch Ultimate XB-C18 (100 mm × 2.1 mm, 5 μm); 流动相 A: 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵; 流动相 B: 乙腈, 总流速为 0.400 mL·min⁻¹; 柱温: 40 °C, 进样器温度为 4 °C; 进样量: 5 μL。

质谱条件 ESI 离子源, 多反应监测 (MRM) 扫描模式。

血浆样品处理 在 96 孔板的孔中加入 50 μL 室温下解冻的样品或新配制的样品 (标准曲线, 质控样品, 系统适用性样品或待测生物样品, 对于双空白样品或者零点样品, 加入空白基质样品 50 μL); 对于双空白样品或 ULOQ Without IS 样品, 加入 50% 甲醇溶液 50 μL, 对于其他样品加入内标工作液 (500.000 ng·mL⁻¹) 50 μL, 涡旋混匀。每一个样品孔中加入乙腈 200 μL, 封板, 混匀 10 min, 样品在 4 °C, 2 623 ×g 离心 10 min。取离心后上清液 100 μL 至另一 96 孔收集板中, 加入 50% 甲醇溶液 200 μL, 封板, 混匀, 样品在 4 °C, 2 623 ×g 离心 10 min, 进样检测^[7-10]。

统计学处理 待测物 (依非韦伦) 和内标物 (依非韦伦-*d*₅) 的色谱图采集和色谱峰面积由 Analyst 1.6.3 软件进行采集并处理, 再将其峰面积导入 Watson LIMS 7.6 SP1 进行回归计算, 以待测物与内标物的峰面积比标准曲线中待测物的理论浓度进行最小二乘法线性回归计算, 以所得回归方程 $y = ax + b$ 计算样品中待测物的实测浓度。

结果

1 方法学验证

1.1 选择性 分别精密移取 6 个不同来源的空白正常基质、1 个来源的空白高脂基质、1 个来源的空白溶血基质, 按“血浆样品处理”项下方法进行样品处理, 结果显示, 依非韦伦和依非韦伦-*d*₅ 色谱峰形均良好, 不同来源的空白基质对分析物和内标的检测无明显干扰, 不影响定量分析, 内标与分析物之间也互相不干扰。其典型色谱图如图 1 所示。

1.2 标准曲线 按“血浆样品处理”项下方法处理进样分析, 依非韦伦标准曲线血浆样品中质量浓度分别为 20.0、40.0、120、300、600、1 200、2 400 和 3 000 ng·mL⁻¹, 得到依非韦伦的回归方程为 $y = 0.001\ 30x - 0.002\ 65$ ($r = 0.997\ 5$)。最终得出依非韦伦在 20.0~3 000 ng·mL⁻¹ 内标准曲线较好, 其定量下限为 20.0 ng·mL⁻¹。

1.3 精密度和准确度 配制定量下限 (LLOQ)、低 (LQC)、中 1 (M1QC)、中 2 (M2QC) 和高 (HQC) 五个质量浓度水平的质量控制 (QC) 样品, 依非韦伦的质量浓度分别为 20.0、60.0、200、1 000 和 2 250 ng·mL⁻¹, 按血浆样品处理项下方法处理进样分析。结果显示依非

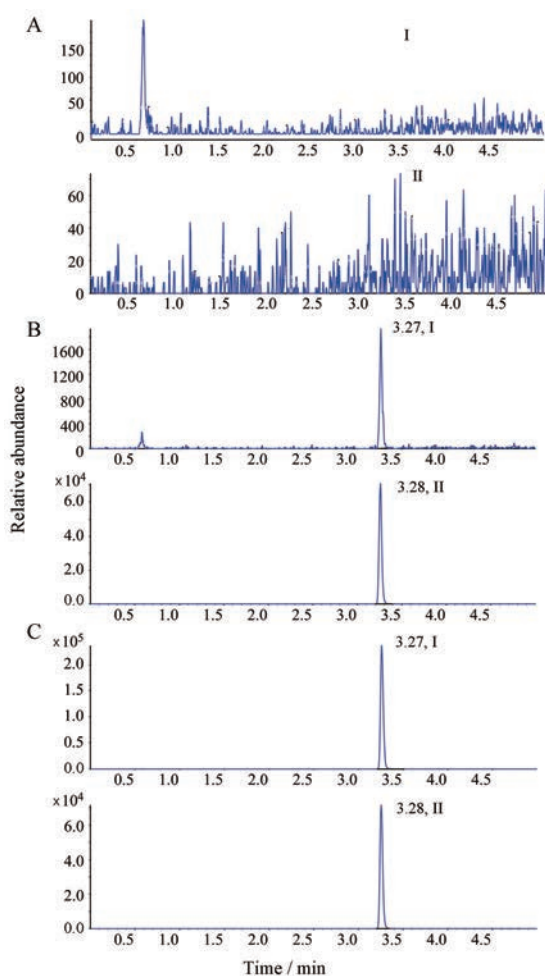


Figure 1 Typical LC-MS/MS chromatograms of efavirenz, efavirenz-*d*₅ (IS). A: Human blank plasma; B: LLOQ (400 ng·mL⁻¹) sample spiked with IS (500 ng·mL⁻¹); C: 2 h human plasma sample spiked with IS (500 ng·mL⁻¹) after an oral administration at dose of 200 mg efavirenz. Peaks I and II refer to efavirenz, efavirenz-*d*₅ respectively

韦伦 LQC、M1QC、M2QC 和 HQC 样品的准确度均在 95.7%~105.1% 内, 依非韦伦 LLOQ 样品批间准确度为 105.0%, 批内、批间精密性 (CV%) 均小于 5.2%, 说明该方法重复性较好。

1.4 提取回收率和基质效应 使用 6 个不同来源的空白正常基质、1 个来源的空白高脂基质、1 个来源的空白溶血基质, 按“血浆样品处理”项下方法进行基质样品处理, 然后分别加入低、中、高相同质量浓度水平分析物和内标混合工作液, 配制成基质效应考察的基质样品。结果显示, 所有不同来源的基质样品中依非韦伦的内标归一化基质效应因子的相对标准偏差均不超过 4.0%, 说明不影响准确测定。

用混合空白正常基质配制成低、中、高质量浓度水平样品, 按“血浆样品处理”项下方法进行处理。结果

显示依非韦伦 LQC 浓度水平的提取回收率平均值为 99.3%, MQC 浓度水平的提取回收率平均值为 105.1%, HQC 浓度水平的提取回收率平均值为 101.4%, 内标 (EFV- d_3) 提取回收率平均值为 101.6%。依非韦伦及 EFV- d_3 在基质样品中的提取回收率均满足生物样品分析要求。

1.5 基质中稳定性 配制 LQC、HQC 两个质量浓度水平的稳定性 QC 样品考察血浆中依非韦伦的稳定性, 分别在零时和不同考察条件下放置后进行评价。结果表明, 依非韦伦每一浓度水平稳定性 QC 样品的均值均在标示浓度的 $\pm 15.0\%$ 范围内, CV% 均小于 10.0%, 在各种考察环境下稳定性均较好。

1.6 其他 另外考察了交叉干扰、残留效应、溶血效应、高脂效应、稀释可靠性、分析批最大进样针数, 其结果均符合 2020 版中国药典中《生物样品定量分析方法验证指导原则》的相关要求。

综上所述, 拟定液相色谱串联质谱法测定健康人 K_2 EDTA 血浆中依非韦伦的分析方法符合 2020 版中国药典中《生物样品定量分析方法验证指导原则》的相关要求, 可用于本次临床试验血浆样品的分析。

2 生物样本检测

本次试验共随机化入组 36 例受试者, 最终有 35 例受试者分别单次完成了口服依非韦伦受试药物或参比药物, 纳入本次试验药代动力学参数集 (pharmacokinetics parameter set, PKPS) 及生物等效性集 (bioequivalence set, BES) 进行统计分析。

35 例健康受试者空腹状态下, 单次口服依非韦伦受试药物或参比药物后, 平均血药浓度-时间曲线结果见图 2。

3 药代动力学参数研究

35 例健康受试者空腹状态下单次口服依非韦伦片受试药物及参比药物后, 药代动力学参数统计分析结果见表 1 所示。

Table 1 The main pharmacokinetic parameters. $n = 35, \bar{x} \pm s$

Parameter	Mean \pm SD (% CV)	
	Reference preparation (R)	Test preparation (T)
t_{max}/h	2.808 \pm 0.912 (32.5)	2.574 \pm 0.871 (33.8)
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	1 549.518 \pm 366.086 (23.6)	1 586.732 \pm 424.538 (26.8)
$AUC_{0-72h}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	27 828.826 \pm 5 082.487 (18.3)	28 464.672 \pm 5 682.518 (20.0)
λ_z/h^{-1}	0.013 \pm 0.005 (34.1)	0.013 \pm 0.006 (45.8)
$t_{1/2}/h$	58.748 \pm 20.950 (35.7)	63.524 \pm 26.037 (41.0)

Table 2 Statistical results of bioequivalence ($n = 35$)

Parameter	Geometric mean ratio			Intra subject variation	90% Confidence interval	Power of test (1- β)
	T	R	T/R			
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	1 535.32	1 516.78	101.22%	14.0%	95.62%–107.15%	0.999 996
$AUC_{0-72h}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	28 100.30	27 446.13	102.38%	4.7%	100.43%–104.38%	1

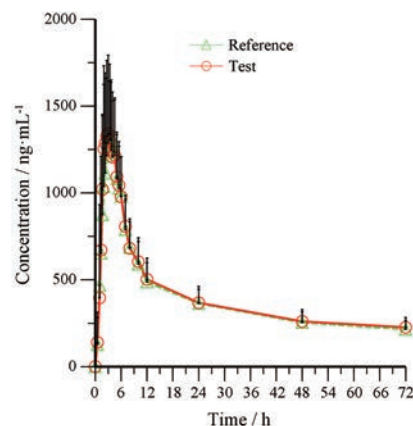


Figure 2 Curve of average plasma concentration-time of efavirenz in 35 subjects after oral administration of reference preparation and test preparation under fasting conditions

结果显示, 受试药物与参比药物主要药代动力学参数基本一致, 且与原研产品说明书^[2]药代动力学参数信息基本一致。

4 生物等效性评价

35 例健康受试者空腹状态下单次口服依非韦伦片受试药物及参比药物后, 生物等效性分析结果如下表 2 所示。

结果显示, 受试药物与参比药物在本次空腹给药条件下具有生物等效性。

讨论

试验实施过程中, 为确保试验科学性及其合理性, 考虑到依非韦伦属于低溶解性低渗透性的化合物, 食物会增加其机体暴露量, 并增加不良反应的发生率^[2], 为有效降低受试者机体基线代谢水平对药物代谢影响, 确保受试者两周期药物代谢机能基本一致, 与其他同类药物生物等效性研究比较^[11], 本试验采用了服药前 2 天入住 GCP 病房, 进行统一饮食控制管理, 确保了试验结果的真实性与准确性。

本次试验最终入选 36 例男女健康志愿受试者, 试验过程中共有 12 例受试者发生 19 例次不良事件, 不良事件严重程度均为 I 级轻度, 无严重不良事件发生, 经统计分析确认: 受试者在空腹给药条件下, 单次口服受试制剂或参比制剂 200 mg 后, 其临床安全性良好, 表明受试制剂与参比制剂临床用药安全性相近。

从依非韦伦 90% 置信区间结果可以看出, 空腹给药条件下依非韦伦 C_{\max} 、 AUC_{0-72h} 的 90% 置信区间和几何均值比值 (受试制剂/参比制剂) 的统计结果均在 80.00%~125.00% 内^[12]。 C_{\max} 的 90% 置信区间为 95.62%~107.15%, 几何均值比为 101.22%; AUC_{0-72h} 的 90% 置信区间为 100.43%~104.38%, 几何均值比为 102.38%, 经双单侧 t 检验分析后 P 值均小于 0.05, 则拒绝 H_0 接受 H_1 , 即两制剂在本次空腹条件下依非韦伦具有生物等效性, 故受试制剂和参比制剂在空腹给药条件下具有生物等效性。

致谢: 安徽医科大学第二附属医院对本次试验给予的支持。

作者贡献: 夏玉明主要参与项目试验设计等各项工作, 是本次临床研究项目负责人, 对本文各项试验结果进行审核确认; 许杨主要负责试验生物样本分析, 并参与本文数据审核与确认; 马陶陶对本次试验技术和本文撰写进行技术指导。

利益冲突: 本次临床试验内容与任何机构和个人均无利益冲突。

References

- [1] Li YQ, Shang DW, Wen YG, et al. Population pharmacokinetics of efavirenz in Chinese acquired immune deficiency syndrome patients [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2020, 36: 833-837.
- [2] U. S. Food and Drug Administration. SUSTIVA (efavirenz) tablets for oral use [DB/OL]. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs. 2019-10-29. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/020972s057,021360s0451b1.pdf.
- [3] Li H, Cao YQ, Cheng YG, et al. Overview on current development of the dose of efavirenz (400 mg) in treating HIV [J]. Chin J Aids STD (中国艾滋病性病), 2021, 8: 903-906.
- [4] Peng WX, Fu Q, Du XL, et al. Effects of HBV and HCV co-infection on plasma concentration, efficacy and hepatotoxicity of efavirenz in HIV/AIDS patients [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2019, 14: 1162-1168.
- [5] U.S. Food and Drug Administration. Guidance on efavirenz [S]. Product-Specific Guidances for Generic Drug Development: 2008-05. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Efavirenz_tab_21360_RC11-06.pdf.
- [6] National Medical Products Administration. Guidelines for general considerations in clinical trials of medicines [EB/OL]. Annex to Announcement No. 11, 2017-01-20. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/ggtg/qtggtg/20170120160701190.html>.
- [7] Kumar VR, Reddy BP, Kumar BR, et al. High throughput LC-MS/MS method for simultaneous determination of zidovudine, lamivudine and nevirapine in human plasma [J]. J Chromatogr B, 2013, 921-922: 9-14.
- [8] Bedor DCG, Souza Filho JHD, Ramos VLS, et al. A sensitive and robust LC-MS/MS method with monolithic column and electrospray ionization for the quantitation of efavirenz in human plasma: application to a bioequivalence study [J]. Quim Nova, 2011, 34: 950-955.
- [9] Li Z, Ding CG, Zhou Q, et al. Determination of efavirenz in human plasma by LC-MS/MS and bioequivalence in human body [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2015, 46: 1323-1326.
- [10] Yu SD. Preclinical Pharmacokinetics Study of a Novel Anti-HIV Drug Combination Using HPLC-MS/MS Method (基于高效能 LC-MS/MS 分析的新型抗艾滋病复方药物的临床前药代动力学研究) [D]. Shanghai: Naval Medical University, 2018.
- [11] Zhang XQ, Zhang JD, Zhao P, et al. Bioequivalence of tenofovir disoproxil fumarate tablets in human under fasting and fed conditions [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2015, 46: 180-185.
- [12] National Medical Products Administration. Statistical guidelines for bioequivalence studies [EB/OL]. Annex 1 to Announcement No. 103, 2018-10-17. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20181029173101911.html>.