·新药注册与审评技术·

碳酸镧咀嚼片体外磷结合试验的一般考虑

张　丹,马婧怡,李　敏,刘淑洁,高丽丽,翟颖奇,杨进波
(国家药品监督管理局药品审评中心,北京 100022)

[摘要]　碳酸镧咀嚼片于2004年由美国FDA批准上市,作为一种磷结合剂用于降低终末期肾病患者血清磷酸盐。碳酸镧是胃肠道(GI)局部作用药物,口服吸收率非常低,不适合采用常规的体内药动学(PK)终点方法评价生物等效性。FDA认为,体外溶出试验和磷酸盐结合研究可用于证明碳酸镧生物等效性。本文在FDA个药指南和文献资料基础上,从方法学、实验设计、数据分析等方面对碳酸镧咀嚼片体外磷结合研究进行探讨,旨在为相关仿制药的研究提供参考。

[关键词]　碳酸镧咀嚼片;生物等效性;磷结合;仿制药
[中图分类号]　R95　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003-3734(2021)02-0110-04

Considerations on *in vitro* phosphate binding experiments for lanthanum carbonate chewable tablets

ZANG Dan, MA Jing-yi, LI Min, LIU Shu-jie, GAO Li-li, ZHAI Ying-qi, YANG Jin-bo
(*Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing* 100022, *China*)

[**Abstract**]　Lanthanum carbonate chewable tablets were approved as a phosphate binder indicated to reduce serum phosphate in patients with end stage renal disease by the US FDA in the year of 2004. Lanthanum carbonate is a gastrointestinal (GI) tract locally acting drug. The oral absorption of lanthanum carbonate is very low, so the conventional *in vivo* bioequivalence study with a pharmacokinetic (PK) endpoint is not feasible. The FDA recommended *in vitro* dissolution testing and phosphate binding studies to demonstrate bioequivalence of lanthanum carbonate preparations. Based on the literatures and guidance issued by FDA, this article discussed the *in vitro* phosphate binding research of lanthanum carbonate chewable tablets from the aspects of methodology, experimental design and data analysis, hoping to provide references for the development of the generic drugs.

[**Key words**]　lanthanum carbonate chewable tablets; bioequivalence; phosphate binding; generic drugs

碳酸镧(lanthanum carbonate)是一种磷酸盐结合剂,用于降低终末期肾病患者血清磷酸盐。碳酸镧先在胃酸中生成水溶性氧化镧,再与食物中的磷酸根进行交换生成不溶于水的磷酸镧沉淀,而达到减少食物中磷酸根吸收、降低血中磷酸盐浓度的目的。

碳酸镧咀嚼片由Shire公司开发,2004年由美国FDA批准上市,最初国外上市产品规格有250,500,750和1 000 mg(皆以镧计)4种规格,随后250 mg规格退市。2012年碳酸镧咀嚼片获准进口中国,共有500,750和1 000 mg 3种规格。本品应与食物同服或餐后立即服用,在血磷浓度监测基础上调整用量。

碳酸镧为胃肠道局部用药,口服吸收率非常低,生物利用度小于0.002%,不宜采用常规的体内药动学(PK)终点方法评价生物等效性[1]。对于一些胃肠道局部用药物的生物等效性研究,EMA认为作用机制为与胃肠道成分结合的产品(如消胆胺、考来替泊、醋酸钙、司维拉姆),体外研究(如体外平衡

[基金项目]　国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2017ZX09101001)
[作者简介]　张丹,女,硕士,助理研究员,主要从事临床药理相关技术审评工作。联系电话:(010)85243576,E-mail:zhangd@cde.org.cn。
[通讯作者]　杨进波,男,博士,主任药师,主要从事统计与临床药理相关技术审评工作。联系电话:(010)85243210,E-mail:yangjb@cde.org.cn。

试验、结合试验）可考虑作为有效性评价的替代方法[2]。FDA 建议在有适用依据的情况下，可通过反映药物作用机制的体外生物等效性研究来评价其生物等效性，因为体外试验变异性低、易于控制，更易于发现药品之间的差异[3]。根据美国 FDA 发布的个药指南[4]，碳酸镧咀嚼片可以采取体外溶出和磷结合研究或体内药效学研究的方式证明生物等效性。我国目前尚无明确的相关技术指南，行业对碳酸镧仿制药开发及一致性评价中的体外生物等效性研究存在诸多困惑，如：研究前的方法学验证、试验设计以及申报资料中的数据提交等均存在问题。本文在 FDA 个药指南[1]及相关文献资料[2-3]的基础上，结合审评实际情况，对碳酸镧咀嚼片体外磷动力学结合研究和平衡结合研究进行探讨，旨在为后续同类产品的研究提供参考。

1 碳酸镧咀嚼片体外磷结合研究设计要点

1.1 分析方法及方法学验证

体外生物等效性研究应当使用经完整验证的分析方法。Samy 等[6]采用离子色谱法对溶液中磷浓度进行测定，该方法具有较高的灵敏度和选择性，可为探索磷结合研究中未结合的磷酸盐浓度检测方法提供参考。如采用其他方法，应证明其方法的适用性。

分析方法验证的主要目的是证明特定方法对于测定分析物浓度的可靠性。应当对方法的系统适用性进行考察，并对方法的选择性、定量下限、响应函数和校正范围（标准曲线性能）、准确度、精密度、分析物在存储和处理全过程中的稳定性等条件进行验证，并根据具体分析方法对稀释可靠性、过滤吸附、耐用性等进行考察。需注意不同 pH 值条件下样品的分析方法都应经过验证，标准曲线和质控样品应与实际样品的基质、处理过程一致，标准曲线范围应尽量覆盖实际样品浓度范围。方法学验证建议参考《中华人民共和国药典》通则《药品质量标准分析方法验证指导原则》和《生物样品定量分析方法验证指导原则》。

1.2 体外磷结合研究

体外磷结合研究可用于比较仿制药和参比制剂结合磷酸盐的速率和程度。通过相似因子（f_2）比较 pH 范围内动力学结合特性的等效性，可以确保碳酸镧仿制药和参比制剂在结合速率和特性方面无显著差异。通过仿制药和参比制剂 k_1 的比值和 k_2 的 90% 置信区间比较结合程度的等效性，可以确保 2 种药品在结合磷酸盐程度上发挥的作用等效[3]。

1.2.1 磷动力学结合研究

1.2.1.1 研究目的　主要目的是评估结合速率以及达到结合平衡的时间，进而为磷平衡结合研究的孵育时长提供依据。

1.2.1.2 试验设计　对于动力学试验，应使用压碎的碳酸镧咀嚼片，在以下 3 种浓度的磷酸盐溶液中进行考察：磷平衡结合试验中相应的最低和最高浓度，以及约 50% 最高浓度的中浓度溶液。该研究应分别在 pH 1.2，3.0，5.0 下进行，最终溶液体积为 250 mL。在 24 h 内至少选择 8 个时间点检测镧-磷结合情况。所有孵育应在 37 ℃ 条件下持续轻微摇动，此过程需监测并进一步调节 pH 值，同时应注意在每个时间点取样后补液。每个试验条件下的研究应重复 12 次。

1.2.1.3 相关问题的考虑　① 制剂状态：咀嚼片在进行研究时，应模拟人的咀嚼特点选择合适的片剂粉碎方式，可使用研钵和研杵将片剂轻压成适当的碎颗粒，但不研磨。同时建议考虑部分患者直接吞服的习惯，进行整片的研究。

② pH 的选择：碳酸镧在介质中溶解的速率主要取决于溶解度、pH、碳酸镧的量、搅拌速度和温度。镧离子释放存在 pH 依赖性，不同 pH 对磷结合的速度和程度均存在影响。通常，在禁食条件下，胃肠道的 pH 范围在胃中为 1.0～2.5，在十二指肠中为 4.9～6.4。为减少磷酸盐的吸收，碳酸镧必须与食物混合，并在被小肠吸收之前沉淀或吸附磷酸盐。因此，碳酸镧应与食物一起或在食物后立即服用，以确保与膳食磷酸盐充分接触和混合。食物磷酸盐和碳酸镧咀嚼片的混合可以发生在胃和上部小肠中，因此应结合生理状态，考察磷酸盐在 1.2～5.0 的 pH 条件下与碳酸镧的结合。

磷酸在溶液中以不同的形式存在，包括 H_3PO_4，$H_2PO_4^-$，HPO_4^{2-}，PO_4^{3-}，不同 pH 条件下，不同酸根的形式比例不同，可能导致与 API 的结合差异，在进行磷结合力考察以及最大平衡浓度筛选时应予以充分的关注[7]。因此，在试验过程中，应随时监测并调整 pH，以保持 pH 稳定。

③ 磷酸盐浓度的选择：高、低浓度应选择磷平衡结合试验中相应的最高和最低浓度，最高浓度应达到最大的磷酸盐结合区间（即达到平台期）。一般情况下，碳酸镧咀嚼片在高、中、低浓度磷酸盐溶液的最大结合量不同，最大结合量随着磷酸盐浓度

的增加而增加,当磷酸盐达到一定浓度时最大结合量不再增加,此浓度为磷酸盐的最高浓度。

④ 考察时间的选择:对于正常受试者,低热量餐的平均胃排空时间(80% 内容物)约为 30 min,高脂液体餐平均约 3.5 h。由于受到诸多因素的影响,食物在正常受试者的肠道停留时间从 20 ~ 30 h 不等。动力学结合研究时间点的选择可模拟生理相关情况,至少选择 8 个时间点,但应注意,根据后几个时间点的镧-磷结合量应可判断是否已达结合平衡。

1.2.1.4 数据分析 根据引入实验体系的磷酸盐的初始浓度以及指定时间点时溶液中未结合的磷酸盐浓度,计算出每一时间点结合的磷酸盐的量。采用相似因子(f_2)法对受试制剂和参比制剂在一定范围磷酸盐浓度和 pH 条件下的镧-磷结合相似性进行比较。当 f_2 值低于 50 时应分析原因。

1.2.2 磷平衡结合研究

1.2.2.1 研究目的 通过测定产品在不同磷酸盐浓度下的最大结合量,根据 Langmuir-type 方程计算亲和力常数(k_1)和结合能力常数(k_2),从而对生物等效性进行判定。

1.2.2.2 实验设计 具体步骤为:① 取规格为 1 000 mg 的碳酸镧咀嚼片 1 片,整片或碎片置于 0.1 mol·L^{-1} HCl(pH 1.2)介质中直至完全溶解。② 调节至目标 pH 值(1.2,3.0 或 5.0)。③ 等待至少 1 h 以保证 pH 达稳。④ 加入磷酸盐溶液至不同的终浓度,最终反应体系为 250 mL。⑤ 溶液于 37 ℃孵育直至达到最大镧-磷结合,整个过程需不断监测和调节 pH 值。

1.2.2.3 相关问题的考虑 ① 缓冲液类型:对于 pH 3.0 或 pH 5.0 的缓冲液的类型没有具体规定,选择合适的缓冲液即可,但需要注意的是,不应选择磷酸盐缓冲液,因为会对结合实验产生干扰;如果缓冲体系中的离子能够与镧发生反应产生不溶性盐,那么该缓冲体系也不适用于磷平衡结合研究。

② 制剂状态:采用整片或碎片均可,但要注意碎片需模拟咀嚼状态,不可研磨成细粉。

③ 酸预处理:酸预处理的目的是模拟胃内的生理条件,同时为了加速片剂溶解并促进平衡结合研究。可将 1 片整片或碎片转移至所用器皿中,加入一定体积的 0.1 mol·L^{-1} HCl 溶液在 37 ℃条件下孵育,孵育时间需要摸索。

④ pH 值的调节:调节至目标 pH 的步骤需要注意达稳过程,FDA 指南规定等待至少 1 h,应注意此期间需进行 pH 监测和调节。

⑤ 磷酸盐浓度:平衡结合实验应至少包含 8 个不同的磷酸盐浓度,包括达到结合平台的最高磷酸盐浓度,约最高磷酸盐浓度 1/10 的最低磷酸盐浓度,以及介于最高和最低之间的其余磷酸盐浓度,磷结合曲线应反映出快速上升段和达到平台的特征。应提供不同磷酸盐浓度最大结合水平的曲线图。

⑥ 其他考虑:孵育时间是基于动力学结合研究中镧-磷结合达到平衡的时间确定的。每个浓度应分别在 pH 1.2,pH 3.0 和 pH 5.0 条件下进行。孵育的整个过程需不断监控和调节 pH 值。每个实验条件下的研究应重复 12 次。

1.2.2.4 数据分析 恒温下的磷结合可用 Langmuir-type 方程来描述:

$$\frac{x}{m}=\frac{k_1 k_2 C_{eq}}{1+k_1 C_{eq}}$$

整理后:

$$\frac{C_{eq}}{x/m}=\frac{1}{k_1 k_2}+\frac{1}{k_2}C_{eq}$$

其中,C_{eq}代表平衡时,溶液中(未结合的)磷酸盐的浓度,用毫摩尔浓度(mmol·L^{-1})表示;x 代表平衡时,与药物结合的磷酸盐的量,用毫摩尔数(mmol)表示;m 代表使用药物的量,用克(g)表示;k_1 为亲和力常数;k_2 为结合能力常数。

以 C_{eq}为横坐标(X),以$\frac{C_{eq}}{x/m}$为纵坐标(Y),进行线性回归,得到线性方程。从斜率($a=\frac{1}{k_2}$)和截距($b=\frac{1}{k_1 k_2}$)可计算亲和力常数 k_1 和结合能力常数 k_2:

$$k_1 = a/b$$

$$k_2 = 1/a$$

90% 置信区间的统计分析:对于受试制剂和参比制剂来讲,磷结合试验是独立和平行进行的,受试制剂和参比制剂 k_2 均值比的 90% 置信区间的计算公式为:

$$90\%\ \mathrm{CI} = k_2\ 均值比 \pm t_{0.05,\,df} * \mathrm{SE}_Q$$

$$\mathrm{SE}_Q = Q\sqrt{\frac{\mathrm{SEM}_A^2}{A^2}+\frac{\mathrm{SEM}_B^2}{B^2}}$$

式中:SE_Q 为 k_2 均值比的标准误;Q 为 k_2 均值比;SEM_A 为 A 制剂 k_2 均值的标准误;SEM_B 为 B 制剂 k_2 均值的标准误;A 为 A 制剂 k_2 均值;B 为 B 制剂 k_2 均值。

需计算:① 受试制剂与参比制剂 k_1 比值。② 受试制剂与参比制剂 k_2 比值的 90% 的置信区间,此处为原值比值,非对数转换。生物等效性判定标准为受试制剂与参比制剂 k_2 比值的 90% 的置信区间在 80% ~120% 。

需注意的是,k_1 常数对于证明受试制剂和参比制剂的磷酸盐结合特征的一致性也有一定的重要性,受试制剂和参比制剂的 k_1 常数应具有可比性。若存在的差异不能证明生物等效性,则可能需要临床数据支持申请。

1.3 数据报告

方法学验证报告一般应包括各项验证内容和具体评价方法、接受标准及验证结果,并列出各项验证结果的所有原始检测数据。待测样品分析应按照分析方案和 SOP 进行,汇总试验样品的批量检测情况、样品检测结果及样品重复测定情况。应提交全部样品进样序列表,并提交 100% 的方法学验证和未知样品检测的图谱,依照进样时间逐批提交。

磷动力学结合研究和磷平衡结合研究的数据报告中,建议提供计算公式及统计分析软件,并报告游离/结合磷酸盐的浓度、磷酸盐结合量/结合百分比、动力学/平衡结合曲线图、朗格缪尔曲线图/回归方程、动力学研究中各时间点磷酸盐结合的 T/R 比值、相似因子(f_2)、亲和力常数 k_1、结合能力常数 k_2 及 90% 置信区间。

2 常见问题

2.1 方法学方面

方法学验证常存在考察项目不全的情况,如:实际待测样品分析中含过滤操作,却未进行滤膜吸附验证;实际待测样品在不同的试验条件下基质并不相同(如 pH、样本稀释倍数不同、溶液介质),而方法学仅验证了其中一种基质。此外,还存在验证项目设计不合理的情况,如:专属性试验中未考察空白辅料的影响、回收率试验不能反映实际待测样品浓度范围等。

2.2 实验设计方面

磷动力学结合实验中,取样时间点设置上常常出现问题,如:有实验设置时间点为 0.5,1,2,3,4,6,8,24 h,但根据第 8 h,24 h 测得的磷结合量并不能判断是否已达到最大结合平衡。这种情况下,应根据实验情况在 8 h 和 24 h 之间合理增加取样点,重新进行考察。

磷平衡结合实验中较常见的问题为磷酸盐浓度和孵育时间的设置,如:有报告未根据产品实际情况对磷酸盐浓度进行考察,直接引用文献中的参考浓度,导致浓度设置不合理,也不符合相关指南要求;关于孵育时间,有磷动力学结合研究结果显示在某 pH 条件下 10 h 达到最大结合(即平衡达稳时间),而磷平衡结合研究中孵育时间设置为 8 h,并未根据磷动力学结合实验的考察结果进行设置。

2.3 其他方面

其他常见问题包括:实验过程中未进行 pH 值监测;待测样品分析批中不含质控样品,无法评价分析批的准确度;统计分析计算公式错误的情况等。

3 结语

碳酸镧咀嚼片为胃肠道局部起效制剂,可采用体外磷结合实验证明其生物等效性,并且已有仿制药通过该途径获得 FDA 和我国批准并应用于临床,但体外磷结合方法较为特殊,其实验设计和实施具有其自身特点,希望研究者在研发过程中加以关注(本文仅代表个人观点,不作为药品注册申报的依据)。

[参 考 文 献]

[1] YANG YS, BYKADI S, CARLIN AS. Comparative evaluation of the *in vitro* efficacy of lanthanum carbonate chewable tablets[J]. *J Pharm Sci*, 2013, 102(4): 1370 - 1381.

[2] EMA. Guideline on equivalence studies for the demonstration of therapeutic equivalence for locally applied, locally acting products in the gastrointestinal tract[EB/OL]. [2018 - 11 - 07]. https://www. ema. europa. eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-equivalence-studies-demonstration-therapeutic-equivalence-locally-applied-locally-acting_en. pdf.

[3] YU LX, LI BV. FDA Bioequivalence Standards[M]. Springer, 2014:301.

[4] FDA. Draft Guidance on Lanthanum Carbonate[EB/OL]. [2017 - 05]. https://www. accessdata. fda. gov/drugsatfda _ docs/psg/Lanthanum% 20Carbonate _ draft _ Oral% 20tabs% 20chewable _ RLD% 2021468_RC05-17. pdf.

[5] YANG YS, SHAH RB, YU LX, *et al*. *In vitro* bioequivalence approach for a locally acting gastrointestinal drug: lanthanum carbonate[J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(2): 544 - 550.

[6] SAMY R, FAUSTINO PJ, ADAMS W, *et al*. Development and validation of an ion chromatography method for the determination of phosphate-binding of lanthanum carbonate[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51: 1108 - 1112.

[7] 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.

编辑:王宇梅/接受日期:2020 - 06 - 01