

替诺福韦的药动学研究进展[△]

孙涛^{1,2*}, 刘晓茜¹, 张丽军^{1,2#} (1.上海市公共卫生临床中心, 上海 201508; 2.温州医科大学检验医学院生命科学学院, 浙江温州 325035)

中图分类号 R969.1

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2015)26-3734-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.26.44

摘要 目的:为替诺福韦的临床应用提供参考。方法:查阅近年来国内外相关文献,对替诺福韦作用机制、代谢过程、浓度测定和药动学研究进行归纳和总结。结果与结论:替诺福韦由富马酸替诺福韦酯水解而成,经肾脏排泄,其浓度测定方法主要有蛋白沉淀法、固相萃取法和干血点法。不同人群有着类似的药动学参数,但食物会对其产生一定影响,个体差异会导致血药浓度差异,在临床应用中的个体化给药有待进一步研究。

关键词 替诺福韦;药动学;血药浓度

替诺福韦(Tenofovir)是由美国 Gilead Sciences 公司研发的新型核苷酸类逆转录酶抑制剂,被美国食品与药物管理局(FDA)批准与其他抗逆转录病毒药物联合治疗成人人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)-1感染;此外,还具有良好的抗乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)活性,已批准用于治疗成人慢性乙型肝炎,对 HIV/HBV 合并感染以及拉米夫定耐药株有效^[1]。为改善其细胞内吸收,增加其口服生物利用度,常以口服前药富马酸替诺福韦酯(Tenofovir disoproxil fumarate, TDF)形式给药。TDF 耐受性良好,常见的临床不良反应有恶心、腹泻、头痛、食欲减退等,研究证实 TDF 具有肾毒性、骨毒性,包括肾功能不全、范可尼综合征和低血磷骨软化症等^[2-6]。本文拟就替诺福韦作用机制、代谢、浓度测定和药动学的研究进展作一综述。

1 替诺福韦的作用机制与代谢研究

1.1 作用机制

TDF 口服后迅速水解为替诺福韦,见图1。替诺福韦被细胞摄取,经细胞内腺苷酸激酶磷酸化为单磷酸中间产物,再被迅速转化为活性二磷酸形式,见图2^[7]。替诺福韦二磷酸盐(TFV-DP)通过竞争性与天然底物5'-脱氧腺苷三磷酸结合,整合进入DNA抑制HIV逆转录酶活性,最终阻止DNA链延长,终止病毒DNA复制^[8]。

1.2 代谢研究

替诺福韦主要通过肾小球滤过和肾小管主动分泌联合作用经肾脏排泄,服药72 h后,70%~80%以原药形式随尿液排出。近端小管基底膜外侧的有机阴离子转运蛋白(Organic anion transporter, OAT)1和OAT3将替诺福韦从血液摄取进入基底膜肾小管上皮细胞,由多药耐药相关蛋白(Multidrug resistance associated protein, MRP)4将替诺福韦分泌至肾小管管腔^[9-10]。

2 替诺福韦的药动学研究

[△]基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81271834);“重大新药创制”科技重大专项(No.2012ZX09303013);“十二五”艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项(No.2012ZX10001-003-002);上海市科学技术委员会科研计划项目(No.12DZ1970302)

* 硕士研究生。研究方向:药动学。电话:021-37990333-5368。E-mail:taos110915@163.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:药动学和疾病蛋白质组学。电话:021-37990333-5368。E-mail:zhanglijun1221@163.com

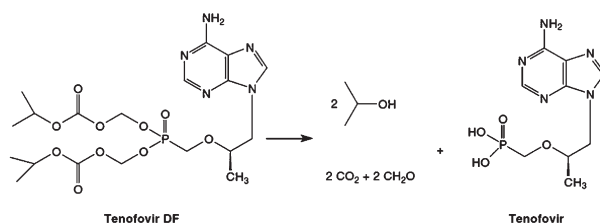


图1 TDF体内活化过程

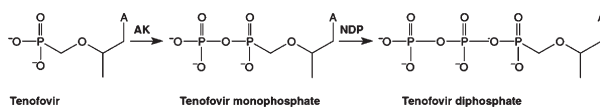


图2 替诺福韦细胞内代谢

A.腺嘌呤;AK.腺苷酸激酶;NDP.核苷二磷酸激酶

2.1 浓度测定及检测方法

艾滋病患者进行长期联合用药,药物相互作用可导致疗效降低或不良反应增大,药物浓度监测可更好地指导药物剂量,优化治疗效果,减少不良反应的发生。替诺福韦的浓度测定主要包括血药浓度测定和细胞内浓度测定。样品处理方法主要是蛋白沉淀法^[11-14]、固相萃取法^[15-19]和干血点(Dried blood spot, DBS)法^[20]。其中,蛋白沉淀法操作简单、成本低,但检测限较低,对仪器灵敏度要求高;固相萃取法可对样本进行分离、纯化和浓缩,与蛋白沉淀法和液液萃取法相比具有较高的分配系数,可提高分离效果,但过程复杂且成本较高;DBS法将全血样本收集在卡纸(如FTA卡)上,样本采集方便、快速,所需样本量少,方便存储和运输,但采集时血样必须均匀,对点样工具、温度、体积要求较高。检测方法有高效液相色谱(HPLC)法和液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法。其中,LC-MS/MS方法专属性好、灵敏度高,但仪器设备价格较高,使用条件受限。具体提取方法、过程及LC/MS条件等见表1。

2.2 药动学

替诺福韦药动学研究的相关文献见表2。替诺福韦在我国药动学研究的文献报道较少,Hu CY等^[21]的研究发现,健康受试者的替诺福韦药动学参数一致,不受性别、单/多剂量给药影响。多剂量给药达到稳态时,国内外健康受试者药动学参数差异最大者为 t_{max} ,国内受试者比国外受试者的 t_{max} 约高16%,

表1 替诺福韦浓度检测方法及试验条件

研究	提取方法	检测方法	线性范围	样本主要处理过程	LC条件		MS条件	
					流动相	色谱柱	离子对	内标
Djerada Z 等 ^[1]	蛋白沉淀法	UPLC-MS/MS	6~500 ng/ml	血浆→加内标、甲醇→涡旋→乙腈→涡旋、离心→上清上样	0.1%甲酸水溶液(A) 乙腈-0.1%甲酸溶液(B)	Waters Acquity HSS T3 (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm)	288.0/176.2	替诺福韦-d6
Jansen RS 等 ^[2]	蛋白沉淀法	LC-MS/MS	1.51~75.60 mmol/L	外周血单个核细胞(PBMC)→甲醇:水(70:30, V/V)(22.5 × 10 ⁶ PBMC/s/ml)裂解→涡旋→加工作液、内标→涡旋、离心→上样分析	10 mmol/L 醋酸铵:乙腈溶液(30:70, V/V, pH6.0) (A) 1 mmol/L 醋酸铵:乙腈溶液(30:70, V/V, pH 10.5) (B)	Biobasic AX(50 mm × 2.1 mm, 5 μm)	288/176	13C5TDF-DP
Fromentin E 等 ^[3]	蛋白沉淀法	LC-MS/MS	0.5~1 000 mmol/L	PBMC→细胞培养→PHA 刺激→NRTI 处理→PBS 冲洗→离心, 70%冷甲醇重悬→涡旋	2 mmol/L 磷酸铵缓冲液, 3 mmol/L 己胺和乙腈	Hypersil GOLD-C ₁₈ (100 mm × 1 mm, 3 μm)	288/176	13C5-TDF
Mirochnick M 等 ^[4]	蛋白沉淀法	LC-MS/MS	5~1 000 ng/ml	血浆→加内标→蛋白沉淀→过滤→0.5%乙酸水溶液复溶→上样分析	0.5%乙酸水溶液和0.5%乙酸甲醇溶液	Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (Agilent, Santa Clara, CA)	288/176	13C5-TDF
Valluru RK 等 ^[5]	固相萃取法	LC-MS/MS	2~500 ng/ml	血浆→加内标→2.0%磷酸水溶液→涡旋→转移到固相萃取柱中→5%甲醇水溶液和0.5%磷酸水溶液冲洗→5%氨甲醇溶液洗脱→N ₂ 吹干复溶→上样分析	1 mmol/L 乙酸水溶液[pH(6.5 ± 0.3)]:乙腈(50:50, V/V)	Prontosil C ₁₈ AQ (100 mm × 4.6 mm, 3 μm)	286.1/134.0	恩曲他滨
Matta MK 等 ^[6]	固相萃取法	LC-MS/MS	5~600 ng/ml	血浆→加内标→1%三氟乙酸水溶液→涡旋→转移到固相萃取柱中→5%甲醇水溶液冲洗→乙腈洗脱→N ₂ 吹干复溶→上样分析	0.1%甲酸水溶液:乙腈(90:10, V/V)	RP C ₁₈ (50 mm × 4.6 mm, 5 μm)	288.1/176.1	阿巴卡韦
Palwal N 等 ^[7]	固相萃取法	LC-MS/MS	5.06~603.72 ng/ml	血清→加内标→加甲酸:超纯水溶液(0.5:99.5, V/V)→涡旋→转移到固相萃取柱中→甲酸:超纯水溶液(0.5:99.5, V/V)冲洗→氨:甲醇溶液(5:95, V/V)洗脱→N ₂ 吹干复溶→上样分析	甲醇:氨溶液:超纯水,(0.1:99.9 V/V)/(30:70 V/V)	Supelco C ₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)	288.2/176.2	替诺福韦-d6
Bushman LR 等 ^[8]	固相萃取法	LC-MS/MS	2.5~2 000 fmol/sample	PBMC, 样本裂解、分离、纯化→冷的甲醇:超纯水(70:30, V/V)裂解→转移到固相萃取柱中→离心→KCl洗脱→酸性磷酸酶(pH5)去磷酸化→涡旋→孵育→加内标→除盐和浓缩→甲醇、乙酸铵冲洗→N ₂ 吹干复溶→上样分析	2%乙腈和0.1%甲酸超纯水溶液	Synergi Polar RP (100 mm × 2.0 mm, 2.5 μm)	288.044/176.108	13C5TDF-iso
Kou H 等 ^[9]	固相萃取法	HPLC-UV	20~2 000 ng/ml	血浆→加内标→磷酸铵缓冲液、甲醇冲洗→氮吹干→加氯仿→涡旋、离心→上样分析	磷酸铵缓冲液:乙腈:四丁基氢氧化铵溶液(90.0:10.0:0.3, V/V/V)	SHIMADZU him-pack CLC-ODS C ₁₈ (150 mm × 6 mm, 5 μm)		替加氟(Tegafur)
Zheng JH 等 ^[20]	DBS法	LC-MS/MS	2.5~1 000 ng/ml	全血→903 蛋白保存卡→干燥→100%提取→超声→离心→干燥、复溶→上样分析	含0.1%甲酸的乙腈溶液和99.5%超纯水	Synergi Polar RP (100 mm × 2 mm, 2.5 μm)	288.04/176.11	13C5TDF-iso

$c_{\max}$ 约低 11% ; 单一剂量给药时, 药动学参数最大差别仍为 $t_{\max}$, 国内受试者的 $t_{\max}$ 约低 21% ; 国内外健康受试者总体具有类似的药动学性质, 存在的较小差异可能不具有临床意义。通常, 食物能够增加脂溶性药物的吸收率, 特别是含脂食物。Custodio JM 等^[22]和 Lamorde M 等^[23]的研究发现, 饮食能提高

替诺福韦的 AUC 和 $c_{\max}$, 使 $t_{\max}$ 延后, 且食物中含脂越高该现象越明显。谭瑞^[24]的一项针对我国西部健康志愿者的药动学研究表明, 替诺福韦在单独给药时药动学参数与国外研究基本一致, 连续多次单独给药与单次单独给药时药动学参数没有显著变化。

表2 替诺福韦药动学参数汇总

研究	人群	$t_{\max}$, h	$c_{\max}$, ng/ml	AUC ₀₋₂₄ , ng/(ml·h)	AUC ₀₋₄₈ , ng/(ml·h)	$t_{1/2}$, h	剂量	饮食状态
Hu CY 等 ^[21]	中国健康志愿者	0.75	218.1	1 467.7		17.3	多剂量	禁食
		0.75	300.3	2 290.9		21.1	单剂量(300 mg)	禁食
Custodio JM 等 ^[22]	国外健康志愿者	1.50	484	3 420	3 610(21)	17.3	单剂量(300 mg)	标准
		1.00	366	2 450	2 640(27)	16.1	单剂量(300 mg)	禁食
		1.50	418	3 200	3 390(22)	17.8	单剂量(300 mg)	清淡
		2.00	169	1 316		10.3	单剂量(300 mg)	禁食
Lamorde M 等 ^[23]	乌干达 HIV-1 患者	3.00	175	1 568		8.9	单剂量(300 mg)	中等脂肪
		2.00	169	1 316		10.3	单剂量(300 mg)	禁食
谭瑞 ^[24]	中国健康志愿者	1.05	290.71	1 871.60	2 284.16 ± 373.54	18.78	单剂量(300 mg)	
		1.10	225.60	2 738.60	3 155.866	17.83	多剂量	
Colbers AP 等 ^[25]	HIV-1 感染孕妇	1.10	330	3 170		15	单剂量(300 mg)	

注: $t_{\max}$ 为达峰时间; $c_{\max}$ 为峰浓度; AUC 为时间曲线下面积

3 结语

替诺福韦作为一种新型的核苷酸类逆转录酶抑制剂, 在 HIV 治疗方面扮演重要角色。替诺福韦浓度检测方法中, LC-MS/MS 法具有较高的选择性和准确性, 提取方法各有利弊, 仍有待优化。但是, 药物浓度高会产生毒副作用, 药物浓度低会影响治疗效果, 且国内外人群存在个体差异, 如何实现个体化给药以及替诺福韦的使用安全性问题等仍有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Chapman T, McGavin J, Noble S. Tenofovir disoproxil fumarate[J]. *Drugs*, 2003, 63(15): 1 597.
- [2] Mateo L, Holgado S, Marinosa ML, *et al.* Hypophosphatemic osteomalacia induced by tenofovir in HIV-infected patients[J]. *Clin Rheumatol*, 2014, doi: 10.1007/s10067-014-2627-x.
- [3] Gupta SK, Anderson AM, Ebrahimi R, *et al.* Fanconi syndrome accompanied by renal function decline with tenofo-

- vir disoproxil fumarate: a prospective, case-control study of predictors and resolution in HIV-infected patients[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92 717.
- [4] Woodward CL, Hall AM, Williams IG, *et al.* Tenofovir-associated renal and bone toxicity[J]. *HIV Med*, 2009, 10(8): 482.
- [5] Havens PL, Kiser JJ, Stephensen CB, *et al.* Association of higher plasma vitamin D binding protein and lower free calcitriol levels with tenofovir disoproxil fumarate use and plasma and intracellular tenofovir pharmacokinetics: cause of a functional vitamin D deficiency?[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11): 5 619.
- [6] Fung HB, Stone EA, Piacenti FJ. Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection[J]. *Clin Ther*, 2002, 24(10): 1 515.
- [7] Kearney BP, Flaherty JF, Shah J. Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2004, 43(9): 595.
- [8] Robbins BL, Srinivas RV, Kim C, *et al.* Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R-(2-phosphonomethoxypropyl) adenine (PMPA), Bis (isopropylloxymethylcarbonyl) PMPA[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(3): 612.
- [9] Ray AS, Cihlar T, Robinson KL, *et al.* Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(10): 3 297.
- [10] Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, *et al.* Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(4): 866.
- [11] Djerada Z, Feliu C, Tournois C, *et al.* Validation of a fast method for quantitative analysis of elvitegravir, raltegravir, maraviroc, etravirine, tenofovir, boceprevir and 10 other antiretroviral agents in human plasma samples with a new UPLC-MS/MS technology[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 86(8): 100.
- [12] Jansen RS, Rosing H, Kromdijk W, *et al.* Simultaneous quantification of emtricitabine and tenofovir nucleotides in peripheral blood mononuclear cells using weak anion-exchange liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(7/8): 621.
- [13] Fromentin E, Gavegnano C, Obikhod A, *et al.* Simultaneous quantification of intracellular natural and antiretroviral nucleosides and nucleotides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(5): 1 982.
- [14] Mirochnick M, Taha T, Kreitchmann R, *et al.* Pharmacokinetics and safety of tenofovir in HIV-infected women during labor and their infants during the first week of life[J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2014, 65(1): 33.
- [15] Valluru RK, B PB, S KS, *et al.* High throughput LC-MS/MS method for simultaneous determination of tenofovir, lamivudine and nevirapine in human plasma[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 931: 117.
- [16] Matta MK, Burugula L, Pilli NR, *et al.* A novel LC-MS/MS method for simultaneous quantification of tenofovir and lamivudine in human plasma and its application to a pharmacokinetic study[J]. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26(10): 1 202.
- [17] Paliwal N, Jain P, Dubey N, *et al.* A liquid chromatography tandem mass spectrometry based regulatory compliant method for the determination of tenofovir in human serum[J]. *Drug Res: Stuttg*, 2014, 64(6): 306.
- [18] Bushman LR, Kiser JJ, Rower JE, *et al.* Determination of nucleoside analog mono-, di-, and tri-phosphates in cellular matrix by solid phase extraction and ultra-sensitive LC-MS/MS detection[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(5): 390.
- [19] Kou H, Du X, Li Y, *et al.* Quantification of tenofovir in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography coupled with UV detection [J]. *Ther Drug Monit*, 2012, 34(5): 593.
- [20] Zheng JH, Guida LA, Rower C, *et al.* Quantitation of tenofovir and emtricitabine in dried blood spots (DBS) with LC-MS/MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 88(8): 144.
- [21] Hu CY, Liu YM, Liu Y, *et al.* Pharmacokinetics and tolerability of Tenofovir disoproxil fumarate 300 mg once daily: an open-label, single and multiple-dose study in healthy Chinese subjects[J]. *Clin Ther*, 2013, 35(12): 1 884.
- [22] Custodio JM, Yin X, Hepner M, *et al.* Effect of food on rilpivirine/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate, an antiretroviral single-tablet regimen for the treatment of HIV infection[J]. *J Clin Pharmacol*, 2014, 54(4): 378.
- [23] Lamorde M, Byakika-Kibwika P, Tamale WS, *et al.* Effect of food on the steady-state pharmacokinetics of tenofovir and emtricitabine plus efavirenz in ugandan adults[J]. *AIDS Res Treat*, 2012, doi: 10.1155/2012/ 105980.
- [24] 谭瑞. 中国西部人群替诺福韦体内药代动力学研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011.
- [25] Colbers AP, Hawkins DA, Gingelmaier A, *et al.* The pharmacokinetics, safety and efficacy of tenofovir and emtricitabine in HIV-1-infected pregnant women[J]. *AIDS*, 2013, 27(5): 739.

(收稿日期: 2014-10-13 修回日期: 2015-08-05)

(编辑: 陶婷婷)