

基于药动学探究替芬泰与替诺福韦酯的药物-药物相互作用

张玉凤^{1,2}, 张晨晨^{1,2}, 滕云华², 梁博涵², 王玲梅², 王 鹏³, 董世奇², 张爱杰^{2*}, 樊慧蓉^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192

3. 天津市汉康医药生物技术有限公司, 天津 300409

摘要: 目的 建立替诺福韦酯(TDF)的代谢产物替诺福韦(TFV)、替芬泰(Y101)及其代谢物M8的LC-MS/MS分析方法, 基于大鼠体内药动学、肾排泄及体外肾切片摄取模型研究Y101与TDF的药物-药物相互作用(DDI)。方法 ①药动学实验: SD雄性大鼠随机分为3组, 分别单次ig给药Y101(60 mg·kg⁻¹)、TDF(30 mg·kg⁻¹)及TDF(30 mg·kg⁻¹)+Y101(60 mg·kg⁻¹), 通过LC-MS/MS方法测定给药后血浆中Y101、M8、TFV浓度, 并采用非房室模型统计矩法计算药动学参数。②肾排泄实验: SD雄性大鼠随机分为3组, 分别单次iv给药Y101(25 mg·kg⁻¹)、TDF(30 mg·kg⁻¹)及TDF(30 mg·kg⁻¹)+Y101(25 mg·kg⁻¹)。利用LC-MS/MS方法测定尿样中Y101、M8、TFV浓度, 分析药物及代谢物的累积排泄率; ③肾切片实验: 大鼠肾切片分别在含有M8(5.0 μmol·L⁻¹)、TFV(10 μmol·L⁻¹)、TFV(10 μmol·L⁻¹)+Y101(2.0 μmol·L⁻¹)和TFV(10 μmol·L⁻¹)+M8(5.0 μmol·L⁻¹)的药液中孵育一定时间后, 收集样品经适当处理后利用LC-MS/MS方法测定肾脏对TFV、Y101、M8的摄取量。结果 ①药动学实验: 对Y101及M8开展部分方法学验证, 对TFV开展全面的方法学验证, 验证结果表明LC-MS/MS方法专属性强、灵敏度高。采用LC-MS/MS方法测定大鼠血浆中的TFV、Y101和M8, 发现与单独用药组相比, Y101+TDF组大鼠血浆中TFV、Y101和M8药时曲线下面积(AUC₀₋₄和AUC_{0-∞})显著性增加, 血浆清除率(CL_p)显著性减小。②肾排泄实验: Y101+TDF组的尿累积排泄分数低于单独用药组, 且TFV、M8均出现显著性降低。③肾切片实验: TFV+M8组与单独孵育组相比, 肾切片对TFV或M8的摄取量均显著性下降。结论 TDF的代谢产物TFV与Y101的代谢产物M8可能通过竞争性抑制有机阴离子转运体3(OAT3), 对TFV、M8的血药浓度及肾排泄造成影响, 提示临床合用需要进行剂量调整。

关键词: 替芬泰; 替诺福韦酯; 替诺福韦; 药物相互作用; 肾排泄; 有机阴离子转运体3

中图分类号: R969.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)11-2597-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.015

Investigation of drug-drug interactions between bentysrepinine and tenofovir disoproxil fumarate based on pharmacokinetic

ZHANG Yufeng^{1,2}, ZHANG Chenchen^{1,2}, TENG Yunhua², LIANG Bohan², WANG Lingmei², WANG Peng³, DONG Shiqi², ZHANG Aijie², FAN Huirong²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300192, China

3. Tianjin Hankang Medicinal & Biological Technology Co., Ltd., Tianjin 300409, China

Abstract: Objective To establish LC-MS/MS methods for the analysis of tenofovir (TFV), bentysrepinine (Y101) and its metabolite M8. The drug-drug interactions between Y101 and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) and its mechanism were studied by using the model of *in vivo* pharmacokinetics, renal excretion and *in vitro* uptake in kidney slices. **Methods** ① Pharmacokinetic experiments: SD male rats were randomly divided into three groups: rats were orally given Y101 (60 mg·kg⁻¹), TDF (30 mg·kg⁻¹) or TDF (30 mg·kg⁻¹) + Y101 (60 mg·kg⁻¹), respectively. Plasma concentrations of Y101, M8 and TFV were determined by LC-MS/MS methods, and pharmacokinetic parameters were calculated by Phenix WinNonlin with non-compartmental analysis. ② Renal

收稿日期: 2024-06-18

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(82104284)

第一作者: 张玉凤(1998—), 硕士研究生, 研究方向为药动学。E-mail: zyfl3034559803@163.com

*共同通信作者: 樊慧蓉(1972—), 研究员, 主要从事为药动学研究。E-mail: fanhr99@163.com

张爱杰(1986—), 副研究员, 主要从事药动学研究。E-mail: zhangaijie1986@163.com

excretion experiments: SD male rats were randomly divided into three groups: Rats via tail vein were injected with Y101(25 mg·kg⁻¹), TDF (30 mg·kg⁻¹) or TDF (30 mg·kg⁻¹) + Y101 (25 mg·kg⁻¹), respectively. The concentrations of Y101, M8 and TFV in urine samples were determined by LC-MS/MS methods, and the cumulative excretion rates of drugs and their metabolites were calculated.

③ Kidney slices experiments: Rat kidney slices were incubated in buffer containing M8 (5.0 μmol·L⁻¹), TFV (10 μmol·L⁻¹), TFV (10 μmol·L⁻¹) + Y101 (2.0 μmol·L⁻¹) or TFV (10 μmol·L⁻¹) + M8 (5.0 μmol·L⁻¹) for a certain period of time, respectively. The samples were collected and properly treated, and then the renal uptakes of TFV, Y101 and M8 were determined by LC-MS/MS methods.

Results ① Pharmacokinetic experiments: A full validation of TFV and a partial validation of Y101 and M8 were carried out. These results showed that the LC-MS/MS methods were highly specific and sensitive. The concentrations of TFV, Y101 and M8 in rat plasma were determined by validated LC-MS/MS methods. It was found that compared with the Y101 or TDF treatment group, the area under the curve (AUC_{0-t} and AUC_{0-∞}) of TFV, Y101 and M8 in rat plasma increased significantly and the plasma clearance rate (CL_p) decreased significantly in the group of TDF + Y101. ② Renal excretion studies: The results showed that the cumulative urinary excretion of TFV and M8 in the TDF+Y101 group was significantly lower than the Y101 or TDF alone group. ③ Kidney slices experiments: Compared with the TFV or M8 alone group, the uptakes of TFV or M8 decreased significantly in the TFV + M8 group. **Conclusion** TFV and M8 may have an impact on the blood concentrations and renal excretion of TFV and M8 through competitive inhibition of OAT3, suggesting that the dose needs to be adjusted in clinical combination.

Key words: bentyrepinine (Y101); tenofovir disoproxil fumarate (TDF); tenofovir (TFV); drug-drug interactions; renal excretion; OAT3

富马酸替诺福韦酯(tenofovir disoproxil fumarate, TDF)是一种新型核苷酸类逆转录酶抑制剂,临床研究表明TDF可以治疗多种病毒感染,该药于2008年被批准用于乙型肝炎病毒(HBV)感染的治疗^[1-2]。临床上TDF仍然是HBV感染治疗的一线药物,患者的依从性和疗效较好。TDF的作用靶点是病毒聚合酶,长期服用只能抑制病毒的复制,而且停药后易复发^[3-4]。因此,TDF常与其他药物联合应用于治疗HBV感染,如Park等^[5]研究TDF联合恩替卡韦治疗HBV感染,发现联合用药后较TDF单独治疗具有更高的病毒抑制率。TDF作为替诺福韦(tenofovir, TFV)的前药,口服后吸收良好,在生物体内能迅速被酶水解转化为TFV,且TFV是TDF在生物体内吸收和排泄的主要形式。有文献报道,TFV主要经肾脏有机阴离子转运体(OATs)从血液进入肾小管上皮细胞,经肾小球过滤和肾小管主动分泌随尿液排泄^[6-7]。

替芬泰(bentyrepinine, Y101)是一种抗HBV候选新药,目前正处于临床II期研究阶段。有研究证明Y101可以抑制病毒复制模板共价闭环环状DNA(cccDNA)的转换,抑制病毒颗粒的循环复制^[8-10],且停药后无明显反跳,对核苷类药物耐药株具有良好的疗效。临床研究表明Y101在健康受试者中一定剂量范围内有良好的耐受性和安全性^[11]。结合Y101和TDF的药效作用特点,临床上两药可能联合使用治疗HBV感染。有文献报道,Y101在健康受试者血浆中的主要代谢产物是酰胺水解代谢物M8^[11]。本课题组前期研究表明,M8是肾脏

OAT3转运体的底物,肾脏排泄是Y101、M8的重要消除途径^[12]。Y101与M8的化学结构式见图1。

由于TDF代谢物TFV与Y101代谢物M8均为OATs的底物,因此TDF与Y101联合用药后可能会发生OATs介导的药物-药物相互作用(DDI),进而影响药物的安全性及疗效。本研究拟从大鼠体内吸收和肾排泄2个方面初步探讨TDF与Y101联合使用后OATs介导的DDI,以期为临床合理用药提供参考依据和研究基础。

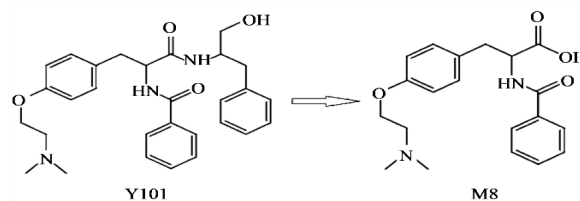


图1 Y101及其代谢物M8的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of Y101 and its metabolites M8

1 材料

1.1 药物

Y101 原料药(批号:20191106,质量分数>99.5%)和M8(批号:20200113,质量分数>98%)由贵州百灵集团制药有限公司提供;TDF(批号:C22PB293A,质量分数>98%)北京谨明生物科技有限公司;TFV(批号:T125346,质量分数≥99%)、甲酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乌本美司(BS,批号:190603,质量分数>98%)购自深圳万乐药业有限公司;盐酸埃克替尼(ICO,批号:

RH348203, 质量分数 $\geq 99\%$)购自上海易恩化学技术有限公司; 甲醇和乙腈(色谱级)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 纯化水购自屈臣氏公司; 肝素钠和羧甲基纤维素钠(CMC-Na)均购自北京索莱宝科技有限公司。所有其他试剂均为分析级。

1.2 仪器

LC-30A 型高效液相色谱(LC-30AD), 日本 Shimadzu 公司; 三重四级杆串联质谱(QUAD™ 5500), 美国 Applied Biosystems 公司; 十万分之一电子分析天平(XPR225DU/A), 瑞士梅特勒托利多公司; 多管涡旋振荡器(TARGIN VX-II), 北京踏锦科技有限公司; 全自动雪花制冰机(IMS-30), 常熟市雪科电器有限公司; 低温高速离心机(Legend Micro 17R), 赛默飞世尔科技公司; HH 数显恒温水浴锅, 金坛市金城国胜实验仪器厂; ZQP-86 型振动切片机, 上海之信仪器有限公司; 组织匀浆机, 德国 IKA 公司。

1.3 实验动物

32 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠, 体质量 200~220 g, 合格证编号: 110011221110894541、110011221110232832, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2021-0011。新购买的大鼠在检疫间隔离饲养 3 d, 期间自由摄食和饮水, 每天观察动物 1 次。状态正常后转移到饲养间, 饲养间采用明暗交替 12 h, 温度 21~25 °C, 湿度 55%~65%, 换气次数不少于每小时 15 次全新风。动物实验均通过中国医学科学院放射医学研究所动物伦理委员会审批(审批号: IRM-DWLL-2021075)。

2 方法

2.1 溶液配制

2.1.1 大鼠 ig 给药溶液配制 Y101 与 TDF 均使用 1% CMC-Na 溶液溶解, 分别配制成质量浓度为 12、6 mg·mL⁻¹ 的溶液。

2.1.2 大鼠 iv 溶液配制^[13] (1) 准确称取一定量的 Y101 原料药, 依次加入 1 mmol·L⁻¹ HCl、*N*-甲基-2 吡咯烷酮、10% 葡萄糖注射液和 0.1 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ (1:6:38:5, 体积比), 最终配制成质量浓度为 5 mg·mL⁻¹ 注射液, 临用现配。(2) 准确称取一定量的 TDF 原料药, 加入 0.9% 氯化钠溶液溶解, 超声 20~30 min, 配制成质量浓度为 6 mg·mL⁻¹ 的注射液, 临用现配。

2.1.3 Krebs-Ringer Buffer (KRB) 配制 称取一定量的 NaCl、KCl、MgSO₄、CaCl₂、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄ 等物质, 具体浓度参考 Jie 等^[14]报道方法, 待完全溶

解后得到 KRB。

2.1.4 对照品溶液配制: Y101、M8 对照品适量, 均精密称定 2 份, 分别加甲醇、甲醇-水 (1:1, 体积比) 配制成质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的标准、质控储备液, -20 °C 冰箱保存, 临用前, 用甲醇分别梯度稀释储备液, 配制成 Y101 系列标准工作液, 质量浓度分别为 5、10、50、200、500、2 000、2 500 ng·mL⁻¹, 低、中、高质控工作液质量浓度为 12.5、250.0、1 875.0 ng·mL⁻¹; M8 系列标准工作液质量浓度分别为 5、10、50、200、1 000、4 000、5 000 ng·mL⁻¹, 低、中、高质控工作液质量浓度为 12.5、250.0、3 750.0 ng·mL⁻¹; 取内标 (BS) 对照品适量, 精密称定, 加甲醇配制成 1.0 mg·mL⁻¹ 的内标储备液, -20 °C 冰箱保存, 临用前, 用甲醇稀释内标储备液, 配制成 1.0 μg·mL⁻¹ 的内标工作液。

取 TFV 对照品适量, 精密称定 2 份, 加甲醇-水 (1:1, 体积比) 配制成质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的标准、质控储备液, 在 -20 °C 冰箱保存, 临用前, 用甲醇分别梯度稀释储备液, 配制成 TFV 系列标准工作液, 质量浓度分别为 5、10、50、250、1 000、1 600、2 000 ng·mL⁻¹, 低、中、高质控工作液质量浓度为 12.5、150.0、1 500.0 ng·mL⁻¹; 取内标 (ICO) 对照品适量, 精密称定, 加甲醇配制成 1.0 mg·mL⁻¹ 的内标储备液, -20 °C 冰箱保存, 临用前, 用甲醇稀释内标储备液, 配制成 5.0 ng·mL⁻¹ 的内标工作液。

2.2 样品处理

2.2.1 Y101、M8 样品 标准或质控样品 50 μL, 依次加入 50 μL 大鼠空白血浆、100 μL 的 BS 工作液, 涡旋震荡 1 min, 在 12 000 r·min⁻¹, 4 °C 条件下离心 10 min, 吸取上清液 50 μL, 加入到含 200 μL 50% 甲醇-水的离心管中, 涡旋 1 min, 取样 100 μL 于内插管, 4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 进行 LC-MS/MS 定量分析。对于待测血浆、尿液、肾切片匀浆样品, 除 50 μL 待测样品中依次加入 100 μL 的 BS 工作液、100 μL 甲醇, 后续操作均与上述 Y101、M8 标准或质控样品相同。

2.2.2 TFV 样品 50 μL 标准或质控样品中加入 50 μL 大鼠空白血浆, 再依次加入 50 μL 的 ICO 工作液、100 μL 甲醇, 涡旋震荡 1 min, 在 12 000 r·min⁻¹, 4 °C 条件下离心 10 min, 吸取上清液 50 μL, 加入到含 200 μL 纯水的离心管中, 涡旋 1 min, 取样 100 μL 于内插管, 4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 进行 LC-MS/MS 定量分析。对于待测血浆、尿液、肾切片匀浆样品, 除 50 μL 待测样品中依次加入 50 μL 的 ICO 工作液、150 μL 甲醇, 后续操作均与上述 TFV

标准或质控样品相同。

2.3 色谱和质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Infinitylab Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm/100 mm×2.1 mm, 2.7 μm) 反相色谱柱, 柱温 40 °C, Y101、M8 进样体积 1 μL, TFV 进样体积 6 μL, 体积流量均为 0.3 mL·min⁻¹, 流动相 A: 0.05 % 甲酸-1 mmol·L⁻¹ 乙酸铵-5% 乙腈水溶液, 流动相 B: 0.05% 甲酸-乙腈。Y101、M8 梯度洗脱: 0~0.2 min, 15% B; 0.2~2.0 min, 15%~85% B; 2.0~4.0 min, 85% B; 4.0~4.1 min, 85%~15% B; 4.1~5.5 min, 15% B。TFV 梯度洗脱: 0~1.2 min, 2% B; 1.2~2.0 min, 2%~90% B; 2.0~4.0 min, 90% B; 4.0~4.1 min, 90%~2% B; 4.1~5.5 min, 2% B。仪器运行时间均为 5.5 min。

2.3.2 质谱条件 质谱采用电喷雾离子源(ESI)正离子模式, 离子化电压为 4 500 V; 源温度: 550 °C。去簇电压(DP)、入口电压(EP)、碰撞能(CE)、碰撞室出口电压(CXP)参数及相应物质离子对参数见表 1。

表 1 对照品和内标的质谱参数
Table 1 Mass spectrum parameter of standard and internal standard

化合物	离子对(<i>m/z</i>)	DP/V	EP/V	CE/V	CXP/V
Y101	490.20→339.10	100	10	18	10
M8	357.20→105.00	100	10	37	10
BS	309.20→120.10	90	10	30	10
TFV	288.10→176.10	110	10	35	10
ICO	392.15→304.15	100	10	38	10

2.4 方法学验证

2.4.1 TFV 方法学验证 ①选择性及特异性: 通过对比空白血浆样品色谱图、定量下限(LLOQ)样品色谱图和 SD 大鼠 ig 给药 TDF (30 mg·kg⁻¹) 后 3 h 的血浆样品色谱图, 以考察定量方法的选择性与特异性。②线性范围: 利用大鼠空白血浆、TFV 系列标准曲线工作液和 ICO 内标工作液, 按照“2.2”项样品处理方法处理, 平行双样本。以待测物质量浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 以加权最小二乘法($W=1/x^2$)进行回归运算。③准确度与精密度: LLOQ、低(LQC)、中(MQC)、高(HQC)质控样品按照“2.2”项样品处理方法处理, 平行 6 样本。在 3 d 内分别对 3 个分析批检测, 以检测定量方法批内、批间的准确度和精密度。④基质效应与提取回收率: 分别配制样品 A: 向 50 μL 大鼠空白血浆中依次加入 50 μL 的 TFV 和 50 μL 内标工

作液, 其余按照“2.2”项样品处理方法处理, 平行 6 样本; 样品 B: 向 50 μL 超纯水中依次加入 50 μL 的 TFV 和 50 μL 内标工作液, 其余按照“2.2”项样品处理方法处理, 平行 6 样本; 样品 C: 向 50 μL 空白血浆中加入 200 μL 甲醇, 涡旋 1 min, 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 50 μL 于玻璃试管中, 氮气吹干后, 用 250 μL 样品 B 复溶, 进样 6 μL 进行 LC-MS/MS 定量分析, 平行 6 样本。通过对样品 A、B、C 色谱峰面积对比检验测定方法的基质效应与提取回收率。⑤稳定性: 大鼠空白血浆分别将 30 μg·mL⁻¹ 的 TFV 稀释 20 倍至 HQC 浓度水平、250 ng·mL⁻¹ 的 TFV 稀释 20 倍至 LQC 浓度水平, 均平行 6 样本。分别在室温放置 4 h、样品处理后自动进样器放置 48 h、-20 °C 长期冻存放置 25 d 和 -20 °C 室温循环冻融 3 次后按照“2.2”项样品处理方法处理, 进行 LC-MS/MS 分析。⑥稀释可靠性: 含 TFV (15 μg·mL⁻¹) 的血浆样品, 用大鼠空白血浆稀释 10 倍后, 按照“2.2”项样品处理方法处理, 进行 LC-MS/MS 分析, 以考察样品的稀释可靠性。

2.4.2 Y101 部分方法学验证 本实验室前期建立 Y101 及 M8 的测定方法, 已经过全面验证^[15], 均符合生物样品分析相关要求^[16], 故本研究采用部分验证。分别将 Y101、M8 的 LLOQ、LQC、MQC、HQC 质控和标准曲线, 按照“2.2”项样品处理方法处理, 进行 LC-MS/MS 分析, 平行 6 样本, 进行单个分析批的检测, 以考察 Y101、M8 部分方法的线性范围、定量下限、批内准确度和精密度是否满足生物样品分析要求。

2.5 大鼠 ig 给药的血浆药动力学分析

12 只 SD 雄性大鼠随机分为 3 组: Y101 组、TDF 组和 TDF+Y101 组, 每组 4 只。Y101、TDF ig 溶液均按照“2.1.1”项方法配制。大鼠禁食 12 h 后, 3 组分别 ig TDF (30 mg·kg⁻¹)^[17-18]、Y101 (60 mg·kg⁻¹)^[15] 和 TDF (30 mg·kg⁻¹) + Y101 (60 mg·kg⁻¹)。于给药前 (0 h) 及给药后 0.083、0.25、0.5、1、2、3、4、6、9、12、24、30 h 经大鼠眼眶静脉丛取血约 0.2 mL, 在 12 000 r·min⁻¹, 4 °C 条件下离心 10 min, 分离血浆, 置于 -20 °C 冰箱冷冻备用。待测血浆样品按照“2.2”项样品处理方法处理后进行分析。

2.6 大鼠体外肾切片实验

8 只 SD 雄性大鼠异氟烷麻醉后, 快速取出肾脏并去除包膜后置于 4 °C 下含 95% O₂ 的 KRB 中。将新鲜肾脏固定在切片机上切片, 厚约 300 μm, 表面积约 0.15 cm²。每 2 个切片放入充氧的 37 °C KRB 中

预孵3 min,然后在37℃轻轻移入24孔细胞培养板,每孔含M8($5.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、TFV($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、TFV($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + Y101($2.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和TFV($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + M8($5.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的1 mL KRB,且有机溶剂的最终体积分数不超过1%。分别孵育5、10、15、30 min后,收集肾切片,用冰冷的KRB冲洗3次,并在滤纸上干燥,每个时间点均平行3个样本。肾切片经匀浆机匀浆后按照“2.2”项样品处理方法处理。

2.7 大鼠iv给药的肾排泄实验

12只SD雄性大鼠随机分为3组:Y101组、TDF组和TDF+Y101组,每组4只。Y101、TDF iv溶液均按照“2.1.2”项方法配制。大鼠禁食12 h后,3组分别尾静脉iv TDF($30\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、Y101($25\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和TDF($30\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + Y101($25\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。每只大鼠放在各自代谢笼中,分别于给药后0~2、2~4、4~6、6~12、12~24、24~30、30~48、48~72 h收集尿管中的样品,置于-20℃冰箱冷冻备用。分析前样品先由空白尿样稀释一定比例,样品按照“2.2”项样品处理方法处理后分析测定。

2.8 数据处理

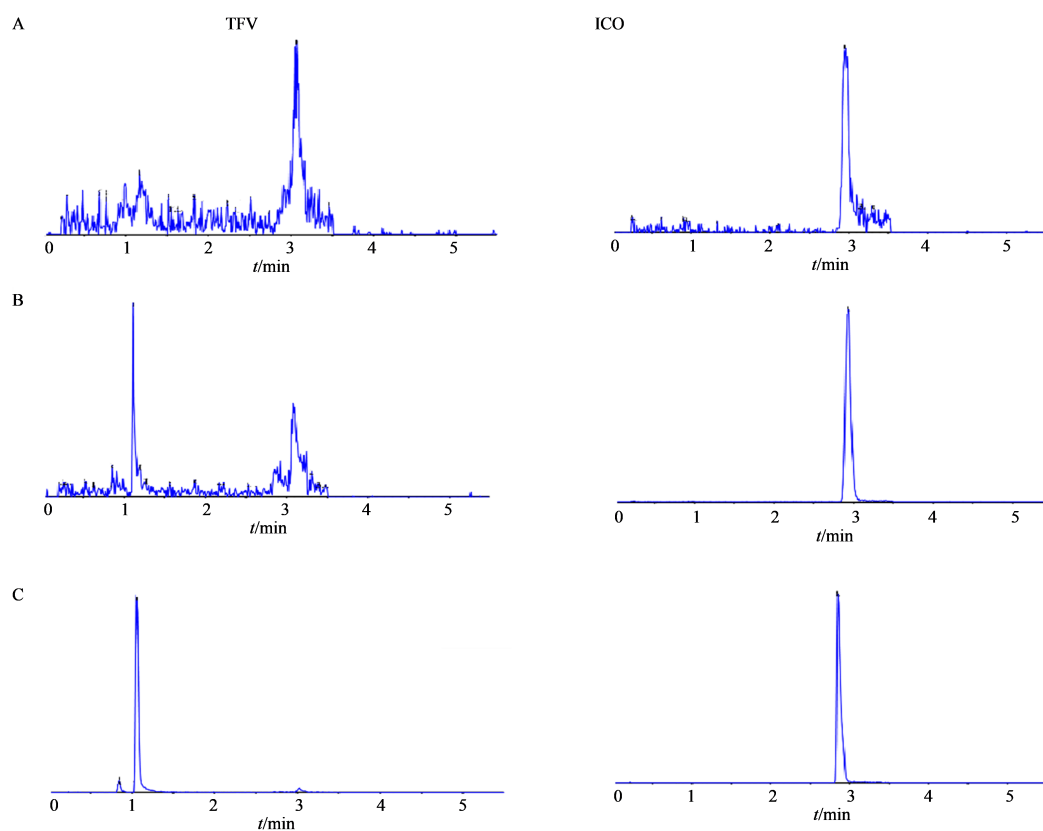
Analyst 1.7.3软件对待测物Y101、M8、TFV和内标进行积分,得出峰面积。以待测物质量浓度为横坐标,待测物与内标的峰面积比值为纵坐标,以加权最小二乘法(权重为 $1/x^2$)进行回归运算,求得的直线方程即为血浆校正曲线。使用WinNonlin 8.3软件处理血药浓度数据,使用非房室模型统计矩法计算药动学参数(C_{max} 、 t_{max} 、 $\text{AUC}_{0\sim t}$ 、 $\text{AUC}_{0\sim\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 、 CL_p)。采用 t 检验进行分析, $P<0.05$ 为在统计学上具有显著性差异。

3 结果

3.1 TFV方法学验证

3.1.1 选择性与特异性 除空白血浆不加内标,采用同体积的甲醇替代外,其余样品分别按照“2.2”项样品处理方法处理,平行6样本,获得空白血浆样品色谱图(图2-A)、LLOQ样品色谱图(图2-B)及SD大鼠TDF($30\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)ig给药后3 h血浆样品色谱图(图2-C)。

3.1.2 线性范围 求得TFV的回归方程为 $y=0.003\ 06\ x+0.001\ 05$, $r=0.997\ 7$,表明TFV在



A-空白大鼠血浆; B-大鼠血浆中加入 $5\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TFV、 $5\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ICO; C-大鼠ig给药 $30\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TDF后3 h血浆样品。

A-blank rat plasma; B-rat plasma with $5\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TFV and $5\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ICO; C-rat plasma sample $30\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TDF at 3 h after oral administration.

图2 LC-MS/MS法测定大鼠血浆中TFV的典型MRM色谱图

Fig. 2 Typical MRM chromatogram of LC-MS/MS for determination of TFV in rat plasma

5~2 000 ng·mL⁻¹内线性关系良好,大鼠血浆中TFV的LLOQ可以达到5 ng·mL⁻¹。

3.1.3 准确度和精密度 通过对定量下限及质控样品的分析,由表2可见,批内、批间的准确度和精密度均满足生物样品分析要求。

3.1.4 基质效应和提取回收率 基质效应与提取

回收率见表3,由表3可知,TFV在LQC、HQC浓度水平及内标ICO在当前的处理方法无明显的基质效应,且提取回收率满足定量要求。

3.1.5 稳定性 由表4可知,4种条件下TFV的测定结果均在生物样品分析要求范围内^[16],表明其在样品储存和分析过程中具有良好的稳定性。

3.1.6 稀释可靠性 结果发现,TFV稀释10倍的准确度和精密度分别为103.5%和2.72%,因此该样品具有稀释可靠性。

3.2 Y101部分方法学验证

结果得到Y101、M8的回归方程分别为 $y=0.000\ 771\ x+0.062\ 5(r=0.994\ 7)$ 、 $y=0.001\ 12\ x+0.002\ 83(r=0.991\ 9)$,表明Y101、M8在各自的曲线范围内线性关系良好。批内准确度、精密度和最低定量下限均满足生物样品分析要求^[16],见表5。

表2 LC-MS/MS法测定大鼠血浆中TFV的准确度和精密度
Table 2 Accuracy and precision of LC-MS/MS method for determination of TFV in rat plasma

质量浓度/(ng·mL ⁻¹)		精密度RSD/%		准确度/%
理论值	测定值	日内	日间	
5.0	5.030±0.40	9.31	4.59	101.0
12.5	12.00±0.79	5.76	11.24	95.6
150.0	154.30±11.29	5.55	14.97	103.0
1 500.0	1 550.00±84.37	2.74	13.98	103.0

表3 LC-MS/MS测定大鼠血浆中TFV和内标ICO的提取回收率和基质效应

Table 3 LC-MS/MS determination of extraction recovery and matrix effects of TFV and internal standard (ICO) in rat plasma

化合物	理论质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	基质效应/%	RSD/%	提取回收率/%	RSD/%
TFV	12.5	95.30±11.68	12.26	103.10±13.87	13.44
	1 500.0	90.60±2.57	2.84	96.90±1.78	1.83
ICO	5.0	101.10±4.07	4.03	92.70±5.74	6.19

表4 LC-MS/MS测定大鼠血浆中TFV的稳定性

Table 4 LC-MS/MS to determine the stability of TFV in rat plasma

储存条件	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)		准确度/%
	理论值	测定值	
室温放置4 h	12.5	12.13±1.04	97.2
	1 500.0	1 314.00±21.60	87.5
反复冻融3次	12.5	11.98±1.15	95.7
	1 500.0	1 488.00±59.80	99.1
自动进样器(4℃)放置48 h	12.5	11.43±1.56	91.5
	1 500.0	1 320.00±20.98	87.9
-20℃冻存25 d	12.5	13.83±0.40	111.0
	1 500.0	1 653.00±42.70	110.0

3.3 Y101、M8与TFV在大鼠体内的药动学研究

基于上述建立的LC-MS/MS分析方法,探究Y101和TDF联合或单独ig给药后TFV、Y101和M8的药动学变化,药时曲线见图3,相关药动学参数见表6。结果显示Y101和TDF合用后,与单独给药组比较,TFV、M8、Y101的AUC显著性升高,且CL_p显著性降低。提示两药合用发生了药物相互作用,推

测药物相互作用可能与药物的消除和排泄改变有关。

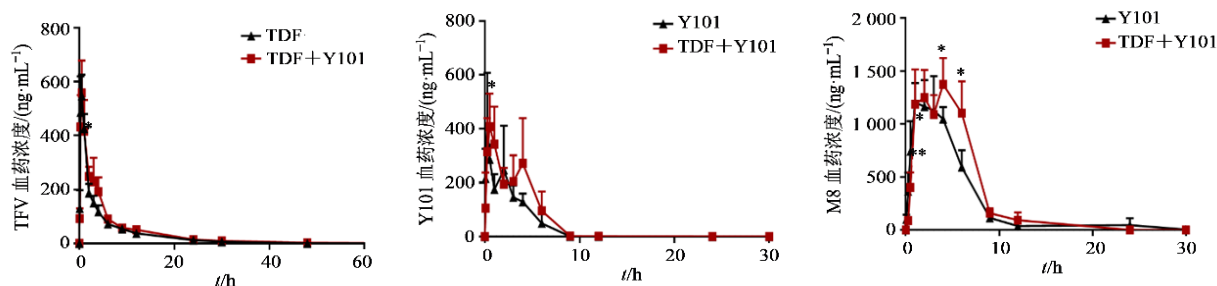
3.4 Y101、M8与TFV在体外肾切片的摄取研究

为了进一步验证药物相互作用的靶器官为肾脏,进行了肾切片摄取实验。在肾切片摄取实验中,TFV+Y101和TFV+M8组与TFV单独孵育组相比TFV的摄取均呈现下降的趋势,且TFV+M8组

表5 LC-MS/MS法测定大鼠血浆中Y101、M8的准确度和精密度

Table 5 Accuracy and precision of LC-MS/MS method for the determination of Y101 and M8 in rat plasma

化合物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)		日内精密度RSD/%	准确度/%
	理论值	测定值		
Y101	5.0	4.54±0.50	10.93	90.68
	12.5	13.20±0.80	6.08	105.50
	250.0	255.80±5.42	2.12	102.20
	1 875.0	1 767.00±37.24	2.11	93.95
M8	5.0	4.86±0.28	5.70	97.22
	12.5	11.28±0.77	6.85	90.33
	250.0	236.50±3.62	1.53	94.75
	3 750.0	3 425.00±49.70	1.45	91.38

与TDF或Y101比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs TDF or Y101图3 TDF(30 mg·kg⁻¹)和Y101(60 mg·kg⁻¹)ig给药后大鼠体内TFV、Y101及其代谢物M8的血浆药物浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=4$)Fig. 3 Plasma concentration-time profiles of TFV, Y101 and its metabolite M8 in rats after oral administration of TDF (30 mg·kg⁻¹) and Y101 (60 mg·kg⁻¹) ($\bar{x} \pm s, n=4$)表6 TDF(30 mg·kg⁻¹)和Y101(60 mg·kg⁻¹)ig给药后大鼠体内TFV、Y101和代谢物M8的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=4$)Table 6 Pharmacokinetic parameters of TFV, Y101 and metabolite M8 in rats after oral administration of TDF (30 mg·kg⁻¹) and Y101 (60 mg·kg⁻¹) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

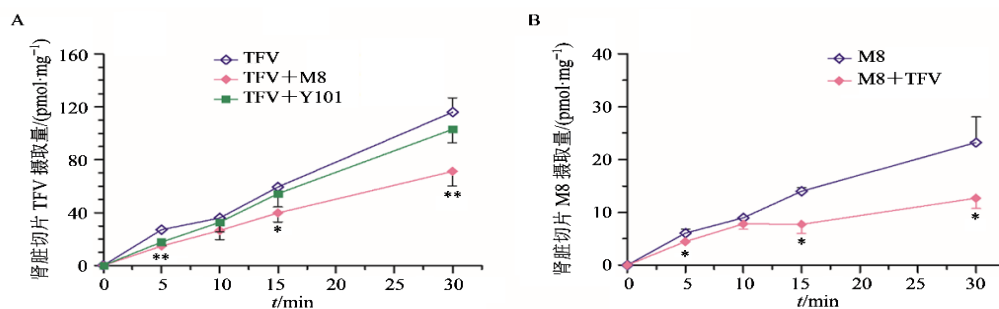
化合物	参数	单位	TDF	TDF+Y101
TFV	$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	569.00±91.77	478.67±158.50
	$t_{\max}$	h	0.40±0.14	0.50±0.00
	$\text{AUC}_{0 \sim t}$	$\text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1 911.00±201.00	2 328.00±264.20*
	$\text{AUC}_{0 \sim \infty}$	$\text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1 985.00±187.00	2 431.00±316.90*
	CL_p	$\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{kg}^{-1}$	15.21±1.36	12.46±1.63*
	$t_{1/2}$	h	7.60±1.60	7.19±1.16
化合物	参数	单位	Y101	TDF+Y101
Y101	$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	445.00±138.80	466.80±85.89
	$t_{\max}$	h	0.67±0.72	1.83±1.69
	$\text{AUC}_{0 \sim t}$	$\text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1 029.00±171.00	1 423.00±227.80**
	$\text{AUC}_{0 \sim \infty}$	$\text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1 134.00±134.90	1 634.00±302.10**
	CL_p	$\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{kg}^{-1}$	53.53±6.18	35.98±8.03*
	$t_{1/2}$	h	2.27±1.59	1.91±0.91
化合物	参数	单位	Y101	TDF+Y101
M8	$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1 334.00±195.80	1 486.00±118.00
	$t_{\max}$	h	1.80±1.30	3.00±1.41
	$\text{AUC}_{0 \sim t}$	$\text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	7 343.00±428.10	9 199.00±881.50**
	$\text{AUC}_{0 \sim \infty}$	$\text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	7 396.00±441.60	9 300.00±871.20**
	CL_p	$\text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{kg}^{-1}$	8.14±0.48	6.50±0.65**
	$t_{1/2}$	h	7.04±4.94	2.31±1.09*

与TDF或Y101比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs TDF or Y101.

的下降趋势具有显著性差异(图4-A),提示Y101的代谢产物M8会抑制TFV的肾脏摄取。另外大鼠肾切片对M8的摄取研究也发现TFV+M8组中M8摄取量显著低于M8单独孵育组(图4-B),进一步验证TFV可以抑制M8的肾脏摄取。

3.5 Y101、M8与TFV在大鼠体内的肾排泄研究

为了排除胃肠吸收的影响,采用iv给药观察两药合用后肾排泄是否发生改变,结果表明iv TDF ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)+Y101($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)与TDF、Y101单独给药组相比,TFV、Y101和M8的尿累积排泄分数均呈现下降趋势,且TFV、M8均出现显著性差异。见图5。



与TFV或M8比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs TFV or M8.

图4 大鼠肾脏切片对TFV(A)和M8(B)的摄取 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Uptake of TFV(A) and M8(B) in rat kidney slice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

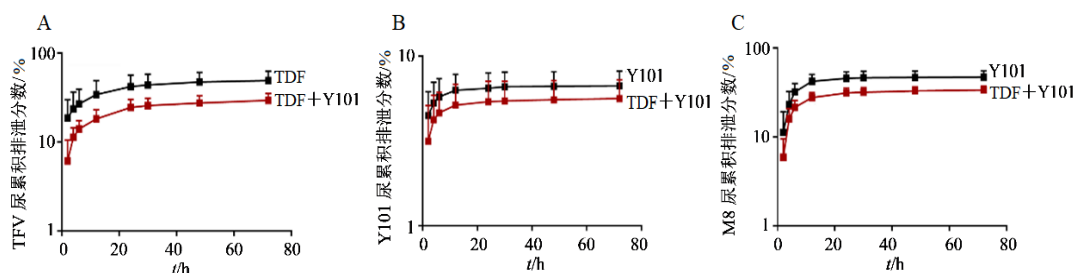


图5 大鼠iv TDF($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和Y101($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)后TFV、Y101和M8的尿累积排泄曲线 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 5 Cumulative urinary excretion profiles for TFV (A), Y101 (B), and M8 (C) in rats after intravenous administration of TDF ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Y101 ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

4 讨论

临床上TDF被广泛用于HBV感染的治疗,随着用药患者增多和长期使用,TDF存在的问题也逐渐暴露,例如TDF的长期使用导致的TFV在肾小管蓄积引起肾毒性问题^[19-20]。为了更好地治疗HBV感染患者,越来越多研究者寻求TDF的替代药物^[21-22]或联合用药^[23-25]等方法。因此,本研究着眼于临床上的联合用药疗法,探讨TDF与Y101联合用药,Y101、M8及TFV相互作用的药动学及肾排泄的变化。

首先,TDF活性代谢物TFV的油水分配系数 $\log P < 0$,属于强亲水性化合物,在反向色谱柱上不易被保留,而Y101、M8亲水性属于中等,更易被色

谱柱保留,TFV与Y101、M8的化学性质存在着较大差异,故在相同梯度程序不能最优化洗脱。为了更准确测定样品浓度数据,结合待测物的性质,对工作曲线及未知样品前处理方法也分别进行优化,采用了不同的处理方法。因此,本研究分别建立TDF代谢物TFV和Y101及其代谢物M8浓度测定的2种LC-MS/MS方法,方法学验证结果表明所建立的2种方法操作简便,灵敏度较高,准确度和精密度均符合生物样品分析相关要求^[16]。大鼠药动学实验结果显示,与单独给药组相比,Y101+TDF组中TFV、Y101、M8的AUC均显著性升高,且 CL_p 显著性下降,提示药物相互作用可能与消除或排泄改变有关。本课题组前期研究发现Y101、M8主要经由

肾脏排泄,M8是肾脏转运体OAT3的底物,且Uwai等^[26]研究证明TFV是OAT1/3的底物,能通过转运体将药物摄取进肾小管,经尿排泄。由此推测可能是TFV与Y101的酰胺水解产物M8竞争性抑制转运体OAT3,使得大鼠血浆中药物浓度呈现上升的趋势。

为了验证上述推测,排除动物体内多种因素的影响,本研究进一步开展大鼠体外肾切片摄取实验。通过肾切片对药物摄取的结果分析,发现肾切片对TFV或M8的摄取呈现时间依赖性,且TFV与M8药物合用后,肾切片对TFV或M8的摄取量均存在显著性减少的趋势,而TFV与Y101联用,肾切片对TFV的摄取并无显著性影响,提示OAT3可能是TFV和M8竞争性抑制的靶点。上述实验结果与本课题组前期^[12]研究结果(M8是hOAT3的底物,但Y101不是hOAT1和hOAT3的底物)相吻合。结合TDF和Y101在体内消除和排泄的特点,进一步探究了两药合用的药物相互作用是否与排泄有关。为避免口服吸收等因素对大鼠肾排泄的干扰,更直观地观察药物在大鼠体内的排泄情况,因此设计大鼠iv药物肾排泄的实验。结果显示TDF+Y101组中TFV、M8的累积排泄分数均显著性降低,提示TFV与代谢物M8可能竞争性抑制转运体OAT3导致药物肾排泄量减少^[27]。另外,上述研究也表明TDF与Y101联用后,可能减少药物经肾脏的摄取及肾排泄,也可能会减少TFV在肾小管细胞的蓄积,推测不会增加TFV所导致的肾毒性问题。

综合以上实验结果,发现TDF和Y101合用后可能通过代谢物TFV与M8竞争性抑制OAT3,二者通过相互竞争延缓肾脏对药物的摄取,使得药物的排泄途径受到干扰,影响代谢产物消除的进程,进而增加药动学研究中药物的血药浓度,且血药浓度的变化可能在一定程度上增强药物对病毒的抑制能力^[28-29],但未来针对TDF与Y101联合用药的DDI及作用靶点等方面还需要更多的探索研究。本研究首次阐明TDF与Y101联用后大鼠体内的药动学及肾排泄变化,为临床联合用药的DDI提供研究基础,也为临床可能的用药剂量调整提供数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 谭丽萍,臧婧蕾,谢元林.替诺福韦抗病毒治疗的相关肾损害[J].中国感染与化疗杂志,2019,19(1):107-111.
Tan L P, Zang J L, Xie Y L. Renal impairment associated with tenofovir antiviral therapy [J]. Chin J Infect
- [2] 薛晓拉,陈媛媛,王延涛,等.替诺福韦酯相关肾毒性研究进展[J].当代医学,2017,23(13):179-182.
Xue X L, Chen Y Y, Wang Y T, et al. The research progress of tenofovir disoproxil fumarate related nephrotoxicity [J]. Contemp Med, 2017, 23(13): 179-182.
- [3] 赖思敏,赖小丽,黄汐,等.核苷(酸)类似物经治序贯聚乙二醇干扰素治疗慢性乙型肝炎的荟萃分析[J].中国感染与化疗杂志,2019,19(5):489-494.
Lai S M, Lai X L, Huang X, et al. Meta-analysis of the effect of sequential pegylated interferon on chronic hepatitis B following nucleoside analog treatment [J]. Chin J Infect Chemother, 2019, 19(5): 489-494.
- [4] Han S H. Telbivudine: A new nucleoside analogue for the treatment of chronic hepatitis B [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2005, 14(4): 511-519.
- [5] Park J Y, Kim C W, Bae S H, et al. Entecavir plus tenofovir combination therapy in patients with multidrug-resistant chronic hepatitis B: Results of a multicentre, prospective study [J]. Liver Int, 2016, 36(8): 1108-1115.
- [6] 王宝莲,扈金萍,盛莉,等. HPLC-MS/MS法定量研究比格犬灌胃替诺福韦酯后替诺福韦血浆药代动力学[J].药学学报,2013,48(3):390-394.
Wang B L, Hu J P, Sheng L, et al. Pharmacokinetics of tenofovir in Beagle dogs after oral dosing of tenofovir dipivoxil fumarate using HPLC-MS/MS analysis [J]. Acta Pharm Sin, 2013, 48(3): 390-394.
- [7] 喻婉莹,黄洁,阳国平.替诺福韦的肾毒性及其遗传药理学研究状况[J].中国临床药理学杂志,2015,31(14):1459-1461,1465.
Yu W Y, Huang J, Yang G P. Research status of tenofovir on renal toxicity and pharmacogenetics [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2015, 31(14): 1459-1461, 1465.
- [8] 徐颖,黄正明,徐必学,等.苯丙氨酸二肽类化合物073对鸭乙型肝炎病毒DNA的抑制作用[J].中国新药与临床杂志,2010,29(3):217-220.
Xu Y, Huang Z M, Xu B X, et al. Effect of phenylalanine dipeptide compounds 073 on duck hepatitis B virus [J]. Chin J New Drugs Clin Remedies, 2010, 29(3): 217-220.
- [9] Meng F C, Xu W R, Li Y Z, et al. In silico molecular docking study of repensine and bentysrepinine against HBV DNA polymerase [J]. Chin Herb Med, 2015, 7(1): 39-44.
- [10] Xu B X, Huang Z M, Liu C X, et al. Synthesis and anti-hepatitis B virus activities of Matijing-Su derivatives [J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(8): 3118-3125.
- [11] Liu X X, Xue L, Zhang H, et al. Phase I, first-in-human, single and multiple ascending dose- and food-effect studies to assess the safety, tolerability and

- pharmacokinetics of a novel anti-hepatitis B virus drug, bentsyrepinine (Y101), in healthy Chinese subjects [J]. Clin Drug Investig, 2020, 40(6): 555-566.
- [12] Zhang A J, Yang F L, Yuan Y, et al. OAT3 participates in drug-drug interaction between bentsyrepinine and entecavir through interactions with M8-a metabolite of bentsyrepinine-In rats and humans *in vitro* [J]. Molecules, 2023, 28(4): 1995.
- [13] Fan H R, Zhang A J, Liao C P, et al. *In vitro* metabolism and *in vivo* pharmacokinetics of bentsyrepinine (Y101), an investigational new drug for anti-HBV-infected hepatitis: Focus on interspecies comparison [J]. Xenobiotica, 2020, 50(4): 468-478.
- [14] Sun J, Mishra J, Yang M Y, et al. Hypothermia prevents cardiac dysfunction during acute ischemia reperfusion by maintaining mitochondrial bioenergetics and by promoting hexokinase II binding to mitochondria [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 4476448.
- [15] 张爱杰, 杨帆龙, 赵鹿, 等. 维拉帕米对替芬泰大鼠体内药代动力学的作用 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(8): 1122-1127.
- Zhang A J, Yang F L, Zhao L, et al. Effects of verapamil on pharmacokinetics of Y101 *in vivo* in rats [J]. Chin Pharmacol Bull, 2021, 37(8): 1122-1127.
- [16] Jia H Y, Yu G D, Yu J, et al. Immunomodulatory and antiviral therapy improved functional cure rate in CHB patients with high HBsAg level experienced NA [J]. J Clin Transl Hepatol, 2023, 11(5): 1003-1010.
- [17] Fung S, Kwan P, Fabri M, et al. Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) vs. emtricitabine (FTC)/TDF in lamivudine resistant hepatitis B: A 5-year randomised study [J]. J Hepatol, 2017, 66(1): 11-18.
- [18] Orkin C, Squires K E, Molina J M, et al. Doravirine/lamivudine/tenofovir disoproxil fumarate (TDF) versus efavirenz/emtricitabine/TDF in treatment-naive adults with human immunodeficiency virus type 1 infection: Week 96 results of the randomized, double-blind, phase 3 DRIVE-AHEAD noninferiority trial [J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(1): 33-42.
- [19] Biesecker G, Karimi S, Desjardins J, et al. Evaluation of mitochondrial DNA content and enzyme levels in tenofovir DF-treated rats, Rhesus monkeys and woodchucks [J]. Antiviral Res, 2003, 58(3): 217-225.
- [20] Rodríguez-Nóvoa S, Labarga P, D'Avolio A, et al. Impairment in kidney tubular function in patients receiving tenofovir is associated with higher tenofovir plasma concentrations [J]. AIDS, 2010, 24(7): 1064-1066.
- [21] de Clercq E. Tenofovir alafenamide (TAF) as the successor of tenofovir disoproxil fumarate (TDF) [J]. Biochem Pharmacol, 2016, 119: 1-7.
- [22] Di Perri G. Tenofovir alafenamide (TAF) clinical pharmacology [J]. Infez Med, 2021, 29(4): 526-529.
- [23] Bi Z Y, Wang L, Hou H X, et al. Comparing the efficacy and safety of tenofovir and adefovir or combined drug treatment for the treatment of chronic hepatitis B infection: A systematic review and meta-analysis [J]. Ann Transl Med, 2022, 10(18): 1016.
- [24] Matthews G V, Seaberg E, Dore G J, et al. Combination HBV therapy is linked to greater HBV DNA suppression in a cohort of lamivudine-experienced HIV/HBV coinfecting individuals [J]. AIDS, 2009, 23(13): 1707-1715.
- [25] 郭香娟, 王敏, 张洪涛. 乙肝舒康胶囊联合替诺福韦治疗慢性乙型肝炎的疗效及其对免疫功能的影响 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(4): 789-793.
- Guo X J, Wang M, Zhang H T, et al. Efficacy of Yigan Shukang Capsules combined with tenofovir in treatment of chronic hepatitis B and its effect on immune function [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(4): 789-793.
- [26] Uwai Y, Ida H, Tsuji Y, et al. Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2) [J]. Pharm Res, 2007, 24(4): 811-815.
- [27] Liu S N, Desta Z, Gufford B T. Probenecid-boosted tenofovir: A physiologically-based pharmacokinetic model-informed strategy for on-demand HIV preexposure prophylaxis [J]. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2020, 9(1): 40-47.
- [28] Mu Y, Pham M, Podany A T, et al. Evaluating emtricitabine + rilpivirine + tenofovir alafenamide in combination for the treatment of HIV-infection [J]. Expert Opin Pharmacother, 2020, 21(4): 389-397.
- [29] Schinazi R F, Bassit L, Clayton M M, et al. Evaluation of single and combination therapies with tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine *in vitro* and in a robust mouse model supporting high levels of hepatitis B virus replication [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(12): 6186-6191.

[责任编辑 刘东博]