

# 雷洛昔芬与法匹拉韦药物联用对法匹拉韦体内药代动力学的研究

张力婧<sup>1,2</sup> 杨孟孟<sup>2</sup> 包欢<sup>1</sup> 李飞<sup>1</sup>

1 辽宁石油化工大学 石油化工学院, 辽宁抚顺, 113001;

2 军事医学研究院国家安全特需药品全国重点实验室, 北京, 100850;

**摘要:** 法匹拉韦 (Favipiravir, T705) 在体内易受醛氧化酶 (AO) 介导而氧化失活, 极大限制了其临床应用价值。雷洛昔芬 (Raloxifene, RAL) 作为一种强效 AO 抑制剂, 能抑制 T705 的代谢失活过程, 提高其体内暴露水平。本研究目的探究 RAL 预给药对小鼠体内 T705 药代动力学的影响, 采用液相色谱—串联质谱 (LC-MS/MS) 法对小鼠全血中 T705 进行定量分析, 并基于二室模型计算药代动力学参数。研究结果表明, RAL 与 T705 药物联用策略显著提高 T705 的体内生物利用度。

**关键词:** 法匹拉韦; 雷洛昔芬; 醛氧化酶; 药物联用; 药代动力学; 生物利用度

**DOI:** 10.69979/3029-2808.26.03.059

## 引言

T705 为 RNA 聚合酶 (RdRp) 抑制剂类广谱抗病毒药, 用于成人流感治疗, 对诸如病毒、SARS-CoV-2、狂犬病毒等多种 RNA 病毒具潜在抗病毒活性, 在疫情防控中具有重要作用<sup>[1-6]</sup>。其进入细胞后经宿主酶转化为活性形式 T705-RTP, 作为嘌呤类似物结合病毒 RdRp, 抑制 RNA 复制并诱导致死突变, 阻断病毒增殖<sup>[7]</sup>。醛氧化酶 (AO) 是动物体内高度保守的钼-黄素蛋白, 参与含氮杂环类药物 I 相代谢<sup>[8-11]</sup>。T705 体内仅约 0.2% 经肾脏直接排泄, 85% 以上在肝脏经 AO 氧化为失活产物 T705-M1 排出<sup>[12]</sup>, 致使其给药剂量偏高。选择性雌激素受体调节剂 RAL 可强效抑制 AO (IC<sub>50</sub>=2.9 nM), 体外对多种底物抑制常数达低纳摩尔级<sup>[13]</sup>, 结构生物学证实其通过底物通道入口与 AO 紧密结合发挥抑制作用<sup>[14]</sup>。本研究拟采用 RAL 与 T705 联用, 探究 RAL 预处理对 T705 体内药代动力学的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品、主要试剂和仪器

法匹拉韦 (T705)、雷洛昔芬 (RAL)、聚乙二醇 (PEG400) 及内标格列吡嗪 (均 >99%) 购自百灵威; HPLC 级甲酸 (安徽泽升)、乙腈 (Thermo Fisher), 实验用水为娃哈哈纯净水; 仪器包括 DGU-20A3 液相色谱仪、LCMS8050 质谱仪、Thermo Fresco 21 离心机、phenomenex C18 柱, 数据经岛津 LabSolution 软件处理。

### 1.2 实验动物

雄性 KM 小鼠 (28 - 38 g) 购自北京维通利华 (SCXK[京]2021-0011), 饲养于 22 - 25 °C、湿度 40% - 70%

环境, 自由摄食饮水; 动物实验经军事医学研究院伦理委员会批准 (IACUC-DWZX-2025-678)。

### 1.3 LC-MS/MS 方法学验证

#### 1.3.1 LC-MS/MS 条件

色谱条件: phenomenex C18 柱, 流动相 A: 0.01% 甲酸水溶液, B: 0.1% 甲酸乙腈溶液; 梯度洗脱: 0.0 - 0.5 min, 1%B; 0.5 - 1.8 min, 1% - 90%B; 1.8 - 3.0 min, 90%B; 3.0 - 3.1 min, 90% - 1%B; 3.1 - 4.1 min, 1%B。流速 0.6 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL。质谱条件: ESI 正离子模式, 离子喷雾电压 -15 V, 碰撞气 270 kPa, 雾化气 3 L · min<sup>-1</sup>, DL 温度 250 °C, 加热气 10 L · min<sup>-1</sup>, 干燥气 10 L · min<sup>-1</sup>。

表 1 T705 以及内标格列吡嗪的质谱分析参数

化合物	m/z		Q1(V)	CE	Q3(V)
	母离子	子离子			
格列吡嗪	446.30	321.15	-10	-15	-15
T705	158.03	141.05	-21	-13	-15
	158.03	113.05	-13	-12	-29

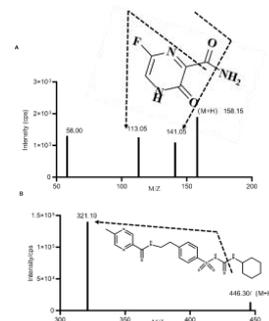


图 1 T705 以及内标格列吡嗪的二级质谱图

1.3.2 特异性

20 μL A (空白小鼠全血), B (空白小鼠全血加 10 ng · mL<sup>-1</sup> 格列吡嗪), C (空白小鼠全血加 1000 μM T705 工作液), 分别加入 20 μL 空白乙腈。

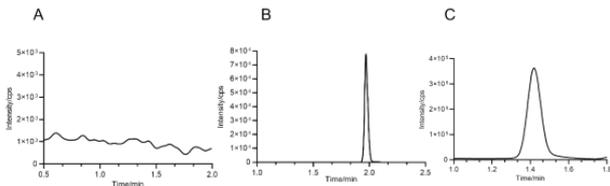


图2 T705 与内标格列吡嗪在 KM 小鼠 (A、B、C) 全血样品中的色谱图

1.3.3 标准曲线和检测限

取空白 KM 小鼠全血 20 μL, 加 20 μL 不同浓度 T705 及 200 μL 含 10 ng · mL<sup>-1</sup> 格列吡嗪乙腈溶液, 配制成 2、10、20、50、100、200、500、1000 μM 系列样品, 同时设空白与含内标样品。涡旋后加入 100 μL 10 ng · mL<sup>-1</sup> 内标, 再涡旋 1 min, 18800 g、4 °C 离心 10 min。取上清 40 μL, 加 160 μL 50%乙腈水溶液, 进样 5 μL, LC- MS/MS 测定。T705 在 2 - 1000 μM 内线性良好, 回归方程 Y=0.0037X- 0.0068, r<sup>2</sup>=0.9999,

RSD 符合要求, LOQ 与 LOD 均为 2 μM。

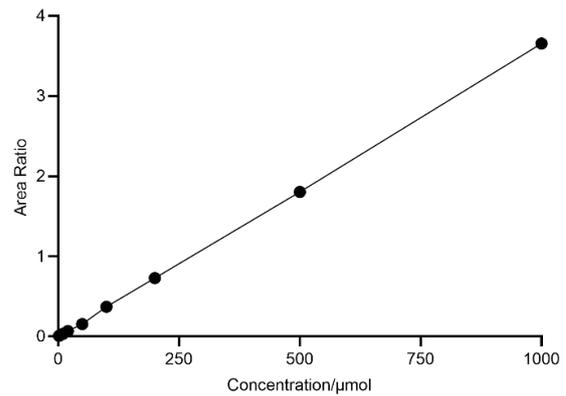


图3 KM 小鼠全血样品中 T705 的标准曲线

1.3.4 精密度和准确度

分别测定 T705 低、中、高 (5、200、800 μM) 和检测下限 2 μM 这 4 个浓度全血样品, 每个浓度重复 6 份, 以考察日内精密度和准确度。每日 1 批, 连续分析 3 日, 以考察日间精密度和准确度。结果表明, 批内和批间精密度和准确度分别在 9.62% 和 9.49% 以内, 准确度控制在 ±8.67% 以内。

表 2 T705 在 KM 小鼠全血中的批内、批间精密度和准确度 (n=6)

浓度 (μM)	批内 (n=6)						批间 (n=18)	
	RE (%)	RSD (%)	RE (%)	RSD (%)	RE (%)	RSD (%)	RE (%)	RSD (%)
2	3.93	5.57	-3.80	4.90	-2.47	6.18	-0.78	6.31
5	6.02	8.48	-8.08	6.74	-3.95	7.27	-2.01	9.49
200	1.3	9.62	-8.67	5.35	-6.25	9.60	-4.56	9.24
800	4.03	8.11	-6.37	3.76	-6.42	3.61	-2.92	7.54

1.3.5 回收率和基质效应

取 6 只空白 KM 小鼠全血 20 μL, 配制低、中、高 3 个浓度质控样品各 6 份, 按全血前处理测定 T705 峰面积, 与同浓度标准品加至蛋白沉淀后全血的峰面积比计算回收率。另取全血 25 μL, 经蛋白沉淀后加入低、高

浓度 T705 标准品, 同法处理纯水样品, 以两者峰面积比计算基质效应。结果显示, 回收率为 96.87% - 107.48%, 基质效应为 95.63% - 99.9%, 基质效应变异度 2.32% - 6.44%, 均符合方法学要求。

表 3 T705 在 KM 小鼠全血中的回收率和基质效应 (n=6)

浓度 (μM)	提取回收率 (%)	提取回收率 RSD (%)	基质效应 (%)	基质效应 RSD (%)
5	96.87±6.24	6.44	99.9±6.1	6.11
200	107.48±4.88	4.54	/	/
800	100.35±2.33	2.32	95.63±4.57	4.78

1.3.6 稳定性

取空白 KM 小鼠全血 20 μL, 配制低、中、高浓度

样品, 考察室温 4 h、4 °C 24 h、-20 °C 14 d 稳定性, 以新鲜样品为参比计算相对浓度。

表 4 T705 在 KM 小鼠全血样品的稳定性 (n=3)

浓度 (μM)	室温放置 4 h		4°C 放置 24 h		-20°C 保存 14 d	
	RE%	RSD%	RE%	RE%	RE%	RSD%
5	104.43±6.55	6.27	98.57±1.04	1.06	87.43±1.51	1.73
200	92.53±5.53	5.98	92.3±1.32	1.43	92.83±0.78	0.84
800	87.73±2.64	3.01	104.83±4.26	4.06	85.53±0.49	0.57

1.4 实验流程

精密称定受试药, 以 5%PEG400 溶解并加等体积蒸

馏水,配成 T705、RAL 均为  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  混悬液。小鼠随机分 2 组, 每组 3 只; 实验组先口服  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  RAL, 10 min 后予  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  T705, 对照组仅予  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  T705, 单次给药体积 0.2 mL。于给药后 5、15、30 min 及 1、2、4、8、12 h 采血, 取 20  $\mu\text{L}$  血样加 120  $\mu\text{L}$  沉淀剂备用, 按 T705 全血方法测定, 采用二室模型计算药代动力学参数。

## 2 结果

### T705 药代动力学参数

经二室模型拟合, 与对照组相比, 实验组 T705 的 AUC<sub>0-t</sub> 增加 54.69%, AUC<sub>0-∞</sub> 增加 57.46%; T<sub>max</sub> 缩短 59.95%, C<sub>max</sub> 增加 42.28%, 提示 T705 吸收速率加快, 生物利用度显著提升。

表 5 实验组小鼠和对照组小鼠全血中 T705 的主要药代动力学参数

参数	单位	实验组					对照组				
		1	2	3	mean	SD	1	2	3	mean	SD
AUC <sub>0-t</sub>	ng·h·L <sup>-1</sup>	59438	56627	101864	72643	25345	59878	39697	41305	46960	11216
AUC <sub>0-∞</sub>	ng·h·L <sup>-1</sup>	62494	60675	105928	76366	25618	61167	40406	43941	48504	11107
T <sub>1/2</sub>	h	2.574	2.941	2.575	2.697	0.212	2.101	1.977	3.652	2.577	0.933
T <sub>max</sub>	h	0.500	0.500	0.250	0.417	0.144	1.000	0.500	0.500	0.667	0.289
V <sub>z</sub>	L·kg <sup>-1</sup>	0.594	0.699	0.351	0.548	0.179	0.496	0.706	1.199	0.8	0.361
C <sub>max</sub>	ng·L <sup>-1</sup>	19900	20400	26000	22100	3387	16000	14700	15900	15533	723

## 3 总结

本文建立的 LC-MS/MS 法可定量全血 T705, 分析快、峰形好, 适用于小体积动物药代研究。联用 RAL 后, 小鼠全血 T705 的 C<sub>max</sub> 与生物利用度显著升高, T<sub>max</sub> 缩短, 吸收加快。机制上, RAL 可抑制 AO 介导的 T705 氧化失活, 亦可通过吸收、分布及转运体影响其体内过程。该研究证实联用可提高 T705 暴露量并加速达峰, 为给药优化提供依据, 临床价值尚需验证。本研究存在样本量小、单剂量单性别动物等局限, 后续建议扩大样本、设置梯度、纳入雌雄及多给药方案研究。

### 参考文献

- [1] 赵旭, 周辛波, 钟武, 等. 抗病毒药物——法匹拉韦 [J]. 临床药物治疗杂志, 2015, 13(04): 16-20.
- [2] Sissoko D, Laouenan C, Folkesson E, et al. Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea [J]. Plos Medicine, 2016, 13(3).
- [3] Furuta Y, Gowen B B, Takahashi K, et al. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor [J]. Antiviral Research, 2013, 100(2): 446-54.
- [4] Wang YM, Zhong W, Salam A, et al. Phase 2a, open-label, dose-escalating, multi-center pharmacokinetic study of favipiravir (T-705) in combination with oseltamivir in patients with severe influenza [J]. Ebiomedicine, 2020, 62.
- [5] Banyard A C, Mansfield K L, Wu G H, et al.

Re-evaluating the effect of Favipiravir treatment on rabies virus infection [J]. Vaccine, 2019, 37(33): 4686-93.

[6] Doi Y, Hibino M, Hase R, et al. A Prospective, Randomized, Open-Label Trial of Early versus Late Favipiravir Therapy in Hospitalized Patients with COVID-19 [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020, 64(12).

[7] Naydenova K, Muir K W, Wu L F, et al. Structure of the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase in the presence of favipiravir-RTP [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(7).

[8] Coelho C, Mahro M, Trincao J, et al. The First Mammalian Aldehyde Oxidase Crystal Structure INSIGHTS INTO SUBSTRATE SPECIFICITY [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(48): 40690-702.

[9] Garattini E, Fratelli M, Terao M. The mammalian aldehyde oxidase gene family. Hum Genomics. 2009 Dec; 4(2):119-30.

[10] Terao M, Garattini E, Romao M J, et al. Evolution, expression, and substrate specificities of aldehyde oxidase enzymes in eukaryotes [J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(16): 5377-89.

[11] Garattini E, Terao M. The role of aldehyde oxidase in drug metabolism [J]. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2012, 8(4):

487-503.

[12]Hayden F G, Lenk R P, Epstein C, et al. Oral Favipiravir Exposure and Pharmacodynamic Effects in Adult Outpatients With Acute Influenza [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2023, 230(2): e395-e404.

[13]Obach R S, Huynh P, Allen M C, et al. Human liver aldehyde oxidase: Inhibition by 239 dr

ugs [J]. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2004, 44(1): 7-19.

[14]Mota C, Diniz A, Coelho C, et al. Interrogating the Inhibition Mechanisms of Human Aldehyde Oxidase by X-ray Crystallography and NMR Spectroscopy: The Raloxifene Case [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(17): 13025-37.