

放射性同位素标记策略在人体物质平衡试验中的应用进展

何伊菲^{1,2}, 郑元东¹, 钟大放^{1*}, 刁星星^{1,2*}

(1. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 2. 中国科学院大学, 北京 101408)

摘要: 物质平衡试验是新药研发过程的一项关键研究, 旨在揭示药物在人体内的代谢和排泄路径。目前, 人体物质平衡试验主要利用放射性同位素标记技术进行, 国内外药品监督管理机构已相继发布了相关的研究草案和指导原则, 以鼓励并指导工业界按规范进行研究。放射性标记位点的选择对于获得药物代谢的关键信息极为重要。然而, 体内生物转化可能会导致药物分子结构的部分断裂, 从而使未标记部分的代谢产物信息丢失。使用不同放射性标记位点的药物分开给药或混合给药, 或在一个分子中同时标记多个放射性同位素, 可以有效解决这一问题。本文回顾了相关的技术进展, 分析了放射性同位素标记策略, 并对多个放射性标记位点药物在人体物质平衡试验中的应用进行了讨论。

关键词: 物质平衡; 放射性标记; 同位素示踪技术; 药物代谢; 人体放射性试验

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)09-2470-14

Application progress of radiolabeling strategies in human mass balance studies

HE Yi-fei^{1,2}, ZHENG Yuan-dong¹, ZHONG Da-fang^{1*}, DIAO Xing-xing^{1,2*}

(1. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China)

Abstract: Human mass balance study is a pivotal research in the field of clinical pharmacology, aiming at elucidating the metabolic and excretion pathways of drugs in humans. Currently, human mass balance studies predominantly employ radiolabeling techniques. Recently, both the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the Center for Drug Evaluation (CDE) of the China National Medical Products Administration (NMPA) issued related research drafts and guidelines to encourage and guide the pharmaceutical industry to conduct research in compliance with established standards. The selection of radiolabeling sites is crucial for obtaining critical information on drug metabolism. However, *in vivo* biotransformation may lead to partial disintegration of the molecular structure, thereby resulting in the loss of metabolic product information of the unlabeled moiety. Administering drugs with different radiolabeling sites separately or in combination, or labeling multiple radioactive isotopes within one molecule, can effectively solve this problem. This article reviews relevant technological progress, analyzes radiolabeling strategies, and discusses the application of drugs with multiple radiolabeling sites in human mass balance studies.

Key words: mass balance; radiolabeling; isotope tracing technology; drug metabolism; human radioactive trials

人体物质平衡试验是药物研发过程中不可或缺的

关键环节, 用于研究新药在人体内的吸收、代谢和排泄 (AME)^[1]。近年来, 人体物质平衡试验在新药研发中的地位日益重要, 为确定药物的代谢及排泄途径、评估绝对生物利用度和生物转化提供了至关重要的信息^[2,3]。

收稿日期: 2024-04-18; 修回日期: 2024-06-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82373938).

*通讯作者 E-mail: xxdiao@simm.ac.cn; dfzhong@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0378

继美国食品药品监督管理局 (FDA) 于 2022 年 5 月发布《人体放射性标记物质平衡研究临床药理学考量 (草案)》^[4]后, 我国国家药品监督管理局药品审评中心 (CDE) 于 2024 年 1 月发布了《放射性标记人体物质平衡研究技术指导原则》^[5], 标志着我国在该领域的规范化和快速发展。十年来, 放射性标记人体物质平衡研究在我国的开展数量显著增加, 截至 2024 年 3 月 31 日, 我国 CDE 临床试验登记平台已累计登记超过 110 个放射性人体物质平衡试验。已有文献综述了放射性标记药物物质平衡及生物转化临床研究的方法和步骤^[6-8]。

欧洲药品管理局 (EMA) 和美国 FDA 发布的人体物质平衡试验指导原则草案, 都强调了在进行药物研究时, 选择化学和代谢稳定的位点进行放射性标记的重要性, 并指出在必要时使用多个不同的放射性标记策略来追踪药物的体内过程^[4,9]。虽然我国目前还没有采用多个放射性标记的案例, 但随着药物分子设计的发展, 特别是对于那些具有更大分子量的新型小分子药物, 如蛋白降解靶向嵌合体 (PROTAC), 多标记位置的选择变得尤为重要。PROTAC 等新型药物通常涉及复杂的代谢途径和多个潜在的活性形式^[10,11]。因此,

使用多个放射性标记可以帮助研究人员更准确地追踪这些药物在体内的行为和生物转化, 使用多个放射性标记的方法有可能成为未来的一种趋势, 尤其是解决复杂的药物代谢。

本文旨在综述相关技术进展, 深入分析放射性同位素标记策略, 并探讨在人体物质平衡试验中应用多个放射性标记策略的潜力与挑战。

1 人体物质平衡试验的分析方法

近年来, 液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS)、加速器质谱 (AMS)、氟-核磁共振 (F-NMR) 和电感耦合等离子体-质谱法 (ICP-MS) 等先进技术显著提升了人体物质平衡研究的精确度和效率^[12-15]。这些技术不仅为药物开发过程中的安全性和经济性评估提供了可靠的支持, 而且还为药物的代谢特性和行为分析开辟了新的研究途径。图 1 总结了关于人体物质平衡试验的法规指南和重要技术的发展历程。

1.1 非放射性技术 LC-MS/MS 技术在药物分析领域中扮演着至关重要的角色, 通过结合高效液相色谱的分离能力和质谱的检测灵敏度, LC-MS/MS 使得科学家能够对药物及其代谢产物进行快速、准确的定性和定量分析^[16,17]。LC-MS/MS 的优势在于其不依赖于

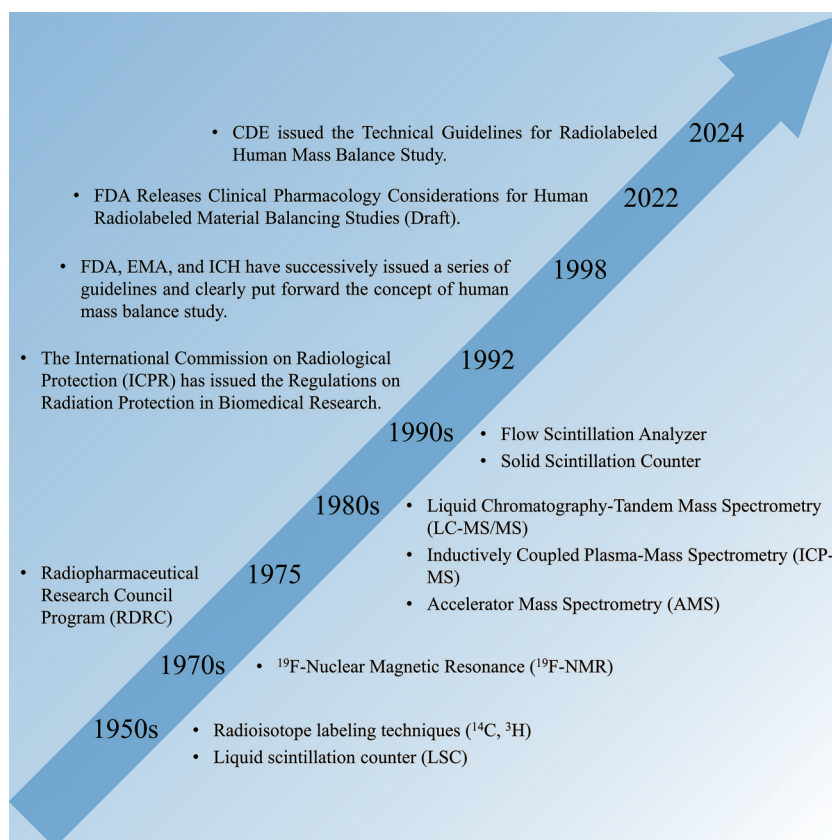


Figure 1 Time table describing the progression of guidelines and methodologies in human mass balance study: above the timeline arrow on the left are significant guidance and regulatory milestones, while below the timeline arrow on the right are the emergence of various techniques

化合物的放射性或荧光标记,从而避免了标记过程可能引入的偏差和复杂性^[18]。LC-MS/MS 提供了高通量的分析能力,使其成为药物代谢研究和药物监测的首选方法。然而质谱对代谢物的响应往往有很大差异,并且不同的基质可能会对分析结果产生干扰,故 LC-MS/MS 在分析多个基质中的代谢物时面临挑战。

对于结构中含氟原子的药物,¹⁹F-NMR 和 ICP-MS 技术为药物分析提供了有力的替代方法^[19]。¹⁹F-NMR 利用氟原子在 NMR 中的独特性质,能够提供关于药物及其代谢物的详细信息,而不受化学结构和基质变化的影响^[20,21]。因此,¹⁹F-NMR 可以用于量化未标记的代谢物及其下游产物,尤其是在放射性标记不可行或不希望使用时,¹⁹F-NMR 是一种理想的工具^[22,23]。然而¹⁹F-NMR 样品处理过程的复杂性是一个考虑因素,需要精确的提取、干燥和氘水复溶等步骤,这直接影响了分析的总体时间和成本。此外,¹⁹F-NMR 的灵敏度相对有限,而环境中的氟元素可能产生干扰,这限制了其在常规应用中的使用。

ICP-MS 则可以分析含氟化合物以外的其他卤素元素(氯、溴、碘)^[24,25]。ICP-MS 受益于与液相色谱相对容易耦合,具有元素选择性、高灵敏度和独立于结构的响应特性,使其成为药物代谢研究中一种可能的替代检测技术。总之,¹⁹F-NMR 和 ICP-MS 为药物开展人体物质平衡试验分析提供了新的可能性,但在实际应用中需要权衡其优势和操作上的挑战。

1.2 放射性技术 放射性同位素标记技术是药物代谢研究中的一重要工具,科学家通过在药物分子中引入放射性同位素(如¹⁴C 或³H)来追踪药物及其代谢产物在体内的动态^[26,27]。放射性标记药物或代谢物能释放出 β 射线,通过液体闪烁计数器(LSC)和流动液闪仪等现代放射性检测设备检测,为研究者提供了一种强有力的手段来详细了解药物的代谢特性和行为^[28,29]。

放射性标记技术特别适用于代谢途径广泛、结构复杂、产生多种代谢物,以及那些在质谱和紫外光检测中响应较差的化合物^[30-32]。放射性标记技术被认为是研究药物在体内物质平衡、组织分布和代谢物谱分析的黄金标准,它能够定量地反映代谢物的比例,并专一地追踪特定的化学物质或生物分子^[33,34]。美国 FDA 和我国 CDE 推荐所有小分子创新药物在临床研究中使用时放射性标记技术,当需要关注代谢物的安全性以及在稳态时血浆中总暴露量超过 10% 的代谢物时,放射性标记技术成为获取这些关键信息的有效手段。

此外,AMS 作为一种高灵敏度的放射性同位素检测技术,能够在极低的剂量水平下测量放射性同位素,

在药物代谢研究中发挥重要作用^[35,36]。AMS 技术的应用可以显著减少受试者的放射性暴露,同时检测极低放射性剂量的放射性物质。然而,由于样本制备过程耗时且复杂,加上设备成本高昂,AMS 技术的应用尚未在药物代谢研究领域得到广泛普及。未来随着技术的进步和成本的降低,AMS 有望在药物代谢研究中扮演更加重要的角色。

2 放射性同位素标记的策略

2.1 放射性核素种类 在药物 ADME 研究中,可用的放射性同位素包括¹⁴C、³H、³²P、³³P、³⁵S、¹²⁵I、¹³¹I 等^[37]。在人体物质平衡研究中,低能量的¹⁴C 和³H 是最常用的放射性核素,能够无干扰地整合进药物分子,且它们发出的 β 射线辐射弱,易于防护^[38]。¹⁴C 和³H 的半衰期分别为 5 730 年和 12.35 年,由于半衰期长,在实验周期中测得的数据一般不需要作物理半衰期的校正,便于测量和结果计算。

在放射性标记核素的选择上,¹⁴C 通常因其稳定性而被优先考虑,不仅可以提供准确的代谢轨迹,而且由于其化学性质的稳定性使得在体内环境下不易发生变化^[39]。相比之下,³H 标记虽然合成过程简单,但在体内可能与水分子发生质子交换,导致比活度下降,影响研究结果的准确性^[40]。因此,除非有确凿的证据表明在体内环境下不会发生³H-¹H 交换,否则一般不建议使用³H 标记。然而,对于一些天然药物,由于合成路线的复杂性,³H 标记可能是唯一可行的选择。³H 的高比活度为放射性检测提供了更高的灵敏度,对于追踪微量代谢物更为有利。

此外,一旦在化合物中标记放射性同位素,由于质量增大导致化学键强度增大,可能会直接影响化合物的代谢过程,即动力学同位素效应。相对于¹⁴C,³H 展现出更为显著的同位素效应。研究指出,当¹H 被²H 取代时,化合物的代谢动力学特征会受到质子替换效应的影响^[41-45]。如果将³H 替换¹H,同位素效应则会更显著。值得注意的是,这种效应只会影响代谢中会变化的部位。因此,若标记位于化合物骨架中一个稳定的位置,即在代谢过程中不会发生键断裂的部分,将很少受到动力学同位素效应的干扰,同时标记元素也不会流失,因此在代谢过程中将保持其示踪功能。

在临床前研究中,³H 标记合成简单且具有较高的灵敏度,因此³H 的使用较为普遍;但随着药物开发进入后期,由于¹⁴C 具有更好的稳定性和精准性,因此大约 95% 的候选药物更倾向于使用¹⁴C 标记。这种趋势反映了研究者在进行长周期的药物代谢研究和临床试验时,对稳定性、精确性以及试验结果可靠性的高度重视。

2.2 放射性标记位置 在药物代谢研究中,选择放射性标记的位置需要综合考虑多个因素。首先,合成难度是一个重要的考量点,但同样重要的是药物的化学和生物学特性,以及初步的生物转化实验结果。选择分子中化学结构稳定的部位作为标记位置,可以防止放射性标记在体内过早脱落,从而影响研究结果的准确性。

理想的标记位点应当具有高度的代谢稳定性,这意味着它能够在药物的主要代谢路径中保持不变,即使在药物经历广泛的生物转化过程时也不会丢失。如果母体化合物在代谢过程中因化学键断裂同时生成两个重要代谢产物,则需要考虑使用多个放射性标记策略。同时,这样的标记位点不应该影响药物的生物活性,也不应该干扰药物与其作用靶点之间的相互作用,确保放射性标记不会改变药物的原有药理作用和安全性。

在合成路径的优化方面,选择标记位置也应考虑到整个合成过程的经济性和环保性。在可能的情况下,应该在合成的后期步骤中引入 ^{14}C 和 ^3H ,这样做可以减少整个合成过程中的步骤数量,降低放射性废物的产生,从而减轻对环境的影响^[38]。通常,放射性标记位点应选在分子母核的稳定碳原子上,例如芳香环或脂环,其标记位点在药物的生物转化过程中相对稳定,而尽可能避免在羧基、羟基、氨基等活性部位进行标记。

综上所述,放射性标记位置的选择是一个复杂的决策过程,它需要基于药物的化学结构、生物学特性、代谢稳定性,以及合成路线的优化等多个方面进行综合考量并最终选择。

2.3 单一放射性标记的药物 单一放射性标记的药物指的是在药物分子中,仅有一个原子位置被放射性同位素(如 ^{14}C 或 ^3H)替代。在国内,已有多种小分子药物采用了单一放射性标记策略开展人体物质平衡试验,其中,康替唑胺(contezolid)^[46]、呋喹替尼(fruquintinib)^[47]、吡咯替尼(pyrotinib)^[48]、索凡替尼(surufatinib)^[49]、环泊酚(ciprofol)^[50]、恩沙替尼(ensartinib)^[51]、林普利塞(linperlisib)^[52]、达尔西利(dalpiciclib)^[53]、泰吉利定(tegileridine)^[54]、安罗替尼(anlotinib)^[55]、氟唑帕利(fuzuloparib)^[56]、伏美替尼(furmonertinib)^[57]等已获批上市。通过对这些药物的放射性标记位点进行总结,可以更好地理解不同类型药物的代谢特性^[7]。

2.4 多个放射性标记的药物 在药物代谢研究中,单一放射性标记策略有时无法提供关于药物代谢的完整信息。特别是当药物分子在体内发生断裂时,放射性标记可能会丢失,导致无法追踪到未标记部分发生的

代谢反应。为了解决这一问题,研究人员提出了在人体物质平衡试验中使用多个放射性标记的策略^[58]。这种方法包括在药物分子的不同位置上引入多个放射性同位素,如 ^{14}C 和 ^3H ,使得每个标记位点发出不同的放射性信号。通过检测这些信号,研究人员可以区分不同的代谢产物和途径,以及药物在不同组织和器官中的分布浓度。放射性标记的数量和位置的选择通常会根据药物在体内是否分裂成两部分或更多部分来决定。

在国际上,已经有多个使用多放射性标记位点的人体物质平衡研究案例,这些案例涵盖了包括抗癌、抗糖尿病、抗高血压、抗病毒在内的多种药物的研发,不仅阐明了药物的代谢产物和途径,还揭示了新的代谢现象和机制,如药物的肠肝循环以及肠道微生物的代谢作用,为药物的临床开发和应用提供了宝贵的信息和指导。

3 多个放射性标记策略的应用与分析

多个放射性标记的策略意味着在药物分子的不同位置引入放射性同位素,即使在复杂的生物转化过程中,药物分子的每个部分也能被精确地监测和定量。这种策略的优势在于,研究人员可以在单个研究中评估药物的ADME特性。例如,使用 ^{14}C 标记的药物可追踪整个分子,而 ^3H 标记则可用于监测药物的特定部分或代谢途径,这样的组合有助于揭示药物分子内部相互作用和代谢途径的详细情况,为药物研发提供了更深入的理解。因此,对多个放射性标记策略的总结和评估对于指导实验设计和提高研究效率具有重要价值,可以更全面地评估药物的药理特性,加速药物从实验室到临床应用的转化过程。

在人体物质平衡试验中选择采取多个放射性标记策略时,可以采取不同的方法:单独给予 ^3H 和/或 ^{14}C 标记的化合物,或以混合物的形式给药,甚至将放射性标记组合在一个分子中。本文详细地列举了这些策略在人体物质平衡试验中的应用情况。目前, $^{14}\text{C}+^{14}\text{C}$ 的组合是最常见的策略,包括分开给药、混合给药或标记应用到同一分子的策略均有相应的人体试验案例;然而, $^{14}\text{C}+^3\text{H}$ 组合在人体物质平衡试验中的应用仅有一例^[59],更多的情况是出现在临床前研究或方法学研究中。

3.1 分别单独给予 ^{14}C 和 ^{14}C 不同标记的药物 Pomotrelvir是一种病毒复制抑制剂和3CLp小分子抑制剂,由Pardes Biosciences Inc.研发,用于治疗新型冠状病毒感染。Yang等^[60]使用了两种不同标记位置的 ^{14}C pomotrelvir,采用分开给药的方式,进行人体物质平衡试验。根据临床前动物实验结果和首次人体研究

中的代谢物分析, 预测 pomotrelvir 的一个酰胺键会发生显著水解 (图 2A)。两个断裂部分都是主要的循环代谢物, 且超过血浆中药物总相关物质的 10%。为了追踪和表征主要水解代谢物及其可能的次级代谢物, 采用了两种不同标记位置的微量示踪剂, 分别标记在内酰胺羰基和苯环上 (图 2A), 可以覆盖酰胺水解后的所有裂解代谢物。用 AMS 和 LC-MS/MS 方法共鉴定了 11 个主要代谢物, 在内酰胺标记组和苯环标记组的样本中分别检测到 3 种和 6 种代谢物, 共同观察到 2 种代谢物。

非格列培 (firuglipel, DS-8500a) 是一种 GPR119 小分子激动剂, 由第一三共株式会社研发, 用于治疗 2 型糖尿病。在临床前大鼠实验中, Makino 等^[61]观察

到非格列培的代谢途径主要为裂解途径: 噁二唑环的还原裂解和酰胺侧链的水解, 噁二唑环开环后的代谢物是大鼠中的主要代谢物 (图 2B)。在随后的人体物质平衡试验中, Makino 等^[62]使用两种不同标记位置的 [¹⁴C]非格列培, 分别标记在苯环和侧链的酰胺碳上, 采用分开给药的方式进行研究 (图 2B)。试验结果表明酰胺侧链水解产生的裂解代谢物是人体血浆中的主要代谢物, 提示酰胺水解存在显著的物种差异。人体口服两种不同标记位置的 [¹⁴C]非格列培后, 尿粪中的排泄率和代谢物谱有较大差异, 表明两种裂解代谢物的体内处置方式不同。Makino 等采用的双标记策略, 可以覆盖噁二唑环的裂解代谢物, 虽然酰胺水解会导致未标记的 2-氨基丙-1-醇丢失, 但 2-氨基丙-1-醇是一个

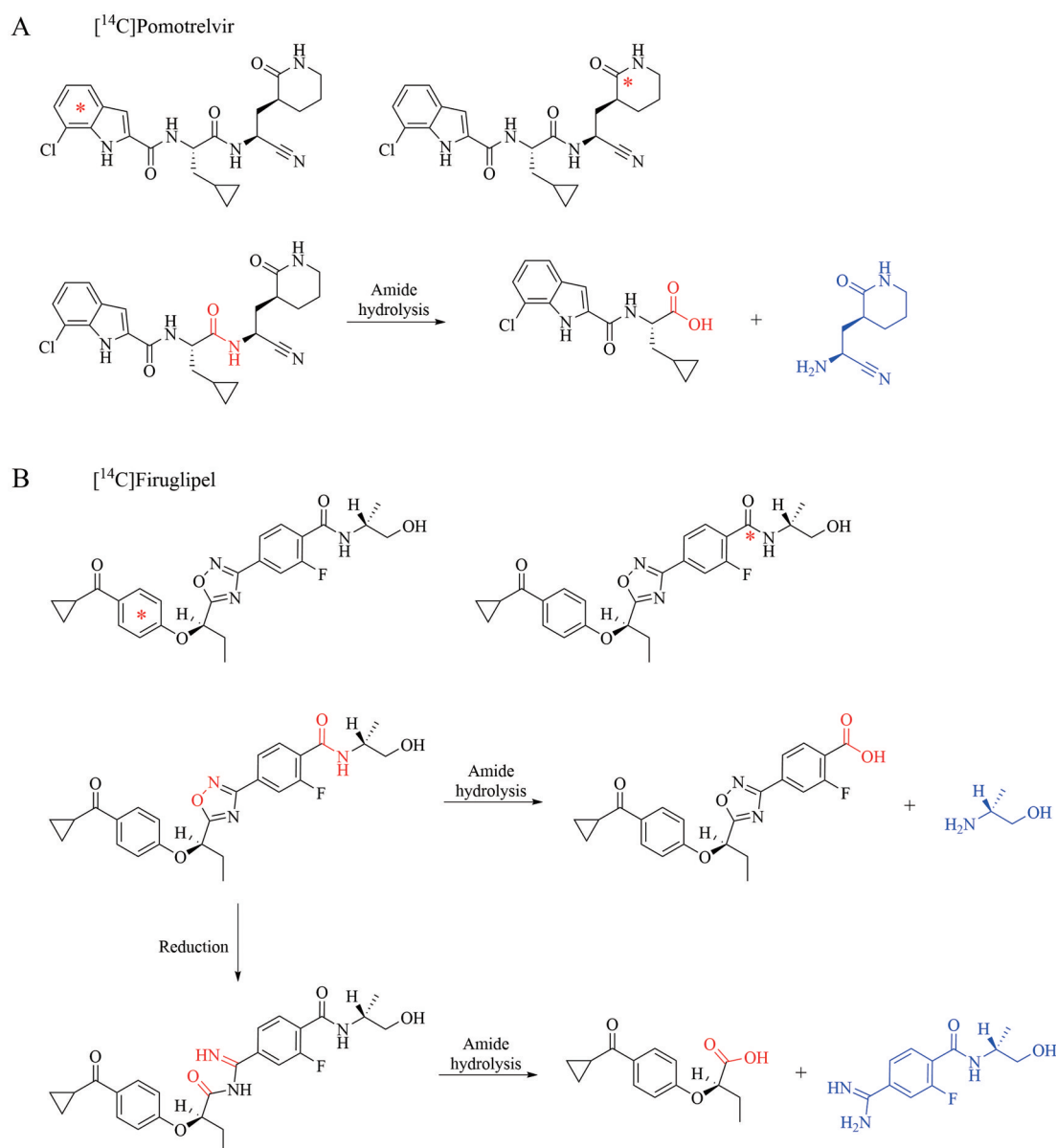


Figure 2 Chemical structures of [¹⁴C]pomotrelvir and amide hydrolysis pathway (A), and chemical structures of [¹⁴C]firuglipel and amide hydrolysis and reduction pathways (B). *: ¹⁴C radiolabeled position

小的极性脂肪族片段, 没有警示结构, 因此无需进行第三个放射性标记。

洛拉替尼 (lorlatinib) 是一种 ALK 抑制剂和 ROS 抑制剂, 由辉瑞公司研发, 用于治疗非小细胞肺癌。Stypinski 等^[63]在洛拉替尼的第一次人体物质平衡试验中观察到了人特有的分子内裂解代谢途径, 生成主要循环代谢物 M8 和未标记的含吡啶吡唑结构的代谢物 (图 3A)。因此, 他们在洛拉替尼的吡唑环上再次进行 ¹⁴C 标记 (图 3A), 展开了第二次人体物质平衡试验。可以从中得到经验: 药物在动物中不发生裂解, 并不能排除在人体中发生裂解的可能。

阿地溴铵 (aclidinium bromide) 是一种 CHRM3 小分子拮抗剂, 由 Almirall SA 研发, 用于治疗慢性阻塞性肺疾病。Sentellas 等^[64]报道了阿地溴铵由于分子中存在酯键, 在血浆中迅速水解成两种无活性代谢物, 分别是醇代谢物 LAS34823 和酸代谢物 LAS34850 (图 3B)。因此, Ortiz 等^[65]使用两种不同标记位点的 [¹⁴C]阿地溴铵进行人体物质平衡试验, 分别标记在苯环和乙

醇羰基碳上 (图 3B), 分开给药收集样品, 以此来追踪醇代谢物和酸代谢物的进一步代谢情况。

对不同受试者分别给予不同位置标记的化合物是最直接且技术简单的方法, 实质上相当于将两种单一标记的人体物质平衡试验结合在一起。然而, 这种策略的潜在缺点在于需要纳入更多受试者。举例来说, Makino 等^[62]在采用双放射性标记策略时需要 6+6 名受试者进行给药, 即每项试验需要 6 名受试者。此外, 还需要额外的临床前实验以支持单独给药, 包括对每个放射性标记进行大鼠物质平衡研究和大鼠定量全身放射性自显影 (QWBA) 研究, 以便准确估算人体放射性剂量, 除非采用微量示踪剂技术进行人体研究^[26]。

3.2 分别单独给予 ¹⁴C 和 ³H 不同标记的药物 由于 ¹⁴C 具备更好的稳定性和精准性, 在临床阶段大约 95% 的候选药物更倾向于选择 ¹⁴C 标记, 在人体物质平衡试验中使用 ³H 进行单独标记的情况并不常见。因此, 至今尚未在人体物质平衡试验中采用分别给予 ¹⁴C 和 ³H 标记的药物这一策略, 不过这种方法在临床前研究中

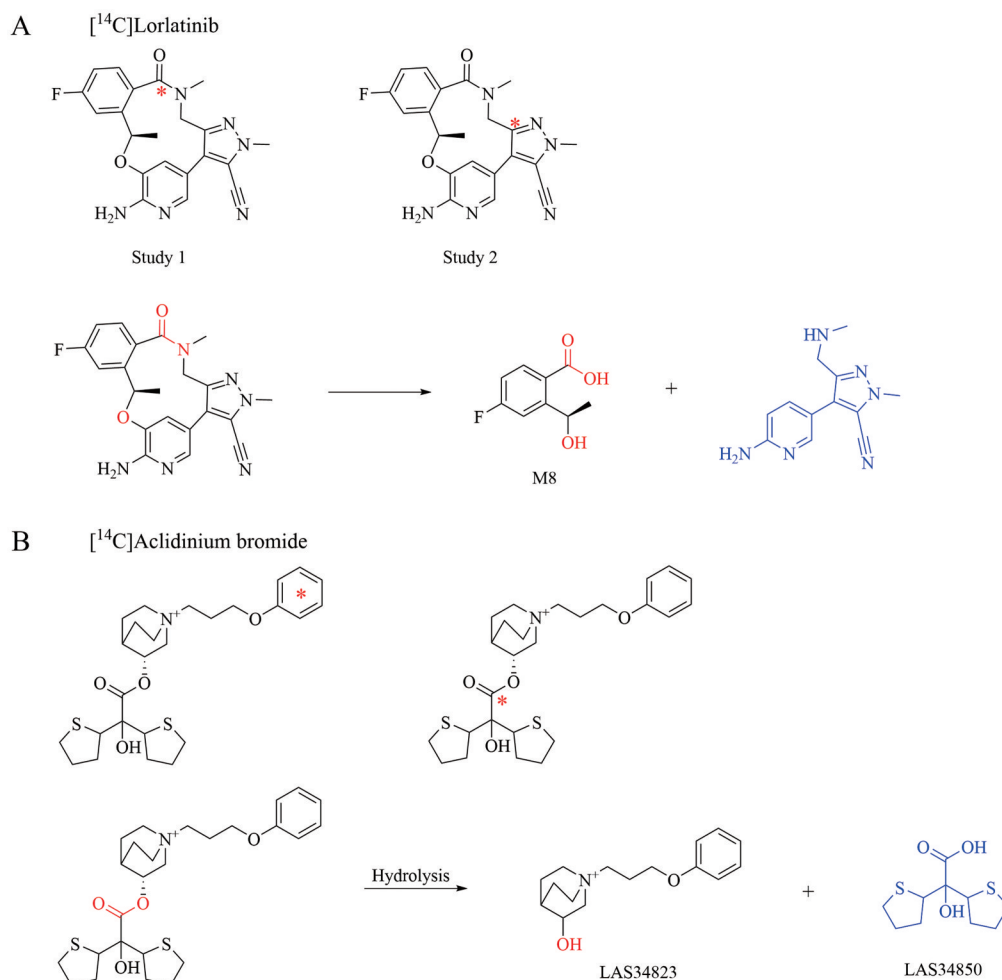


Figure 3 Chemical structures of [¹⁴C]lorlatinib in study 1 and study 2, and intramolecular cleavage metabolic pathway (A) and chemical structures of [¹⁴C]aclidinium bromide and ester bond hydrolysis pathway (B). *: ¹⁴C radiolabeled position

已经被部分应用。

Gaudin 等^[66]对角鲨烯酰腺苷纳米组件 (SQAd NAs) 进行小鼠 ADME 研究, 纳米组件由检测药物腺苷 (adenosine, Ad) 和载体角鲨烯 (squalenoyl, SQ) 连接而成, 并包入纳米粒中进行给药。为了更好地了解治疗效果, 他们分别使用 ^{14}C 和 ^3H 标记角鲨烯和腺苷部分 (图 4A), 不仅可以评估药物整体的命运, 也可以检测腺苷和角鲨烯在生物体内的分布情况。

3.3 以混合物的形式给予 ^{14}C 和 ^{14}C 不同标记的药物 尽管分别给予不同位置标记的药物是最直接并且

技术上最简单的方法, 但是进行两次人体物质平衡试验需要更多的受试者和放射性药物, 会增加成本并使样品处理与分析变得更加繁琐。与之相比, 在单次人体物质平衡试验中, 以混合物的形式给予不同标记的药物是更为优越的策略。然而, 放射性剂量可能需要低于单一标记试验中的剂量, 以确保在单次人体试验中保持辐射剂量在可接受范围内。当选择使用 ^{14}C 标记化合物的混合物 (1:1), 必须依赖代谢物鉴定来确定每种代谢物的比活度, 只有一个标记的裂解产物可以帮助校正两种放射性标记的比活度。例如, 如果混合

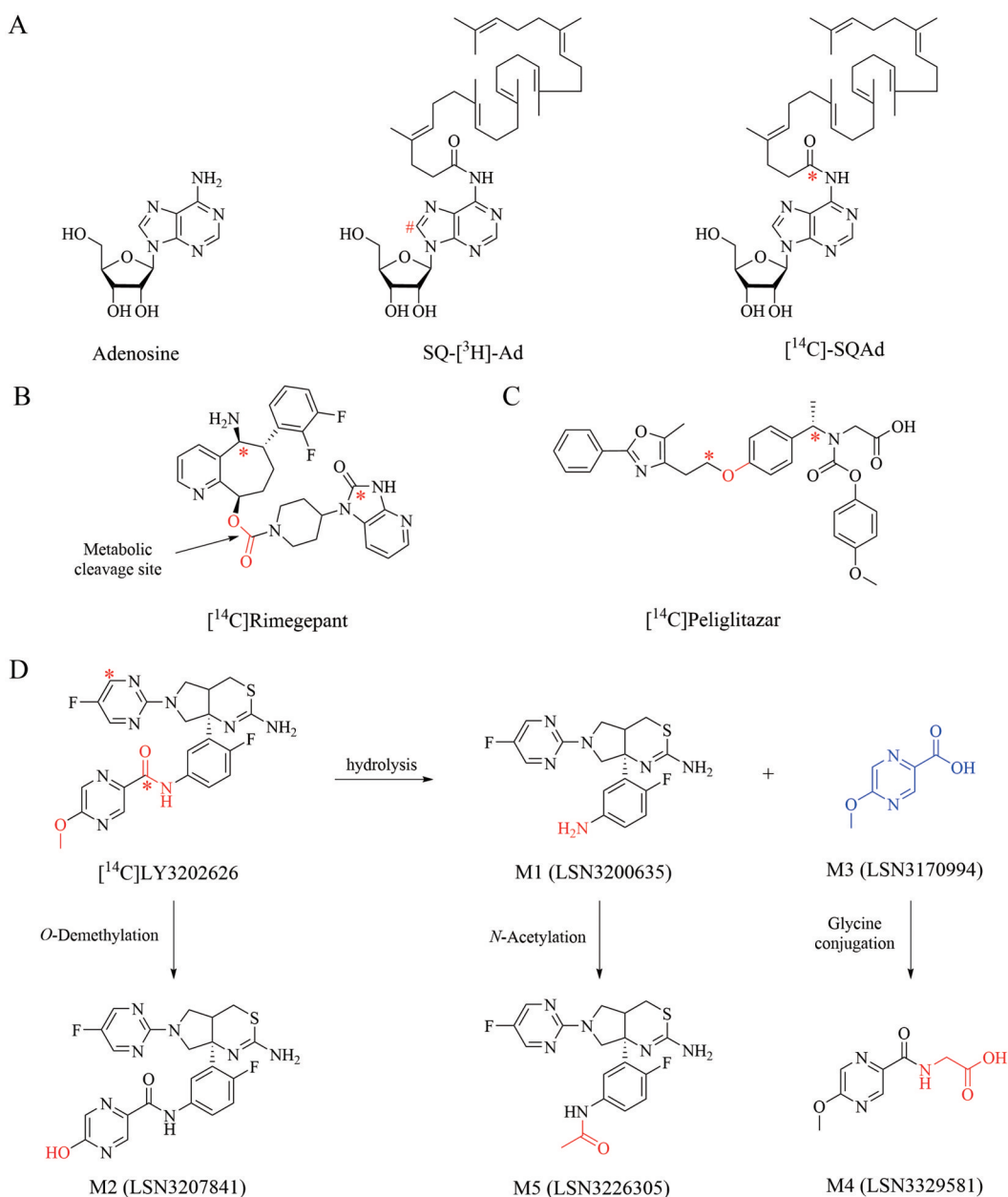


Figure 4 Chemical structures of adenosine, squalenoyl- ^3H -adenosine and ^{14}C -squalenoyl-adenosine (A), structure of dual-labeled ^{14}C rimegepant (B), structure of dual-labeled ^{14}C peligitazar (C), and the proposed metabolic schemes for dual-labeled ^{14}C LY3202626 (D). *: ^{14}C radiolabeled position; #: ^3H radiolabeled position

物的比活度为 $50 \text{ mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$, 而裂解产生的代谢物仅为 $25 \text{ mCi}\cdot\text{mmol}^{-1}$, 那么基于原形药物比活度的裂解代谢物的浓度 ($\text{ng eq}\cdot\text{g}^{-1}$) 实际上是测量值的两倍。然而, 通常情况下, 两个 ^{14}C 标记的比活度并不相同, 使计算进一步复杂化。因此, 在一个分子上进行多个放射性标记时, 评估每个放射性标记的比活度存在一定挑战。

瑞美吉泮 (rimegepant, BMS-927711) 是一种 CGRP 小分子拮抗剂, 由百时美施贵宝公司研发, 用于治疗偏头痛。Turley 等^[67]使用双标的 [^{14}C]瑞美吉泮进行人体物质平衡试验。在临床前动物代谢研究中, 观察到瑞美吉泮的氨基甲酸酯水解是一种主要的代谢途径。因此, 分别在酯键的左右两部分进行了 ^{14}C 标记, 以双标记的方式来完全追踪该化合物的代谢转化 (图 4B)。

Peligitazar 是一种 PPAR 小分子激动剂, 由百时美施贵宝公司研发, 用于治疗 2 型糖尿病。Wang 等^[68]使用双标的 [^{14}C]peligitazar 进行人体物质平衡试验。由于在结构相关的类似物 muraglitazar 的研究中观察到 *O*-去烷基代谢途径将分子分裂成两个片段, 并且在体外孵育 peligitazar 实验中也观察到了类似的反应, 因此在醚键的左右两部分进行 ^{14}C 标记, 1:1 混合后口服给药, 以得到 peligitazar 的完整代谢情况 (图 4C)。

LY-3202626 是一种 BACE1 小分子抑制剂, 由礼来制药公司研发, 用于治疗阿尔茨海默病。Katyayan 等^[69]使用双标的 [^{14}C]LY3202626 进行人体物质平衡试验, 分别标记在苯环和酰胺碳上, 1:1 混合后口服给药。LY3202626 的主要代谢途径是 *O*-去甲基 (M2) 和酰胺水解 (M1、M3、M4 和 M5), 其中 M2 和 M4 是血浆和排泄物中的主要代谢物 (图 4D)。如果没有进行双标, M3 和 M4 无法观测到, 导致对主要代谢物的误判。

3.4 以混合物的形式给予 ^{14}C 和 ^3H 不同标记的药物 混合给予 ^{14}C 和 ^3H 不同标记的药物将使研究情况更加复杂, 需要考虑 ^{14}C 和 ^3H 的放射性检测。在放射性检测器的测量中, ^{14}C 和 ^3H 通道存在重叠, 因此需要调整能量窗口以减轻 ^3H 通道对 ^{14}C 检测的干扰, 以增加 ^{14}C 信号的检测灵敏度。然而, ^{14}C 通道对 ^3H 测量的影响无法完全消除, 因为来自较高能量的 ^{14}C 放射性测量会干扰较低能量的 ^3H 通道, 导致 ^3H 计数被高估。为了解决这一问题, 需要使用单标记的标准品分别进样, 以确定每个标记的比活度, 并评估在 ^3H 测量中 ^{14}C 信号引起的干扰程度^[59,70], 可以有效衡量和解决混合标记药物的放射性测量问题。

齐拉西酮 (ziprasidone) 是一种 5-HT₂ 拮抗剂和 DRD2 激动剂, 由辉瑞公司研发, 用于治疗精神分裂

症、双相相关障碍和躁狂症。在齐拉西酮的临床前研究中, Prakash 等^[71]发现齐拉西酮在大鼠和犬中广泛代谢, 主要代谢途径是哌嗪氮的乙基侧链的 *N*-去烷基和苯并异唑环的硫氧化 (图 5A)。由于 *N*-去烷基途径使得齐拉西酮发生分子断裂, 因此在人体物质平衡试验中, Prakash 等^[59]采用双标记的策略来追踪分子裂解后的代谢物, 分别使用 ^{14}C 和 ^3H 标记哌嗪氮连接的乙基碳和苯并噻唑环上的氢 (图 5A), 以混合物的形式给予健康男性受试者。

在测定样品的放射性时, 为了同时监测 ^{14}C 和 ^3H , Prakash 等使用了“双标” $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ 程序, 并且使用不同的闪烁液混合样品来检测 ^{14}C 和 ^3H 。在代谢物谱分析中, 用单标记的标准品进样, 以确定 ^{14}C 和 ^3H 的效率分别是 37% 和 55%, 由于在检测中能量较高的 ^{14}C 会干扰 ^3H 通道的信号, 需要做出 31% 的补偿^[59]。

3.5 在一个分子上标记不同位置的 ^{14}C 和 ^{14}C 在一个分子上标记不同位置的 ^{14}C 和 ^{14}C 与以混合物形式给予 ^{14}C 和 ^{14}C 不同标记的药物的策略类似, 都需要评估每个 ^{14}C 标记的比活度, 并鉴定所有的代谢物, 以单个 ^{14}C 标记的裂解代谢物来校正不同 ^{14}C 标记的比活度。然而, 分子内多标记的制剂配制相比混合物给药更为简单, 本质上与单一标记的制剂配制相同。此外, 在一个分子上标记多个放射性同位素会显著增加药物合成的复杂性, 而且多个放射性同位素的辐射也会导致同位素降解速度的加快。因此, 尽管分子内多标记提供了一种更精细的方法来研究药物代谢, 但也带来了更多的挑战和限制, 需要仔细权衡其优势和缺点。

Bempedoic acid (ETC-1002) 是一种 ACLY 抑制剂, 由 Otsuka Holdings Co. Ltd. 和 Esperion 公司共同研发, 用于治疗高胆固醇血症、血脂障碍和杂合子家族性高胆固醇血症。在 bempedoic acid 的临床前研究中, Oniciu 等^[72]报道了其能够可逆地代谢为酮代谢物 ESP15228, 后者可以被激活为 CoA 硫酯结合物, 类似于 bempedoic acid 的激活机制 (图 5B)。因此, Amore 等^[73]使用双标的 [^{14}C]bempedoic acid 进行人体物质平衡试验, 在 bempedoic acid 的两个羰基碳上同时进行标记, 以同时评估 bempedoic acid 和 ESP15228 在体内的代谢情况 (图 5B)。

3.6 在一个分子上标记不同位置的 ^{14}C 和 ^3H 如果在同一分子中同时进行 ^{14}C 和 ^3H 标记, 则无法对他们进行单独的比活度测定。因此, 迄今为止, 这种策略尚未在人体物质平衡试验中得到广泛应用, 更多的是合成方法学的研究。AMS 可能是应对这一技术难点的一种办法, AMS 可以选择性地分析 ^{14}C 和 ^3H , 但目前 AMS 测量生物样品中 ^3H 的应用还不够成熟^[74], 意味着

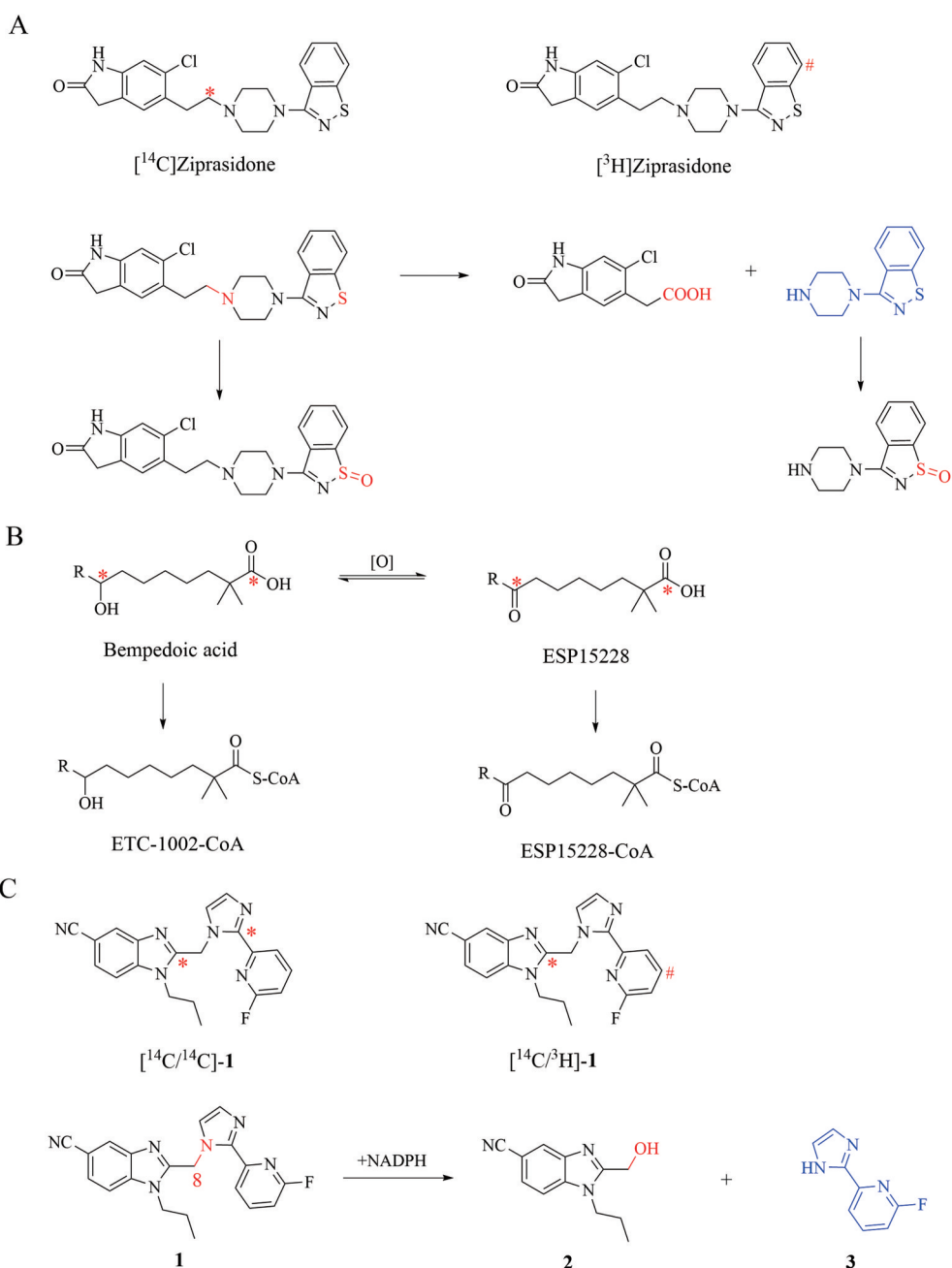


Figure 5 Chemical structures of [¹⁴C]ziprasidone and [³H]ziprasidone, and the major metabolic pathway of ziprasidone (A), coenzyme A thioester conjugation of dual-labeled [¹⁴C]bempedoic acid (ETC-1002) and ESP15228 (B), and chemical structures for [¹⁴C/¹⁴C]-**1** and [¹⁴C/³H]-**1**, and the NADPH-dependent microsomal-mediated metabolic scission of **1** into **2** and **3** (C). *: ¹⁴C radiolabeled position; #: ³H radiolabeled position

在人体试验中同时使用 ¹⁴C 和 ³H 标记的分子仍面临一些技术挑战, 需要进一步研究和发展才能实现这一目标。

化合物 **1** 是一种有效的 GABA_A 受体激动剂, Shaffer 等^[70] 在前期的体外代谢研究中观察到化合物 **1** 的 C8 位发生 NADPH 依赖性显著代谢裂变, 生成苯并吡唑啉 **2** 和氟吡唑啉 **3** (图 5C)。因此, Zhang 等^[75] 报道了 ¹⁴C 和 ³H 双标记的化合物 **1** 的合成方法, 分别在 C8

的两侧进行标记 (图 5C), 以此得到全面的体内代谢谱图。

4 讨论

我国已有多种小分子药物采用单一放射性标记策略开展人体物质平衡试验。其中吡咯替尼^[48]、恩沙替尼^[51]、泰吉利定^[54] 等被报道在人体中经过 *O*-去烷基、*N*-去烷基和酰胺水解等代谢途径导致分子裂解 (图 6)。标记丢失的部分是否发生代谢反应无法被观察到, 从

而不能获得药物的完整代谢情况。如果在进行人体物质平衡试验之前,就观测到类似的分子裂解代谢途径,可以考虑采用多个放射性标记策略,以避免后续的重复试验。然而,吡咯替尼经 *O*-去烷基丢失甲基吡啶(图6A),泰吉利定经 *O*-去烷基丢失乙基(图6C),这两个基团都是小的脂肪族片段,因此,这种情况可以不用标记第二个放射性核素来检测后续代谢情况。

基于上述案例可以得出以下结论: 药物分子经生

物转化途径断裂生成两个甚至三个重要片段时,需要评估是否需要多个放射性标记来进行人体物质平衡试验。

如果预测出人体中的主要代谢物是裂解产物,应该使用多个放射性标记策略, Cuyckens 等^[58]建议使用代谢清除率大于 25% 作为参考指标。如果在血浆中存在裂解产物且可能超过总暴露量的 10%, 依据美国 FDA 发布的《药物代谢产物安全性试验技术指导原则

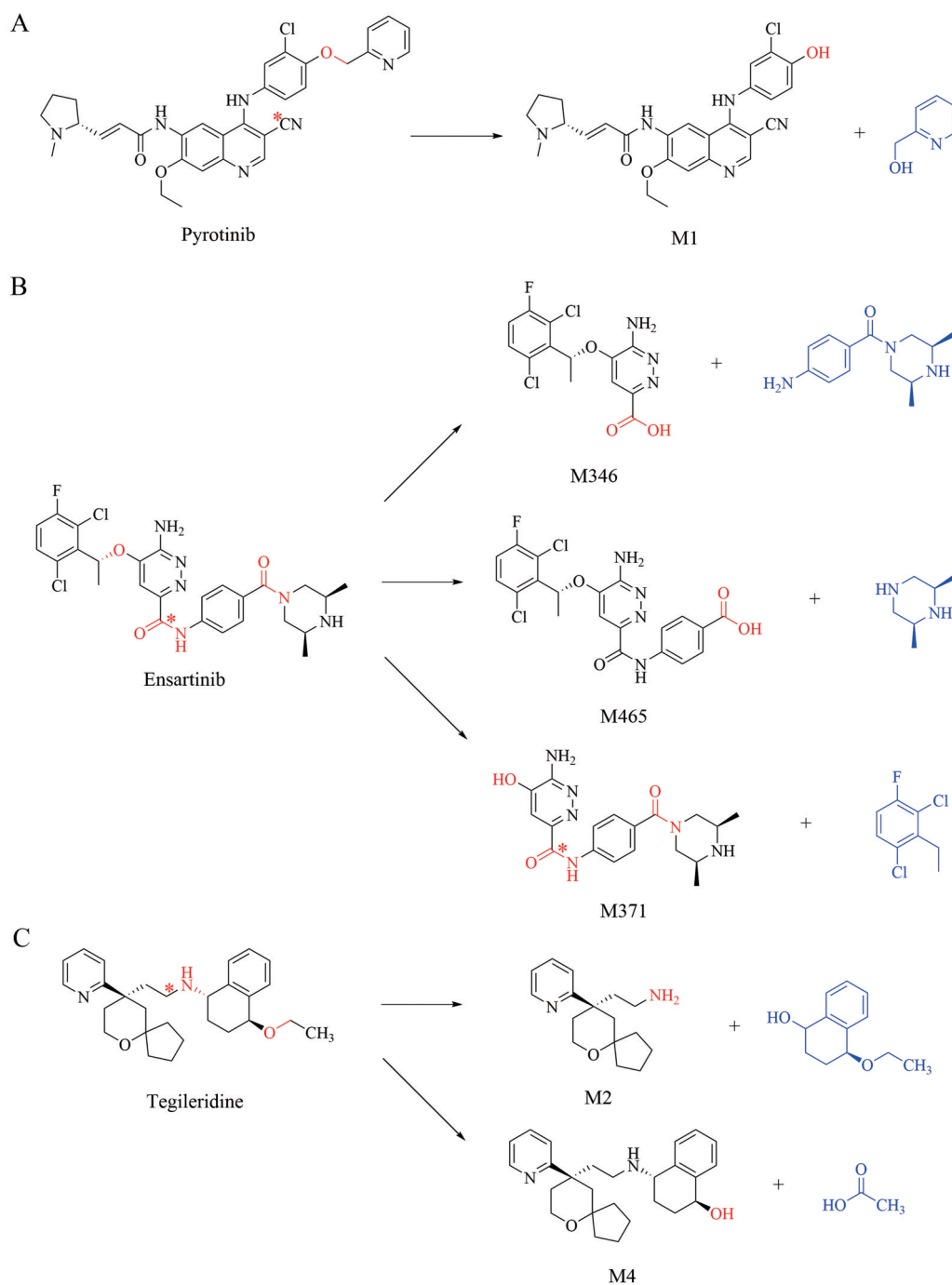


Figure 6 The chemical structures and cleavage metabolic pathways of [¹⁴C]pyrotinib (A), [¹⁴C]ensartinib (B), and [¹⁴C]tegileridine (C). *: ¹⁴C radiolabeled position

(Metabolite in Safety Testing, MIST)》需要考察代谢物的安全性^[76,77], 此时也应该采用多个放射性标记策略。通常裂解产物比氧化代谢物和原形药物更具有亲水性, 从而增加血浆中的暴露量。在进行人体物质平衡试验之前, 根据动物体内 ADME 数据和人体首次非放射性试验结果, 对化合物的代谢情况有初步的了解。此外, 采用合适的分析方法也至关重要, 因为裂解产物与原形药物的质谱响应可能差别较大, 导致对裂解产物丰度的低估^[78]。

如果裂解产物的代谢途径未知, 则需要采用多个放射性标记策略。然而, 如果预测的裂解产物不会进一步大量代谢, 也可以选择 LC-MS/MS 定量追踪这一部分, 从而避免需要标记原形分子的这一部分, 但是这种方法存在一定风险。如果裂解产物之一是已知的内源性无害分子, 并且形成的预期浓度没有显著高于内源性水平, 则没有必要对该部分进行放射性标记。其次, 如果裂解产物被报道过代谢途径, 也可以考虑不进行放射性标记。

随着新型药物分子设计技术的不断进步, 小分子药物的分子量也在逐渐增加。其中, PROTAC 是一种由两个小分子和连接子 (linker) 构成的三元复合物, 这种嵌合体的出现不仅增加了分子断裂的潜在风险, 还使得其代谢途径变得更为复杂。因此, 在这种复杂的结构下, 采用多个放射性标记策略可以确保有效追踪和评估药物的代谢和分布情况。

载体类纳米药物是将原料药包封于纳米载体中形成的纳米尺度颗粒, 其中与普通药物不同之处在于其功能单位“载药粒子”。因此, 纳米药物的药代动力学特征与普通药物存在较大差异, 例如组织分布、蓄积和清除。我国 CDE 在 2021 年发布了《纳米药物非临床药代动力学研究技术指导原则 (试行)》^[79], 对于其药代动力学研究方法提出了特殊要求, 但目前尚缺乏完整的研究和评价体系。载体类纳米药物进入体内后, 存在多种形态成分, 如载药粒子、载体材料、负载与游离型药物及代谢产物等。采用多个放射性标记策略来分别标记药物和载体粒子, 可能解析“载药粒子-游离性药物-载体药物”在体内的动态变化过程, 进而获得纳米药物的体内药代动力学信息。例如, Rurarz 等^[80]将 ¹⁷⁷Lu 或 ⁹⁰Y 与纳米载体进行化学偶联, 并使用放射性成像技术 (如正电子发射断层扫描, PET 等) 来跟踪纳米载体在动物体内的分布情况, 以确保纳米系统的生物活性, 并评估在疾病模型中纳米载体的有效性和靶向性。

5 总结与展望

在药物开发的早期阶段, 准确地追踪和理解药物在人体内的行为是至关重要的。放射性同位素标记提

供了一种强大的工具, 可以揭示药物的吸收、分布、代谢和排泄过程。然而, 随着药物分子结构的复杂化, 传统的单一标记策略可能无法提供足够的信息来完全理解药物的代谢途径。因此, 放射性标记的策略选择是一个重要的决策, 它直接影响到能否获得关于药物代谢和排泄的关键信息。单一标记策略虽然简单, 但有时会因为化合物的降解或代谢断裂而无法提供完整的代谢轮廓, 需要多个放射性标记策略来补充数据。

当药物的代谢裂解途径可能发生时, 采用多个放射性标记有助于确保识别完整的代谢物谱。多放射性标记策略不仅提高了人体物质平衡研究的信息量和精度, 而且通过不同的标记位点区分药物的代谢途径, 可以加深对药物体内行为和药效机制的理解。这种策略的应用, 特别是在复杂药物设计和个性化医疗的背景下, 将成为药物研究和开发中的一个重要方向, 有助于优化药物设计, 提高治疗效果, 同时确保患者安全。

尽管多放射性标记策略提供了深入的代谢信息, 但它们也面临着合成难度大、成本高和放射性废物处理等挑战。未来的研究需要在提高标记效率、降低成本和最小化环境影响之间找到平衡。随着分析技术的进步和放射性标记方法的创新, 多放射性标记策略有望在药物开发中发挥更大的作用, 为新药的安全性和有效性提供更加全面的数据支持。

对于我国的药物研究和开发领域来说, 关注并掌握多放射性标记技术的发展, 将有助于提高药物研究的质量和效率, 同时也符合国际药物研究发展趋势。未来可以期待看到更多使用多个放射性标记的药物研究案例, 这将为药物的安全性和有效性评估提供更加坚实的科学基础。

作者贡献: 何伊菲负责文献检索和起草文章; 郑元东负责提供资料 and 文章选题; 钟大放和刁星星负责修改和审定文章。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Roffey SJ, Obach RS, Gedge JI, et al. What is the objective of the mass balance study? A retrospective analysis of data in animal and human excretion studies employing radiolabeled drugs [J]. *Drug Metab Rev*, 2007, 39: 17-43.
- [2] Ramamoorthy A, Bende G, Chow ECY, et al. Human radiolabeled mass balance studies supporting the FDA approval of new drugs [J]. *Clin Transl Sci*, 2022, 15: 2567-2575.
- [3] Cerny MA, Spracklin DK, Obach RS. Human absorption, distribution, metabolism, and excretion studies: origins, innovations, and importance [J]. *Drug Metab Dispos*, 2023, 51: 647-656.

- [4] US FDA. Clinical Pharmacology Considerations for Human Radiolabeled Mass Balance Studies. Guidance for Industry (draft guidance) [EB/OL]. Rockville, MD: Office of Clinical Pharmacology, Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration. 2022-05-05. <https://www.fda.gov/media/158178/download>.
- [5] NMPA CDE. Technical Guidelines for Radiolabeled Human Body Material Balance Studies [EB/OL]. Beijing: Center for Drug Evaluation of NMPA. 2024-01-12. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/2100df7b0992e91823b403b79ca02210>.
- [6] Ma S, Yi L, Miao LY. Progress in development of human radiolabelled mass balance and biotransformation studies [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2020, 55: 1184-1188.
- [7] Diao XX, Yu JH, Zhong DF. Application progress of radiolabeled drugs in new drug research and development in China [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 313-319.
- [8] Sun LN, Li TP, Zhou C, et al. Practice and consideration on the platform construction of isotope tracer technology for human mass balance and metabolism study of new drugs [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2021, 30: 1570-1573.
- [9] EMA. Guideline on the Investigation of Drug Interactions [EB/OL]. Canary Wharf, London: European Medicines Agency. 2015-03-06. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf.
- [10] Goracci L, Desantis J, Valeri A, et al. Understanding the metabolism of proteolysis targeting chimeras (PROTACs): the next step toward pharmaceutical applications [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 11615-11638.
- [11] Pike A, Williamson B, Harlfinger S, et al. Optimising proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) for oral drug delivery: a drug metabolism and pharmacokinetics perspective [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25: 1793-1800.
- [12] Young GC, Spracklin DK, James AD, et al. Considerations for human ADME strategy and design paradigm shift(s) - an industry white paper [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2023, 113: 775-781.
- [13] Hu HT, Katyayan KK, Czeskis BA, et al. Comparison between radioanalysis and ^{19}F nuclear magnetic resonance spectroscopy in the determination of mass balance, metabolism, and distribution of pefloxacin [J]. *Drug Metab Dispos*, 2017, 45: 399-408.
- [14] Lappin G, Garner RC. The use of accelerator mass spectrometry to obtain early human ADME/PK data [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2005, 1: 23-31.
- [15] Cuyckens F, Balcaen LI, De Wolf K, et al. Use of the bromine isotope ratio in HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS analysis of a new drug in development [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 390: 1717-1729.
- [16] Liu M, Wang XL, Zhang D, et al. Development and validation of LC-MS/MS methods for the determination of EVT201 and its five metabolites in human urine: application to a mass balance study [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 2023, 1223: 123723.
- [17] Zhang DL, Raghavan N, Chando T, et al. LC-MS/MS-based approach for obtaining exposure estimates of metabolites in early clinical trials using radioactive metabolites as reference standards [J]. *Drug Metab Lett*, 2007, 1: 293-298.
- [18] Maeda K, Sugiyama Y. Novel strategies for microdose studies using non-radiolabeled compounds [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63: 532-538.
- [19] Benedetto Tiz D, Bagnoli L, Rosati O, et al. New halogen-containing drugs approved by FDA in 2021: an overview on their syntheses and pharmaceutical use [J]. *Molecules*, 2022, 27: 1643.
- [20] Singh RSP, Walker GS, Kadar EP, et al. Metabolism and excretion of nirmatrelvir in humans using quantitative fluorine nuclear magnetic resonance spectroscopy: a novel approach for accelerating drug development [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2022, 112: 1201-1206.
- [21] Yang BQ, Kong EL, Xue XD, et al. Qualitative and quantitative analysis of fluoxetine hydrochloride by ^{19}F NMR [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 630-633.
- [22] Mutlib A, Espina R, Atherton J, et al. Alternate strategies to obtain mass balance without the use of radiolabeled compounds: application of quantitative fluorine (^{19}F) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in metabolism studies [J]. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25: 572-583.
- [23] James AD, Marvalin C, Luneau A, et al. Comparison of ^{19}F NMR and ^{14}C measurements for the assessment of ADME of BYL719 (alpelisib) in humans [J]. *Drug Metab Dispos*, 2017, 45: 900-907.
- [24] Meermann B, Bockx M, Laenen A, et al. Speciation analysis of bromine-containing drug metabolites in feces samples from a human *in vivo* study by means of HPLC/ICP-MS combined with on-line isotope dilution [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402: 439-448.
- [25] Yang HL, Zhong WT, Guo YS, et al. Analysis of inorganic elements in different batches of earthworm polypeptides by ICP-MS combined with chemometrics technology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 1040-1047.
- [26] Penner N, Xu L, Prakash C. Radiolabeled absorption, distribution, metabolism, and excretion studies in drug development: why, when, and how? [J]. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25: 513-531.
- [27] Elmore CS. The use of isotopically labeled compounds in drug discovery [J]. *Annu Rep Med Chem*, 2009, 44: 515-534.
- [28] Kiffe M, Schmid DG, Bruin GJ. Radioactivity detectors for high-performance liquid chromatography in drug metabolism studies [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2008, 31: 1593-1619.
- [29] Nassar AE, Parmentier Y, Martinet M, et al. Liquid chromatography-accurate radioisotope counting and microplate scintillation counter technologies in drug metabolism studies [J]. *J Chromatogr Sci*, 2004, 42: 348-353.
- [30] Zheng YD, Zhang H, Zhan Y, et al. Pharmacokinetics, mass

- balance, and metabolism of [¹⁴C]vicagrel, a novel irreversible P2Y₁₂ inhibitor in humans [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42: 1535-1546.
- [31] He YF, Liu Y, Yu JH, et al. Pharmacokinetics, mass balance, and metabolism of [¹⁴C]TPN171, a novel PDE5 inhibitor, in humans for the treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44: 221-233.
- [32] Ge XY, Ma S, Yan S, et al. Mass balance study of [¹⁴C]SHR0302, a selective and potent JAK1 inhibitor in humans [J]. *Xenobiotica*, 2023, 53: 69-83.
- [33] Penner N, Klunk LJ, Prakash C. Human radiolabeled mass balance studies: objectives, utilities and limitations [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2009, 30: 185-203.
- [34] Spracklin DK, Chen D, Bergman AJ, et al. Mini-review: comprehensive drug disposition knowledge generated in the modern human radiolabeled ADME study [J]. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2020, 9: 428-434.
- [35] Dueker SR, Lohstroh PN, Giacomo JA, et al. Early human ADME using microdoses and microtracers: bioanalytical considerations [J]. *Bioanalysis*, 2010, 2: 441-454.
- [36] Lappin G, Stevens L. Biomedical accelerator mass spectrometry: recent applications in metabolism and pharmacokinetics [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4: 1021-1033.
- [37] Dalvie D. Recent advances in the applications of radioisotopes in drug metabolism, toxicology and pharmacokinetics [J]. *Curr Pharm Des*, 2000, 6: 1009-1028.
- [38] Isin EM, Elmore CS, Nilsson GN, et al. Use of radiolabeled compounds in drug metabolism and pharmacokinetic studies [J]. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25: 532-542.
- [39] Krauser JA. A perspective on tritium *versus* carbon-14: ensuring optimal label selection in pharmaceutical research and development [J]. *J Labelled Comp Radiopharm*, 2013, 56: 441-446.
- [40] Shaffer CL, Gunduz M, Thornburgh BA, et al. Using a tritiated compound to elucidate its preclinical metabolic and excretory pathways *in vivo*: exploring tritium exchange risk [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34: 1615-1623.
- [41] Shao LM, Hewitt MC. The kinetic isotope effect in the search for deuterated drugs [J]. *Drug News Perspect*, 2010, 23: 398-404.
- [42] Di Martino RMC, Maxwell BD, Piralì T. Deuterium in drug discovery: progress, opportunities and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22: 562-584.
- [43] Timmins GS. Deuterated drugs; updates and obviousness analysis [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2017, 27: 1353-1361.
- [44] Mouli HMC, Vinod A, Kumari S, et al. Deuterated driven new chemical entities: an optimistic way to improve therapeutic efficacy [J]. *Bioorg Chem*, 2023, 135: 106490.
- [45] Jiang JF, Pang XH, Li L, et al. Effect of *N*-methyl deuteration on metabolism and pharmacokinetics of enzalutamide [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 2181-2191.
- [46] Wu XJ, Meng J, Yuan H, et al. Pharmacokinetics and disposition of contezolid in humans: resolution of a disproportionate human metabolite for clinical development [J]. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*, 2021, 65: 409-421.
- [47] Zhou SF, Shao F, Xu ZQ, et al. A phase I study to investigate the metabolism, excretion, and pharmacokinetics of [¹⁴C] fruquintinib, a novel oral selective VEGFR inhibitor, in healthy Chinese male volunteers [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 80: 563-573.
- [48] Meng J, Liu XY, Ma S, et al. Metabolism and disposition of pyrotinib in healthy male volunteers: covalent binding with human plasma protein [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40: 980-988.
- [49] Li K, Ma S, Miao LY, et al. Absorption, metabolism and excretion of surufatinib in rats and humans [J]. *Curr Drug Metab*, 2020, 21: 357-367.
- [50] Bian YC, Zhang H, Ma S, et al. Mass balance, pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous HSK3486, a novel anaesthetic, administered to healthy subjects [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2021, 87: 93-105.
- [51] Zhou SF, Liu W, Zhou C, et al. Mass balance, metabolic disposition, and pharmacokinetics of [¹⁴C] ensartinib, a novel potent anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in healthy subjects following oral administration [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020, 86: 719-730.
- [52] Yu JH, Zhang H, Zhang YF, et al. Absorption, metabolism, and excretion of [¹⁴C] YY-20394, a highly selective PI3K-delta inhibitor in humans [J]. *Xenobiotica*, 2022, 52: 254-264.
- [53] Zhang H, Yan S, Zhan Y, et al. A mass balance study of [¹⁴C] SHR6390 (darpiciclib), a selective and potent CDK4/6 inhibitor in humans [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1116073.
- [54] Shi RP, Chai Y, Xie LJ, et al. Study of the mass balance, biotransformation and safety of [¹⁴C] SHR8554, a novel μ -opioid receptor injection, in healthy Chinese subjects [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1231102.
- [55] Liu YQ, Liu LK, Liu LX, et al. A phase I study investigation of metabolism, and disposition of [¹⁴C] -anlotinib after an oral administration in patients with advanced refractory solid tumors [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020, 85: 907-915.
- [56] Bian YC, Meng J, Ma S, et al. Metabolite profiles and mass balance of fuzuloparib, a novel poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, in subjects with advanced solid cancers [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2022, 88: 3307-3320.
- [57] Meng J, Zhang H, Bao JJ, et al. Metabolic disposition of the EGFR covalent inhibitor furmonertinib in humans [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43: 494-503.
- [58] Cuyckens F, Hvenegaard MG, Cassidy KC, et al. Recommendations on the use of multiple labels in human mass balance studies [J]. *Drug Metab Dispos*, 2024, 52: 153-158.
- [59] Prakash C, Kamel A, Gummerus J, et al. Metabolism and excretion of a new antipsychotic drug, ziprasidone, in humans [J].

- Drug Metab Dispos, 1997, 25: 863-872.
- [60] Yang ZP, Wong SL, Cha D, et al. Characterization of pharmacokinetics, biotransformation and elimination of pomotrelvir orally administered in healthy male adults using two [^{14}C] -labeled microtracers with separate labeling positions [J]. Drug Metab Dispos, 2023, 51: 1607-1614.
- [61] Makino C, Watanabe A, Deguchi T, et al. *In vivo* multiple metabolic pathways for a novel G protein-coupled receptor 119 agonist DS-8500a in rats: involvement of the 1,2,4-oxadiazole ring-opening reductive reaction in livers under anaerobic conditions [J]. Xenobiotica, 2019, 49: 961-969.
- [62] Makino C, Watanabe A, Kato M, et al. Species differences between rats and primates (humans and monkeys) in complex cleavage pathways of DS-8500a characterized by ^{14}C -ADME studies in humans and monkeys after administration of two radiolabeled compounds and *in vitro* studies [J]. Drug Metab Pharmacokin, 2022, 45: 100459.
- [63] Stypinski D, Fostvedt L, Lam JL, et al. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of lorlatinib (PF-06463922) and evaluation of the impact of radiolabel position and other factors on comparability of data across 2 ADME studies [J]. J Clin Pharmacol, 2020, 60: 1254-1267.
- [64] Sentellas S, Ramos I, Alberti J, et al. Aclidinium bromide, a new, long-acting, inhaled muscarinic antagonist: *in vitro* plasma inactivation and pharmacological activity of its main metabolites [J]. Eur J Pharm Sci, 2010, 39: 283-290.
- [65] Ortiz S, Flach S, Ho J, et al. Mass balance and metabolism of acclidinium bromide following intravenous administration of [^{14}C]-acclidinium bromide in healthy subjects [J]. Biopharm Drug Dispos, 2012, 33: 39-45.
- [66] Gaudin A, Lepetre-Mouelhi S, Mouglin J, et al. Pharmacokinetics, biodistribution and metabolism of squalenoyl adenosine nanoparticles in mice using dual radio-labeling and radio-HPLC analysis [J]. J Control Release, 2015, 212: 50-58.
- [67] Turley WA, Easter JA, Burrell RC, et al. Synthesis of a dual carbon-14-labeled calcitonin gene-related peptide receptor antagonist for use in a human absorption-distribution-metabolism-elimination study [J]. J Labelled Comp Radiopharm, 2022, 65: 126-139.
- [68] Wang LF, Munsick C, Chen S, et al. Metabolism and disposition of ^{14}C -labeled peliglitazar in humans [J]. Drug Metab Dispos, 2011, 39: 228-238.
- [69] Katyayan K, Yi P, Monk S, et al. Excretion, mass balance, and metabolism of [^{14}C]JLY3202626 in humans: an interplay of microbial reduction, reabsorption, and aldehyde oxidase oxidation that leads to an extended excretion profile [J]. Drug Metab Dispos, 2020, 48: 698-707.
- [70] Shaffer CL, Langer CS. Metabolism of a $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -labeled GABAA receptor partial agonist in rat, dog and human liver microsomes: evaluation of a dual-radiolabel strategy [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43: 1195-1205.
- [71] Prakash C, Kamel A, Anderson W, et al. Metabolism and excretion of the novel antipsychotic drug ziprasidone in rats after oral administration of a mixture of ^{14}C -and ^3H -labeled ziprasidone [J]. Drug Metab Dispos, 1997, 25: 206-218.
- [72] Oniciu DC, Dasseux JLH, Yang J, et al. Influence of various central moieties on the hypolipidemic properties of long hydrocarbon chain diols and diacids [J]. J Med Chem, 2006, 49: 334-348.
- [73] Amore BM, Cramer C, MacDougall D, et al. The disposition and metabolism of bempedoic acid, a potent inhibitor of ATP citrate lyase, in healthy human subjects [J]. Drug Metab Dispos, 2023, 51: 599-609.
- [74] Roberts ML, Velsko C, Turteltaub KW. Tritium AMS for biomedical applications [J]. Nucl Instrum Methods Phys Res B, 1994, 92: 459-462.
- [75] Zhang YS, Greenfield L, Hong Y. Syntheses of dual-radioisotope-labeled CP-I, a GABAA receptor partial agonist [J]. J Labelled Comp Radiopharm, 2011, 54: 411-417.
- [76] Luffer-Atlas D, Obach RS, Smith DA. A MIST conception: what has been learned from twenty years of human metabolite safety assessment? [J]. Med Chem Res, 2023, 32: 1933-1949.
- [77] US FDA. Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry (revision 2) [EB/OL]. Silver Spring, MD: Office of Communications, Division of Drug Information, Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration. 2020-03-05. <https://www.fda.gov/media/72279/download>.
- [78] Leclercq L, Cuyckens F, Mannens GS, et al. Which human metabolites have we MIST? Retrospective analysis, practical aspects, and perspectives for metabolite identification and quantification in pharmaceutical development [J]. Chem Res Toxicol, 2009, 22: 280-293.
- [79] NMPA CDE. Technical Guidance for Non-Clinical Pharmacokinetic Study of Nano Drugs (interim) [EB/OL]. Beijing, China: Center for Drug Evaluation of NMPA. 2021-08-27. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/95945bb17a7dcde7b68638525ed38f66>.
- [80] Ruraz BP, Urbaneck KA, Karczmarczyk U, et al. Towards cancer nanoradiopharmaceuticals—radioisotope nanocarrier system for prostate cancer theranostics based on radiation-synthesized polymer nanogels [J]. Cancers, 2023, 15: 5646.