

# 小分子药物开发中的药物代谢及代谢产物 安全性评价

## Drug metabolism and metabolite safety assessment in small molecule drug development

范莹<sup>1</sup>, 王寅<sup>2</sup>, 杨楠<sup>1</sup>,  
周恒<sup>2</sup>, 潘俊杰<sup>1</sup>, 尹茂山<sup>2</sup>,  
尹华静<sup>2</sup>, 李峥<sup>2</sup>, 戴学栋<sup>2</sup>

(1. 海军青岛特勤疗养中心 药剂科, 山东 青岛 266071; 2. 国家药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100022)

FAN Ying<sup>1</sup>, WANG Yin<sup>2</sup>,  
YANG Nan<sup>1</sup>, ZHOU Heng<sup>2</sup>,  
PAN Jun - jie<sup>1</sup>, YIN Mao - shan<sup>2</sup>,  
YIN Hua - jing<sup>2</sup>, LI Zheng<sup>2</sup>,  
DAI Xue - dong<sup>2</sup>

(1. Pharmacy Department, Qingdao Special Servicemen Recuperation Center of CPLA Navy, Qingdao 266071, Shandong Province, China; 2. Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

收稿日期: 2022 - 05 - 20

定稿日期: 2022 - 07 - 30

作者简介: 范莹(1970 -), 女, 主任药师, 主要从事医院药学工作

通信作者: 戴学栋, 副主任药师, 主要从事药物非临床评价工作

Tel: (010) 68585566

E - mail: daixuedong@cde.org.cn

**摘要:** 药物代谢是小分子药物开发过程中的一项重要研究内容。在药物开发的不同阶段, 需开展一系列体外和体内试验阐明其在人体和动物中的代谢特征。种属间的代谢差异, 可能导致人体和动物中的代谢产物存在明显不同, 某些代谢产物可能仅在人体中出现, 或者在人体中的暴露量远高于标准毒理学试验中所用动物种属的暴露水平。标准毒理学试验可能无法充分识别这些临床相关代谢产物的安全性风险。因此, 在非临床试验中可能需要对可能导致安全性担忧的代谢产物进行安全性评估。结合工作实践和国内外相关技术指南, 本文初步探讨了小分子药物开发过程中代谢产物的研究策略, 界定了何种代谢产物可能会导致安全性担忧, 何时以及如何鉴定这些可能引起安全性担忧的代谢产物, 并就如何进行代谢产物非临床安全性评价提供了建议, 以期对研究者和监管机构提供参考。

**关键词:** 小分子药物; 代谢产物; 非临床安全性

**DOI:** 10.13699/j.cnki.1001-6821.2022.20.022

**中图分类号:** R97 **文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-6821(2022)20-2487-05

**Abstract:** Drug metabolism is an important content in the development of small molecule drug. *In vitro and in vivo* studies should be conducted at different stage in drug development to establish its metabolic characteristics in humans and animals. There may be significant differences in metabolites between humans and animals due to metabolic differences between species. The safety of drug metabolites may not be fully identified and need to be determined in nonclinical studies because these metabolites may either be identified only in humans or be present at disproportionately higher levels in humans than in any animal species used during standard nonclinical toxicology testing. Combined with work practice and relevant technical guidelines, this paper preliminarily discusses the strategy of metabolites research in the development of small molecule drugs, defines which metabolites may cause safety concerns, provides recommendations to industry on when and how to identify and characterize drug metabolites that may cause safety concerns, and how to evaluate the nonclinical safety of these metabolites, so as to provide references for investigators provide reference for researchers and regulators.

**Key words:** small molecule drug; metabolites; nonclinical safety

新药开发过程中,需要进行一系列的体外和动物毒理学试验,以预测临床潜在风险,确定潜在药物不良反应的临床监测指标。但由于种属间差异,小分子药物在不同动物种属和人体中的代谢产物可能存在质和量上的差异。尽管这些代谢产物结构上与原形药物很相似,但仍属于新化合物,理论上可能会给患者或临床受试者带来与原形药物不相关的安全性风险。近年来越来越多的证据显示,某些代谢产物也可能对药物的药理学作用和毒性反应有一定的贡献,并且还可能导致药物-药物相互作用<sup>[1-4]</sup>。若某种代谢产物仅在人体中出现,或在人体中的水平远高于标准毒理学试验所用动物种属中的暴露水平,标准毒理学试验可能无法识别或充分识别这些临床相关代谢产物的安全性风险。因此,在小分子药物开发过程的不同阶段,应尽早采用不同的方法检测和表征原形药物在动物和人体中的代谢特征,并将人体代谢产物与毒理学试验受试动物的体内代谢产物进行比较,对于有安全性担忧的人体代谢产物,需要时应开展必要的非临床安全性研究,以更好的表征代谢产物的安全性风险。本文根据国内外相关指导原则,并结合实践经验,对小分子代谢产物安全性评价的监管要求及研究策略进行了总结归纳,以供研发人员和审评人员参考。

### 1 可导致安全性担忧的人体代谢产物

早在2002年,就有研究表明对于在人体血浆中占药物相关物质总量的25%及以上水平的代谢产物,应在毒理学试验动物中达到相当或更高的暴露<sup>[5]</sup>。随后,来自行业、监管机构和学术研究机构对该观点进行了广泛的讨论,并基于已知的代谢产物导致毒性的案例对这一观点进行了改进和修正<sup>[6-12]</sup>。2008年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)发布了一份指导原则,认为含量占人体血浆中原形药物暴露量10%及以上的代谢产物可能会导致安全性担忧,需要进行非临床表征。最终,在国际人用药品注册技术协调会(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) M3 (R2) 指导原则的协调下,各监管机构对引发安全性担忧的代谢产物暴露阈值达成了一致,即当达到稳态时人体中某代谢产物的暴露量超过药物相关总暴露量的10%,且该代谢产物在人体中的暴露量明显超过在毒理学试验动物中的最大暴露量( $\geq 2$ 倍)时,需在大规模临床试验(通常指Ⅲ期临床试验)开始之前对该代谢产物进行相应的非临床表征<sup>[13]</sup>。FDA于2016

年对其指导原则进行了修订<sup>[14]</sup>,与ICH M3 (R2) 保持一致。

值得注意的是,10%仅仅是当前指导原则推荐的需要对人体代谢产物引起关注的阈值,还需要结合代谢产物的结构、反应活性、在血浆/组织中的蓄积性以及原形药物的临床拟用剂量等特点,按照具体问题具体分析的原则综合考虑。对于每日给药量比较小的药物(如小于每天10 mg),当代代谢产物比例更大时,可能才需要对该代谢产物进行非临床表征<sup>[13]</sup>。相反,对于每日给药剂量比较大的药物,即使代谢产物低于10%阈值,如果代谢产物从结构上具有毒性担忧,或在血浆或组织中有蓄积可能,也可能需要对该代谢产物进行非临床表征。除血浆中代谢产物暴露量外,组织中的代谢产物的蓄积也是需要特别关注的一个方面<sup>[15]</sup>。例如,Casopitant非临床研究显示,重复给药后药物可在血浆中达到稳态,且血浆中代谢产物M200水平较低,但在犬心肌中发现了浓度较高、且可蓄积的M200以及与之相关的心脏毒性<sup>[16]</sup>。此外,代谢产物的结构及反应活性也是评估其是否存在安全性问题的重要考虑因素。进入机体的药物通常会通过Ⅰ相和Ⅱ相代谢途径进行生物转化。对于Ⅰ相代谢产物,很可能具有化学活性和药理活性,因此可能需要进行安全性评价。Ⅱ相结合反应产生的代谢产物一般具有较好的水溶性,并且无明显的药理学活性,因此通常可免于进一步的非临床研究。但对于一些有安全性担忧的代谢产物,例如一些结构不稳定并且具有反应活性的乙酰葡萄糖醛酸(acetylglucuronide)代谢产物,则可能需要进一步的安全性评估<sup>[13,17]</sup>。

目前监管机构发布的指导原则主要关注的是化学稳定的代谢产物,对于具有高化学反应性的活性代谢产物,由于其不稳定、半衰期较短,通常很难检测到,因此也很难对它们进行安全性评估。这些活性代谢产物在某些情况下可能会导致特异性药物不良反应(idiosyncratic adverse drug reactions, IADRs)。由于IADRs具有低发生率(1/100 000~1/10 000)和不可预测的特点,往往直到药物开发后期或大量患者广泛应用时才被发现<sup>[3,18-20]</sup>。尽管活性代谢产物会导致安全性担忧,并且在药物总体毒性中有一定的贡献,但目前尚未有好的方法来检测和评估活性代谢产物风险。由于这些活性代谢产物可能会被转化为稳定代谢产物,如谷胱甘肽结合物。这些谷胱甘肽结合物主要形成于肝,随后以谷胱甘肽结合物的形式通过胆汁排泄,或以巯基尿酸衍生物(尤其是以N-乙酰半胱氨酸)的形式通过尿液排泄。若在体液中检出了这

些代谢产物,则提示有可能形成了活性代谢产物。此外,还可以采用放射性标记的化合物检测与蛋白的共价结合作用来评估是否形成了活性代谢产物<sup>[3]</sup>。目前行业界通常会在药物设计时尽量避免采用可形成活性代谢产物的警示结构来降低活性代谢产物的形成及潜在毒性的发生。此外,人体给药剂量和药物的代谢途径也是影响活性代谢产物及继发的 IADRs 形成的最为重要的因素。每日给药剂量 < 10 mg 的药物似乎很少会导致 IADRs<sup>[21]</sup>,但 > 50 ~ 100 mg 的药物肝毒性发生率会更高<sup>[22]</sup>。体内的多种代谢途径和高清除速率,也可能是某些药物在体外检测到活性代谢产物形成而在体内未见明显毒性的重要原因。

## 2 药物开发过程中的代谢产物研究策略

在药物开发的不同阶段应通过体外和体内研究明确其代谢特征。通常应在首次临床试验开始前完成体外代谢研究,在药物开发早期完成动物体内代谢研究,并且尽可能早地开展人体代谢产物研究,以尽早发现人和动物之间代谢产物的质和/或量的差异,以便在开展大规模临床试验开始前,对那些可能导致安全性担忧的人体特有代谢产物或非成比例代谢产物进行充分非临床评估,预测并降低受试者的非预期安全性风险。结合技术指导原则要求以及业界实际经验<sup>[1, 23-24]</sup>,总结了业界常用的代谢产物研究策略。

在首次临床试验开始之前,采用常用实验动物种属和人的肝微粒体、肝切片或肝细胞进行体外代谢研究,确定候选药物的体外代谢速率及主要代谢产物和代谢途径,初步比较动物种属与人体的代谢差异,以支持后续毒理学试验动物种属选择。需要注意的是,这种种属间的比较主要基于色谱保留时间和质谱数据,代谢产物的确切结构和绝对量尚不明确。尽管这些体外方法对体内循环代谢产物的预测能力有限,但基于这些体外代谢对比研究数据,可在开发早期选择相关动物种属开展毒理学试验,以尽可能覆盖人体代谢产物,提高对人体代谢产物相关安全风险的预测能力。此外,在此阶段还可以对动物体内代谢产物进行定性和定量分析,并与体外代谢研究结果进行对比分析,以更好地了解这些体外代谢试验结果对体内代谢的预测能力。

随着高分辨率质谱技术的发展,对微量代谢产物的检测也已逐渐成为常规,时间飞行质谱和 Orbitrap 质谱等已成为血浆代谢产物研究中强有力的分析设备。在 I 期临床试验期间,可采用这些技术对多次给药剂量递增试验中达到稳态时的人体血浆样本进行分析。由于在此阶段尚未获得代谢产物的标准品,仅

基于质谱数据并不能对代谢产物进行绝对定量,但某些情况下,UV 数据可提供代谢产物与原型药物的相对丰度。可采用混合基质方法对动物和人血浆样本中代谢产物进行相对定量分析<sup>[25-26]</sup>。在 I 期临床试验期间,通常会开展啮齿类动物放射性标记的物质平衡研究,研究者也可采用动物和人共有代谢产物的放射性标记反应的反应因子来定量人体代谢产物<sup>[27]</sup>。通过对动物和人体血浆样本中的代谢产物进行比较,可初步确定动物中代谢产物是否足以覆盖人体代谢产物。研究者可根据初步的对比结果做出是否进一步开展研究的决策,若动物中的代谢产物不足以覆盖人体代谢产物,此时研究者可选择开展进一步的研究,如鉴定代谢产物的结构、采用标准品对代谢产物进行定量。由于代谢产物暴露量有可能不超过药物相关总暴露量的 10%,而且此时尚未开展概念验证研究,药物在后续开发过程中很可能会因缺乏生物学活性而开发失败,此时也可选择不做任何进一步研究。

在 II 期临床试验结束和/或 III 期临床试验前,按照相关技术指导原则要求,所有必要的代谢产物研究均应已经完成,包括采用放射性标记药物开展的人体吸收、分布、代谢、排泄 (absorption, distribution, metabolism, and excretion, ADME) 研究,全面阐明了药物相关物质在体内的药代动力学过程,获得了人体血浆中全面的代谢产物谱和定量信息。对于在人体中发现特有代谢产物或者非成比例代谢产物(即于药物相关总暴露量的 10%,且毒理学试验受试动物体内相应代谢产物暴露量不能覆盖人体代谢产物暴露量),应在大规模临床试验(通常指 III 期临床试验)前完成相应的非临床研究。

## 3 代谢产物的非临床安全性评价

根据治疗靶点、拟定适应症和患者人群,药物开发过程中的代谢产物非临床研究内容和类型会有所不同。对于用于晚期肿瘤患者的药物,一般无需对代谢产物进行非临床评价<sup>[28]</sup>。除晚期肿瘤适应症外,对于适应症为严重的、危及生命疾病的药物(如耐药人类免疫缺陷病毒感染、先天性酶缺乏疾病等),若药物可使患者明显获益,或者尚未有有效的治疗药物批准上市,为优化和加快药物的开发,在与监管机构沟通并达成一致后,可按照 case-by-case 的原则减少代谢产物非临床安全性试验的数量或类型<sup>[13-14]</sup>。

若需要对代谢产物进行非临床安全性试验,一般采用 2 种方式进行代谢产物的非临床安全性评价。  
①在常规毒理学实验动物中鉴定出一种可以产生该代谢产物并有足够暴露水平的动物种属,采用原形药

物在该动物种属中开展非临床安全性试验;②合成或分离代谢产物,并直接给予动物,评价其安全性。对于具有特定化学结构(如特殊立体异构体、复杂的共轭复合物等)的代谢产物,可能无法采用常规的化学合成方法合成,鉴别分离出的代谢产物的量也可能不足以开展毒理学试验。直接将代谢产物给予动物,可能会存在后续代谢,因而可能不会反映临床实际情况,无法评价它们在药物整体毒性中的特定作用,可能会使得毒理学评价变得复杂。应根据代谢产物的化学结构、溶解性、合成/分离的难易程度、吸收难易程度以及代谢稳定性等因素综合考虑代谢产物的非临床研究策略<sup>[14]</sup>。

若代谢产物存在安全性担忧,通常需要在以下非临床安全性试验中对代谢产物的安全性进行界定<sup>[13-14]</sup>。①在一种相关动物种属中开展重复给药毒性试验,试验给药期限应符合ICH M3(R2)要求;②遗传毒性试验:包括点突变试验和体外染色体畸变试验,若结果为不确定和/或阳性,则需要进行完整的遗传毒性标准组合试验;③生殖毒性试验:在一种相关动物种属中开展的胚胎-胎仔发育毒性试验;④致癌性试验:对于连续用药至少6个月,或需间歇用药用于治疗慢性或周期性复发疾病的药物,若原形药物的致癌性试验中未能对代谢产物的潜在致癌性进行充分评估,还需要进行一项致癌性试验。若无需开展致癌性试验,应考虑开展一项体内微核试验。在对代谢产物进行非临床安全性评价时,I期临床试验已经完成,已在人体中评估了对中枢神经系统、呼吸系统和心血管系统等安全药理学试验终点指标的影响,因此一般无需对代谢产物进行安全药理学评价。但是,如果在人体中观察到了原形药物非临床试验中未预测到的安全药理学信号,为更好的了解作用机制,可考虑对这些人体代谢产物开展附加的安全药理学试验。值得注意的是,以上试验并非代谢产物非临床安全性研究的标准组合,可根据原形药物已有的非临床安全性试验中代谢产物暴露情况按照具体问题具体分析的原则选择合适的非临床研究计划。例如,原形药物已有的非啮齿类重复给药毒性试验中代谢产物暴露量已可完全覆盖人体中的代谢产物暴露量,而采用啮齿类动物开展的生殖毒性试验、遗传毒性试验以及致癌性试验中未能对代谢产物的安全性进行充分评估,仅需要对代谢产物进行相应的非临床安全性试验。此外,需要关注的是,体外遗传毒性试验应采用代谢产物开展,体内毒理学试验可根据具体情况选择代谢产物或原形药物在相关动物种属中开展,体内试验给

药途径应尽可能与原形药物的拟定临床给药途径保持一致,在某些特殊情况下,为确保代谢产物能够充分暴露,也可采用其它给药途径。无论采用那种方式开展体内非临床安全性试验,均需要收集毒代动力学数据,以证明代谢产物的暴露量足以涵盖最大治疗剂量下人体暴露量。

#### 4 讨论

由于种属间的代谢差异,可能会导致动物和人体的代谢产物存在质和量的差异。这有可能会造成标准毒理学试验未能充分评估人体代谢产物的安全性风险。本文介绍了何时以及如何鉴定可能引起安全性担忧的代谢产物,并针对这些代谢产物如何进行非临床安全性研究提供了建议。在小分子药物开发过程中,应尽可能早地开展人体代谢产物研究,虽然高分辨率质谱技术在表征代谢产物谱方面具有优异的表现,但由于缺乏代谢产物标准品,该方法并不能对所有代谢产物进行绝对定量。放射性标记的人体物质平衡研究仍是当前对代谢产物谱进行定量研究的最佳方法,该方法不仅可确保血浆中所有代谢产物(包括那些高分辨率质谱分析中丢失的未知代谢产物)被准确鉴别,还可在缺少标准品的情况下计算出代谢产物的暴露量占药物相关总物质暴露量的比例。通常,对于在人体中发现的特有代谢产物或者非成比例代谢产物,即大于药物相关总暴露量的10%,且毒理学试验受试动物体内相应代谢产物暴露量不能覆盖人体代谢产物暴露量(低于50%),应关注该代谢产物的安全性。结合代谢产物的化学结构(I/II相代谢产物)、反应活性、在血浆/组织中的蓄积性以及原形药物的拟定适应症、临床拟用剂量和拟用患者人群等特点,按照具体问题具体分析的原则综合考虑是否有必要对代谢产物进行非临床安全性评价。若需在对代谢产物的安全性进行界定,应在大规模临床试验前完成代谢产物的非临床安全性评估,在至少一种相关动物种属开展的重复给药毒性试验、胚胎-胎仔发育毒性试验、致癌性试验(无需开展致癌性试验时为体内微核试验)中充分暴露和评估代谢产物的安全性风险,并且还应在一项评估致突变和一项评估染色体损伤为终点的体外遗传毒性试验中评估代谢产物的遗传毒性风险。

#### 参考文献:

- [1] SCHADT S, BISTER B, CHOWDHURY S K, et al. A decade in the MIST: Learnings from investigations of drug metabolites in drug development under the "Metabolites in safety testing" regulatory guidance[J]. *Drug Metab Dispos*, 2018, 46(6): 865-878.

- [ 2 ] LUFFER – ATLAS D , ATRAKCHI A. A decade of drug metabolite safety testing: Industry and regulatory shared learning [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* ,2017 ,13( 9) : 897 – 900.
- [ 3 ] HE C , WAN H. Drug metabolism and metabolite safety assessment in drug discovery and development [J]. *Expert Opin Drug Met* ,2018 ,14( 10) : 1071 – 1085.
- [ 4 ] ATRAKCHI A H. Interpretation and considerations on the safety evaluation of human drug metabolites [J]. *Chem Res Toxicol* ,2009 ,22( 7) : 1217 – 1220.
- [ 5 ] BAILLIE T A , CAYEN M N , FOUHA H , *et al.* Drug metabolites in safety testing [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* ,2002 ,182( 3) : 188 – 196.
- [ 6 ] SMITH D A , OBACH R S. Seeing through the MIST: Abundance versus percentage. Commentary on metabolites in safety testing [J]. *Drug Metab Dispos* ,2005 ,33( 10) : 1409 – 1417.
- [ 7 ] SMITH D A , OBACH R S. Metabolites and safety: What are the concerns , and how should we address them? [J]. *Chem Res Toxicol* ,2006 ,19( 12) : 1570 – 1579.
- [ 8 ] SMITH D A , OBACH R S. Metabolites in safety testing ( MIST) : Considerations of mechanisms of toxicity with dose , abundance , and duration of treatment [J]. *Chem Res Toxicol* ,2009 ,22( 2) : 267 – 279.
- [ 9 ] DAVIS – BRUNO K L , ATRAKCHI A. A regulatory perspective on issues and approaches in characterizing human metabolites [J]. *Chem Res Toxicol* ,2006 ,19( 12) : 1561 – 1563.
- [ 10 ] ATRAKCHI A H. Interpretation and considerations on the safety evaluation of human drug metabolites [J]. *Chem Res Toxicol* ,2009 ,22( 7) : 1217 – 1220.
- [ 11 ] LECLERCQ L , CUYCKENS F , MANNENS G S , *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( 2) : 280 – 293.
- [ 12 ] NEDDERMAN A N , DEAR G J , NORTH S , *et al.* From definition to implementation: A cross – industry perspective of past , current and future MIST strategies [J]. *Xenobiotica* ,2011 ,41( 8) : 605 – 622.
- [ 13 ] ICH. ICH M3( R2) nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals [EB/OL]. Geneva: ICH ,2009 – 06 – 11 [2022 – 06 – 30] . <http://www.ich.org/products/open – consultation/qasdocuments/article/m3r2.html>.
- [ 14 ] FDA. Guidance for industry: Safety testing of drug metabolites [EB/OL]. Washington DC: FDA ,2018 – 11 – 22 [2022 – 06 – 30]. <https://www.fda.gov/regulatory – information/search – fda – guidance – documents/safety – testing – drug – metabolites>.
- [ 15 ] PELLEGGATTI M , PAGLIARUSCO S. Drug and metabolite concentrations in tissues in relationship to tissue adverse findings: A review [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* ,2011 ,7( 2) : 137 – 146.
- [ 16 ] PAGLIARUSCO S , MARTINUCCI S , BORDINI E , *et al.* Tissue distribution and characterization of drug – related material in rats and dogs after repeated oral administration of casopitant [J]. *Drug Metab Dispos* ,2011 ,39( 2) : 283 – 293.
- [ 17 ] VAN V T R , LIU H , LEE A , *et al.* Acyl glucuronide metabolites: Implications for drug safety assessment [J/OL]. *Toxicol Lett* ,2017 ,272: 1 – 7. 2017 – 04 – 15 [2022 – 06 – 30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28286018/>.
- [ 18 ] LEUNG L , KALGUTKAR A S , OBACH R S. Metabolic activation in drug – induced liver injury [J]. *Drug Metab Rev* ,2012 ,44( 1) : 18 – 33.
- [ 19 ] UETRECHT J , NAISBITT D J. Idiosyncratic adverse drug reactions: Current concepts [J]. *Pharmacol Rev* ,2013 ,65( 2) : 779 – 808.
- [ 20 ] KALGUTKAR A S , OBACH R S , MAURER T S. Mechanism – based inactivation of cytochrome P450 enzymes: Chemical mechanisms , structure – activity relationships and relationship to clinical drug – drug interactions and idiosyncratic adverse drug reactions [J]. *Curr Drug Metab* ,2007 ,8( 5) : 407 – 447.
- [ 21 ] STEPAN A F , WALKER D P , BAUMAN J , *et al.* Structural alert/ reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: A perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States [J]. *Chem Res Toxicol* ,2011 ,24( 9) : 1345 – 1410.
- [ 22 ] LAMMERT C , BJORNSSON E , NIKLASSON A *et al.* Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events [J]. *Hepatology* ,2010 ,51( 2) : 615 – 620.
- [ 23 ] MA S , CHOWDHURY S K. Analytical strategies for assessment of human metabolites in preclinical safety testing [J]. *Anal Chem* ,2011 ,83( 13) : 5028 – 5036.
- [ 24 ] TIMMERMAN P , BLECH S , WHITE S , *et al.* Best practices for metabolite quantification in drug development: Updated recommendation from the European bioanalysis forum [J]. *Bioanalysis* ,2016 ,8( 12) : 1297.
- [ 25 ] TAKAHASHI R H , KHOJASTE H , WRIGHT M , *et al.* Mixed matrix method provides a reliable metabolite exposure comparison for assessment of metabolites in safety testing ( MIST) [J]. *Drug Metab Lett* ,2017 ,11( 1) : 21 – 28.
- [ 26 ] GAO H , OBACH R S. A simple liquid chromatography – tandem mass spectrometry method to determine relative plasma exposures of drug metabolites across species for metabolite safety assessments ( metabolites in safety testing) . II. Application to unstable metabolites [J]. *Drug Metab Dispos* ,2012 ,40( 7) : 1290 – 1296.
- [ 27 ] YU C , CHEN C L , GORYCKI F L , *et al.* A rapid method for quantitatively estimating metabolites in human plasma in the absence of synthetic standards using a combination of liquid chromatography/ mass spectrometry and radiometric detection [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom* ,2007 ,21( 4) : 497 – 502.
- [ 28 ] ICH. ICH S9 Non – clinical evaluation for anticancer pharmaceuticals [EB/OL]. Geneva: ICH ,2009 – 10 – 29 [2022 – 06 – 30]. [https://database.ich.org/sites/default/files/S9\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/S9_Guideline.pdf).

( 本文编辑 吴焕贤)