

匹妥布替尼在大鼠体内的代谢产物鉴定及代谢途径分析^Δ

张美娟^{1*}, 李洁², 尹航¹, 侯梦雨¹, 李江硕¹, 吴竞轩¹, 董瑞华^{1#}(1.首都医科大学附属北京友谊医院研究型病房, 北京 100050; 2.北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

中图分类号 R969.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)09-1076-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.09.10



摘要 目的 分析、鉴定匹妥布替尼(PTN)在大鼠体内的代谢产物,并探讨其在大鼠体内的可能代谢途径。方法 6只大鼠按照10 mg/kg灌胃PTN混悬液,收集大鼠给药前30 min以及给药后0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h的血液和给药前12 h及给药后24 h的尿液和粪便。采用UHPLC-Orbitrap Exploris 240系统联合Compound Discoverer 3.0和Xcalibur 2.0数据分析软件对PTN在大鼠血浆、尿液和粪便中的代谢产物进行结构鉴定与代谢途径分析。结果 在大鼠生物样本中共鉴定出29种PTN代谢产物,在血浆、尿液和粪便样本中分别鉴定出17、19和22种代谢产物。PTN的代谢途径主要包括氧化、硫酸化、葡萄糖醛酸化等,且其代谢产物多为2种及以上不同代谢形式的组合产物。其中,涉及I相代谢反应的产物共计26个(氧化14个、还原/脱氢9个、脱甲基8个、水解5个),涉及II相代谢反应的产物共计20个(硫酸化14个、葡萄糖醛酸化8个)。结论 PTN在大鼠粪便样本中代谢产物种类较多,主要代谢途径为氧化、硫酸化、葡萄糖醛酸化等。

关键词 匹妥布替尼;代谢产物;代谢途径

Metabolite identification and metabolic pathway analysis of pirtobrutinib in rats

ZHANG Meijuan¹, LI Jie², YIN Hang¹, HOU Mengyu¹, LI Jiangshuo¹, WU Jingxuan¹, DONG Ruihua¹(1. Dept. of Research Ward, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To analyze and identify the metabolites of pirtobrutinib (PTN) in rats, and clarify the possible metabolic pathways of PTN in rats. **METHODS** Six rats were intragastrically administered with 10 mg/kg PTN suspension. Blood samples were collected from the rats 30 minutes before administration and at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 hours after administration. Urine and feces samples were collected 12 hours before administration and 24 hours after administration. UHPLC-Orbitrap Exploris 240 system combined with Compound Discoverer 3.0 and Xcalibur 2.0 software were adopted for structural identification and metabolic pathway analysis of PTN metabolites in rat plasma, urine, and feces. **RESULTS** A total of 29 PTN metabolites were identified, including 17, 19 and 22 metabolites in plasma, urine and feces, respectively. The metabolic pathways of PTN mainly included oxidation, sulfation, glucuronidation, etc., and its metabolites were mostly combination products of two or more different metabolic forms. In detail, a total of 26 metabolites were associated with phase I metabolic reactions (14 oxidation metabolites, 9 reduction/dehydrogenation metabolites, 8 demethylation metabolites, and 5 hydrolysis metabolites). Meanwhile, a total of 20 products were involved in phase II metabolites (14 sulfation metabolites and 8 glucuronic acid binding metabolites). **CONCLUSIONS** PTN exhibits a diverse range of metabolites in rat fecal samples, with the primary metabolic pathways being oxidation, sulfation, glucuronidation, and others.

KEYWORDS pirtobrutinib; metabolites; metabolic pathway

匹妥布替尼(pirtobrutinib, PTN)是一种新型的具有高选择性、可逆性特点的非共价布鲁顿氏酪氨酸激酶

(Bruton's tyrosine kinase, BTK)抑制剂^[1]。研究表明,PTN治疗慢性淋巴细胞白血病或小淋巴细胞淋巴瘤安全有效,并且在存在C481获得性抗性突变的情况下也可充分抑制BTK的活性^[2]。PTN作为第一个获批上市的第三代非共价BTK抑制剂^[3-4],在我国被批准用于既往接受过BTK抑制剂治疗的复发或难治性套细胞淋巴瘤成人患者^[5]。

^Δ基金项目 首都卫生发展科研专项(No. 首发2022-ZZ-20215)

* 第一作者 主管药师,博士。研究方向:临床药理学、药物分析。

E-mail:meijuan_zhang_rw@163.com

通信作者 研究员。研究方向:临床药理学。E-mail:ruihua_dong_rw@163.com

PTN虽然在淋巴细胞恶性肿瘤治疗领域具有广阔的应用前景,但目前其在体内的代谢产物及代谢途径尚不十分清楚。而开展药物的体内代谢产物和代谢途径研究对于探索药物作用机制以及指导临床应用具有重要意义^[6-7]。高分辨质谱是一种用于未知化合物结构鉴定的有效工具,在药物代谢产物鉴定领域得到了广泛应用^[8-9]。鉴于此,本研究采用UHPLC-Orbitrap Exploris 240系统,结合质谱解析软件及未知化合物结构鉴定策略,对大鼠血浆、尿液和粪便中PTN代谢产物进行分析与鉴定,并推测其在大鼠体内的代谢途径,以期PTN的体内代谢和药效物质基础研究提供有效参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有:Vanquish型超高效液相色谱仪、Orbitrap Exploris 240 高分辨质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),XPE205DR型十万分之一天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有:PTN对照品(上海东苍生物科技有限公司,批号DC500200,纯度>98%),二甲基亚砜(北京百灵威科技有限公司,批号LO50V115,纯度99.8%),羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司,批号20210402),甲醇、乙腈(美国Thermo Fisher Scientific公司,色谱级)。

1.3 动物

6只8周龄SD雄性大鼠,体重(230±10)g,购自北京华阜康生物技术有限公司[生产许可证号:SCXK(京)2024-0003]。将大鼠置于代谢笼中,实验前在SPF条件下饲养1周,饲养期间自由摄食、饮水(给药前12h禁食)。本研究通过首都医科大学附属北京友谊医院实验动物管理与使用伦理委员会审查批准,伦理审查号:24-1003。

2 方法

2.1 PTN混悬液的配制

先使用纯净水配制0.5%CMC-Na溶液,磁力搅拌48h使其形成稳定的溶液,再精密称取PTN对照品19.92mg加入溶液中,超声混匀,配制成质量浓度为1.0mg/mL的混悬液。

2.2 动物实验样本采集

6只大鼠按照10mg/kg(根据前期预实验结果确定)灌胃PTN混悬液,灌胃体积约为2.3mL。所有大鼠在给药前30min以及给药后0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24h

时,分别采集血液约0.2mL到EDTA-K₂抗凝管中,离心后取上层血浆。同时,分别收集各组大鼠给药前12h以及给药后24h的尿液和粪便。

2.3 样本前处理

血浆:合并后混匀各时间点每只大鼠的血浆,取200μL,按照4:1的体积比加入冷甲醇(-20℃)沉淀蛋白,以14000r/min离心15min后取上清,氮气吹干后用100μL的50%甲醇复溶。尿液:取各时间点每只大鼠的尿液20μL,混匀后处理方法同血浆。粪便:粪便自然干燥后研磨成粉末,取各时间点每只大鼠均质化后的粪便粉末100mg,混匀后加入5倍体积的50%甲醇,超声30min,以14000r/min离心30min后取上清,氮气吹干,用50%甲醇100μL复溶。

2.4 检测条件

色谱条件:采用Waters XSelect HSS T3(100mm×2.1mm,2.5μm)色谱柱,以水(含0.1%甲酸)为流动相A、乙腈(含0.1%甲酸)为流动相B进行梯度洗脱(0~1.5min,5%B;1.5~9.0min,5%B→60%B;9.0~12min,60%B→100%B;12~14min,100%B;14~14.3min,100%B→5%B;14.3~15min,5%B);柱温为40℃;流速为0.5mL/min;进样体积为8μL。

质谱条件:采用电喷雾离子源,在正、负离子模式下扫描;电喷雾电压分别为3.5、-2.5kV;碰撞能梯度参数为15、20、25eV;毛细管温度为350℃;辅助气流速为10arb;扫描范围为质荷比(*m/z*)50~1000Da(Full MS)、*m/z* 50~500Da(Full MS/dd MS²)。

2.5 样本检测及数据处理

取“2.3”项下样本按“2.4”项下条件进样分析。使用Xcalibur 2.0数据处理系统采集和处理质谱数据,同时使用Compound Discoverer 3.0软件对实验样品和给药前的血浆空白样品进行二元比对;设置质量偏差小于5ppm,并根据同位素丰度比、氮规则解析等发现可能的代谢产物。然后根据精确分子质量、元素组成、保留时间(retention time, RT)等信息确定可能的潜在代谢产物,再针对性采集这些代谢产物的二级谱图,并对其二级碎片离子进行解析,确定代谢位点。

3 结果

3.1 PTN的体内代谢产物分析结果

通过对大鼠给药前后的血浆、尿液和粪便图谱进行分析,并结合精确分子质量、RT、二级碎片离子等参数,共初步鉴定出29种代谢产物。其中,在血浆、尿液、粪便中分别检测到17、19、22种代谢产物;仅在血浆中检测到

的代谢产物有4种,仅在粪便中检测到的代谢产物有6种,在血浆、尿液、粪便中均检测到的代谢产物有10种。具体质谱信息见表1,PTN代谢产物的提取离子流图见图1。

3.1.1 代谢产物M1、M2、M14、M17

M17(RT=7.74 min)的准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 558.109 4,推测其分子式为C₂₂H₂₁F₄N₅O₆S。该代谢产物较PTN的分子量增加了80 Da,并且其二级质谱图中也有SO₃的特征碎片离子峰 *m/z* 79.957 5,并且有准分子离子峰失去1个酰胺基生成的特征碎片离子峰 *m/z* 515.102 8和丢失1个—SO₃、2个—HF后生成的特征碎片离子峰 *m/z* 438.139 2,故笔者推断其为PTN原型药物的硫酸化代谢产物。M2(RT=6.28 min)的准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 405.049 4,分子式为C₁₄H₁₅F₃N₄O₅S,推断其为M17酰胺键发生水解断裂后产生。在其质谱图中,可见M17失去1个酰胺基生成的碎片离子峰 *m/z* 362.041 5,同时存在准分子离子峰丢失1个—SO₃和1个—HF产生的特征碎片离子峰 *m/z* 305.080 5和丢失1个—SO₃和2个—HF后产生的特征碎片离子峰 *m/z* 285.078 5。

M1(RT=5.32 min)的准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 407.065 3,分子式为C₁₄H₁₅F₃N₄O₅S,比M2的分子量增加了2 Da,推测其是由M2进一步发生还原反应后产生。M14(RT=7.40 min)的准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 515.103 3,推测其分子式为C₂₁H₂₀F₄N₄O₅S;其分子量比M17少了43 Da,且其二级质谱中同样存在较高的一SO₃特征碎片离子峰 *m/z* 79.957 5、准分子离子峰丢失1个—HF后产生的特征碎片离子峰 *m/z* 495.097 2以及酰胺键断裂形成的特征碎片离子峰 *m/z* 361.059 6,故笔者推断其为M17脱去吡唑环上的酰胺基后形成的产物,即为原型药物发生水解脱酰胺基团及硫酸化后生成。

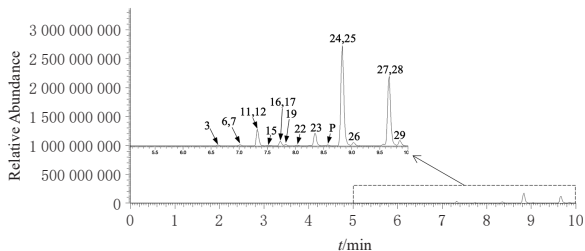
3.1.2 代谢产物M4、M5、M7、M19

M4(RT=6.83 min)、M5(RT=6.95 min)、M7(RT=7.00 min)和M19(RT=7.83 min)的准分子离子峰[M-H]⁻均为 *m/z* 574.102 5,分子式均为C₂₂H₂₁F₄N₅O₇S,比原型药物分子量多出96 Da(1个—SO₃),故笔者推断上述化合物均为原型药物发生氧化和硫酸化后生成,且互为同分异构体。具体来看,M7首先失去了1个—SO₃、1个—NH₂后生成特征碎片离子峰 *m/z* 479.133 4,该离子

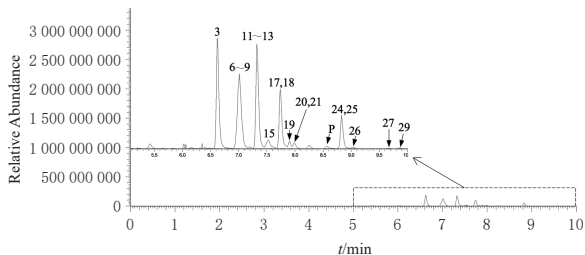
表1 PTN在大鼠血浆、尿液、粪便中的代谢产物

编号	RT/min	分子式	理论 <i>m/z</i>		实测 <i>m/z</i>		误差/ppm		主要碎片离子 <i>m/z</i>	来源	代谢途径
			正离子模式	负离子模式	正离子模式	负离子模式	正离子模式	负离子模式			
M1	5.32	C ₁₄ H ₁₅ F ₃ N ₄ O ₅ S	409.078 8	407.064 2	—	407.065 3	—	2.7	364.057 0,307.100 1,287.094 0	F	水解+脱胺+还原+硫酸化
M2	6.28	C ₁₄ H ₁₅ F ₃ N ₄ O ₅ S	407.063 2	405.048 6	—	405.049 4	—	2.1	362.041 5,305.084 5,285.078 5	F	水解+脱胺+硫酸化
M3	6.63	C ₂₇ H ₂₇ F ₃ N ₄ O ₆	642.181 8	640.167 2	642.182 1	640.168 6	0.5	2.1	466.149 0,449.122 6,311.110 8	P,U	脱甲基+葡萄糖醛酸化
M4	6.83	C ₂₂ H ₂₁ F ₄ N ₅ O ₇ S	576.117 1	574.102 5	—	574.103 7	—	2.1	531.094 8,474.137 9,454.131 5	F	氧化+硫酸化
M5	6.95	C ₂₂ H ₂₁ F ₄ N ₅ O ₇ S	576.117 1	574.102 5	576.117 3	574.103 7	0.4	2.1	531.094 9,474.137 9,454.131 6	F	氧化+硫酸化
M6	6.96	C ₂₈ H ₂₉ F ₄ N ₅ O ₇ S	736.154 2	734.139 7	736.153 7	734.141 4	-0.7	2.3	654.184 0,558.108 5,478.151 4	P,U,F	硫酸化+葡萄糖醛酸化
M7	7.00	C ₂₂ H ₂₁ F ₄ N ₅ O ₇ S	576.117 1	574.102 5	576.117 3	574.103 7	0.4	2.1	479.133 4,294.084 8,162.029 2	P,U,F	氧化+硫酸化
M8	7.03	C ₂₁ H ₁₉ F ₄ N ₅ O ₇ S	546.106 5	544.091 9	546.106 5	544.093 6	0	3.1	464.135 1,444.128 9,424.123 1	U,F	脱甲基+硫酸化
M9	7.05	C ₂₈ H ₂₉ F ₄ N ₅ O ₇ S	736.154 2	734.139 7	736.153 7	734.141 4	-0.7	2.3	654.184 0,558.108 5,478.151 4	U,F	硫酸化+葡萄糖醛酸化
M10	7.21	C ₂₇ H ₂₇ F ₃ N ₄ O ₆	722.138 6	720.124 0	—	720.125 9	—	2.5	640.165 3,586.101 3,464.133 9	F	脱甲基+硫酸化+葡萄糖醛酸化
M11	7.32	C ₂₈ H ₂₉ F ₄ N ₅ O ₇	672.192 3	670.177 8	672.192 4	670.179 6	0.2	2.8	481.149 3,463.138 6,294.084 8	P,U,F	氧化+葡萄糖醛酸化
M12	7.33	C ₂₈ H ₂₉ F ₄ N ₅ O ₇	656.197 4	654.182 9	656.197 6	654.185 1	0.3	3.5	639.170 5,621.160 1,480.165 1	P,U,F	葡萄糖醛酸化
M13	7.40	C ₂₅ H ₂₅ F ₄ N ₅ O ₇ S	584.158 5	582.144 0	584.158 6	582.145 5	0.1	2.7	567.131 0,398.077 5,386.077 2	U,F	水解+半胱氨酸偶联+脱水
M14	7.40	C ₂₁ H ₂₀ F ₄ N ₄ O ₅ S	517.116 3	515.101 8	—	515.103 3	—	3.0	495.097 2,361.059 6,79.957 5	F	水解+硫酸化
M15	7.53	C ₂₈ H ₂₉ F ₄ N ₅ O ₇	672.192 3	670.177 8	672.192 4	670.179 6	0.2	2.8	478.149 4,309.095 5,153.034 4	P,U	氧化+葡萄糖醛酸化
M16	7.73	C ₁₄ H ₁₅ F ₃ N ₄ O ₅	346.100 9	344.086 4	—	344.086 8	—	1.3	326.074 6,300.003 9,186.027 8	P	水解+脱胺+还原+氧化
M17	7.74	C ₂₂ H ₂₁ F ₄ N ₅ O ₆ S	560.122 2	558.107 6	560.121 2	558.109 4	-1.8	3.2	515.102 8,438.139 2,79.957 5	P,U,F	硫酸化
M18	7.79	C ₂₂ H ₂₁ F ₄ N ₅ O ₄	496.160 3	494.145 7	496.160 3	494.146 7	0.2	2.0	479.132 8,311.112 4,294.084 7	U,F	氧化
M19	7.83	C ₂₂ H ₂₁ F ₄ N ₅ O ₇ S	576.117 1	574.102 5	—	574.103 8	—	2.3	449.122 7,96.959 6,80.964 8	P,U	氧化+硫酸化
M20	7.90	C ₂₇ H ₂₇ F ₃ N ₄ O ₆	629.186 5	627.172 0	629.186 5	627.173 2	0	1.9	460.131 7,453.154 0,284.100 2	U,F	水解+氧化+葡萄糖醛酸化
M21	7.91	C ₂₁ H ₁₉ F ₄ N ₅ O ₇ S	546.106 5	544.091 9	546.107 1	544.093 6	1.2	3.1	464.136 1,444.129 9,406.080 8	U,F	脱甲基+硫酸化
M22	8.03	C ₂₁ H ₁₇ F ₄ N ₅ O ₇ S	560.085 8	558.071 2	—	558.072 6	—	2.5	478.112 4,461.086 0,435.107 3	P	脱甲基+氧化+脱氢+硫酸化
M23	8.35	C ₂₂ H ₁₉ F ₄ N ₅ O ₄	494.144 6	492.130 0	494.144 3	492.131 2	-0.7	2.3	325.091 1,308.064 5,153.034 9	P	氧化+脱氢
PTN	8.58	C ₂₂ H ₂₁ F ₄ N ₅ O ₃	480.165 3	478.150 8	480.165 3	478.151 7	-0.1	1.9	463.138 1,294.084 5,153.034 5	P,U,F	药物原型
M24	8.83	C ₂₂ H ₁₉ F ₄ N ₅ O ₄	494.144 6	492.130 0	494.144 3	492.131 4	-0.7	2.7	477.118 5,308.064 5,153.034 9	P,U,F	氧化+脱氢
M25	8.84	C ₂₁ H ₁₉ F ₄ N ₅ O ₃	466.149 7	464.135 1	466.149 6	464.136 4	-0.2	2.8	449.122 5,311.111 1,294.084 4	P,U,F	脱甲基
M26	9.02	C ₂₁ H ₁₇ F ₄ N ₅ O ₄	480.129 0	478.114 4	480.129 3	478.115 9	0.7	3.2	438.103 3,395.096 8,365.106 6	P,U,F	脱甲基+氧化+脱氢
M27	9.66	C ₂₂ H ₁₉ F ₄ N ₅ O ₃	478.149 7	476.135 1	478.150 2	476.136 3	1.0	2.5	461.123 7,309.096 2,153.034 8	P,U,F	脱氢
M28	9.72	C ₂₂ H ₁₉ F ₄ N ₅ O ₃	510.139 5	508.124 9	510.139 8	508.125 9	0.5	1.8	493.111 5,341.084 6,153.034 2	P	双氧化+脱氢
M29	9.85	C ₂₁ H ₁₇ F ₄ N ₅ O ₃	464.134 0	462.119 5	464.133 9	462.120 5	-0.4	2.1	422.108 3,379.102 6,349.111 9	P,U,F	脱甲基+脱氢

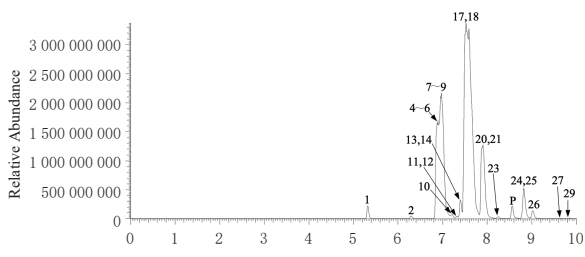
—:未检出;P:血浆;U:尿液;F:粪便。



A. 血浆



B. 尿液



C. 粪便

P: 原型药物 PTN; 1~29: 对应表 1 中编号 M1~M29 的代谢产物。

图 1 PTN 代谢产物的提取离子流图 (负离子模式)

碎片会进一步断裂形成特征离子碎片峰 m/z 294.084 7、 m/z 169.029 2, 证明其氧化位置在甲氧基苯基一侧; 而对于 M4、M5 和 M19, 则无法明确其具体取代位置。

3.1.3 代谢产物 M6、M9

M6 (RT=6.96 min) 和 M9 (RT=7.05 min) 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 均为 m/z 734.141 4, 推测其分子式均为 $C_{28}H_{29}F_4N_5O_{12}S$, 两者为同分异构体。其质谱图中均存在准分子离子峰丢失 1 个 $-SO_3$ 生成的特征碎片离子峰 m/z 654.184 0、丢失 1 个 $-GluA$ 生成的特征碎片离子峰 m/z 558.108 5, 同时存在准分子离子峰丢失 1 个 $-SO_3$ 和 1 个 $-GluA$ 生成的特征碎片离子峰 m/z 478.151 4, 故可推断其为原型药物发生硫酸化与葡萄糖醛酸化后形成的产物。

3.1.4 代谢产物 M12、M18、M11、M15、M20

M12 (RT=7.33 min) 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 656.197 6, 推测其分子式为 $C_{28}H_{29}F_4N_5O_9$ 。与原型药物相比, M12 的分子量增加了 176 Da, 推测其为原型药物发生葡萄糖醛酸化后形成的产物; 同时, 其色谱图中存在特征碎片离子峰 m/z 480.165 1, 推测是准分子离子峰丢失了 1 个 $-GluA$ 。M18 (RT=7.79 min) 的准分子离子峰

$[M+H]^+$ 为 m/z 496.160 3, 推测其分子式为 $C_{22}H_{21}F_4N_5O_4$ 。M18 的分子量比原型药物多了 16 Da, 且其在 m/z 294.084 7 处有特征碎片离子峰, 故笔者推断其氧化位置在甲氧基苯基一侧。M11 (RT=7.32 min) 和 M15 (RT=7.53 min) 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 均为 m/z 672.192 4, 推测其分子式均为 $C_{28}H_{29}F_4N_5O_{10}$, 两者互为同分异构体。其分子量比 M12 多了 16 Da, 比 M18 多了 176 Da, 故可推断其为在 M12 的基础上发生氧化或者在 M18 的基础上发生葡萄糖醛酸化后形成的产物。M11 的离子碎片特征与 M7 相似, 在 m/z 294.084 8 处有特征碎片离子峰, 故笔者推断其氧化位置在甲氧基苯基一侧; 而 M15 在 m/z 309.095 5、 m/z 153.034 4 处有特征碎片离子峰, 推断其氧化位置在苯并吡唑基团一侧。M20 (RT=7.90 min) 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 629.186 5, 推测其分子式为 $C_{27}H_{28}F_4N_4O_9$, 分子质量比 M12 少了 27 Da, 故笔者推测其是在 M12 的基础上发生脱酰胺基团后形成的产物。

3.1.5 代谢产物 M13、M25、M3、M8、M21、M10、M29、M22

M13 (RT=7.40 min) 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 584.158 6, 推测其分子式为 $C_{25}H_{25}F_4N_5O_5S$ 。二级质谱图显示, 其在 m/z 567.131 0 和 m/z 398.077 5 处有特征碎片离子峰, 故笔者推测其是由原型药物酰胺基上的氨基发生水解、半胱氨酸基团取代接着又失去 1 分子 H_2O 后得到。M25 (RT=8.84 min) 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 466.149 6, 推测其分子式为 $C_{21}H_{19}F_4N_5O_3$ 。M25 的分子量比原型药物少了 14 Da, 且在 m/z 449.122 5、 m/z 311.111 1、 m/z 294.084 4 处有特征碎片离子峰, 故笔者推断其为原型药物苯环上甲氧基脱甲基后形成的产物。M3 (RT=6.63 min) 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 642.182 1, 推测其分子式为 $C_{27}H_{27}F_4N_5O_9$, 可能是由 M25 发生葡萄糖醛酸化后得到。M8 (RT=7.03 min) 和 M21 (RT=7.91 min) 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 均为 m/z 544.093 6, 推测其分子式均为 $C_{21}H_{19}F_4N_5O_6S$, 二者同为 M25 发生硫酸化后形成的产物。M10 (RT=7.21 min) 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 720.125 9, 推测其分子式为 $C_{27}H_{27}F_4N_5O_{12}S$, 为 M25 同时发生葡萄糖醛酸化和硫酸化后生成。M29 (RT=9.85 min) 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 462.120 5, 推测其分子式为 $C_{21}H_{17}F_4N_5O_3$, 为 M25 失去 2 个氢原子后生成。M22 (RT=8.03 min) 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 558.072 6, 推测其分子式为 $C_{21}H_{17}F_4N_5O_7S$, 为 M29 进一步发生氧化和硫酸化后生成。

3.1.6 代谢产物M27、M23、M24、M26、M28、M16

M27(RT=9.66 min)的准分子离子峰[M+H]⁺为 *m/z* 478.150 2, 推测其分子式为 C₂₂H₁₉F₄N₅O₃。其分子量比原型药物少了 2 Da, 且在 *m/z* 461.123 7、*m/z* 309.096 2、*m/z* 153.034 8 处有特征碎片离子峰, 故笔者推断其为原型药物苯基吡唑一侧脱 2 分子氢后形成的产物。M23(RT=8.35 min)的准分子离子峰[M+H]⁺为 *m/z* 494.144 3, 推测其分子式为 C₂₂H₁₉F₄N₅O₄; M24(RT=8.83 min)的准分子离子峰[M+H]⁺为 *m/z* 494.144 3, 推测其分子式为 C₂₂H₁₉F₄N₅O₄, 二者均为 M27 发生氧化后形成的产物。其中, M23 在 *m/z* 325.091 1、*m/z* 308.064 5 处有特征碎片离子峰, 推断其氧化位置也在苯基吡唑一侧。M26(RT=9.02 min)的准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 478.115 9, 推测其分子式为 C₂₁H₁₇F₄N₅O₄, 为 M23(或 M24)脱甲基后形成的产物。M28(RT=9.72 min)的准分子离子峰[M+H]⁺为 *m/z* 510.139 8, 推测其分子式为 C₂₂H₁₉F₄N₅O₅, 为 M23(或 M24)发生氧化后形成的产物。M16(RT=7.73 min)的准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 344.086 8, 推测其分子式为 C₁₄H₁₄F₃N₃O₄。其准分子离子峰失去 1 分子 H₂O 后产生特征碎片离子峰 *m/z* 326.074 6, 且其在 *m/z* 300.003 9、*m/z* 186.027 8 处有特征碎片离子峰, 故笔者推测其为原型药物的酰胺键发生水解断裂, 脱掉 2 个氨基后发生氧化生成的产物。

3.2 PTN 的体内代谢途径分析

PTN 在血浆、尿液和粪便中主要涉及的代谢途径包括氧化、硫酸化、葡萄糖醛酸化、水解、脱甲基、脱氢、还

原、脱胺以及上述反应的组合。涉及 I 相代谢反应的产物共计 26 个(氧化 14 个、还原/脱氢 9 个、脱甲基 8 个、水解 5 个)、涉及 II 相代谢反应的产物共计 20 个(硫酸化 14 个、葡萄糖醛酸化 8 个); 半胱氨酸偶联产物只在尿液和粪便中检测到, 脱胺产物只在血浆和粪便中检测到。推测的 PTN 相关代谢途径见图 2。

4 讨论

本研究采用 UHPLC-Orbitrap Exploris 240 系统联合 Compound Discoverer 3.0 和 Xcalibur 2.0 数据分析软件, 对 PTN 在大鼠血浆、尿液和粪便中的代谢产物进行结构鉴定与代谢途径分析。由于 PTN 在大鼠体内的半衰期数据未见报道, 本研究为了在实验过程中收集到更多的代谢产物, 所以将血液样品的采集时间设定为给药后 0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h, 尿液和粪便的采集时间设定为给药后 24 h。美国 FDA 公布的 PTN 的药品说明书内容显示: PTN 在体外主要通过细胞色素 P450 代谢, 并通过尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(uridine diphosphate glucuronosyltransferase, UGT)(如 UGT1A8 和 UGT1B9)直接糖基化。人体试验中单次口服 200 mg PTN 后, 其绝对生物利用度为 75.9%~90.9%, 中位数为 85.5%; 血药浓度达峰时间为 0.833~4.150 h, 中位数为 2.000 h; 其在人体内 37% 的剂量通过粪便排泄(18% 为原型药物)、57% 的剂量通过尿液排泄(10% 为原型药物)。本研究发现, PTN 在大鼠体内的代谢产物多为 2 种及以上不同代谢形式的组合产物, 代谢形式主要涉及氧化、还原、脱甲基、水解等 I 相代谢反应; 代谢形式涉及 II 相代谢结

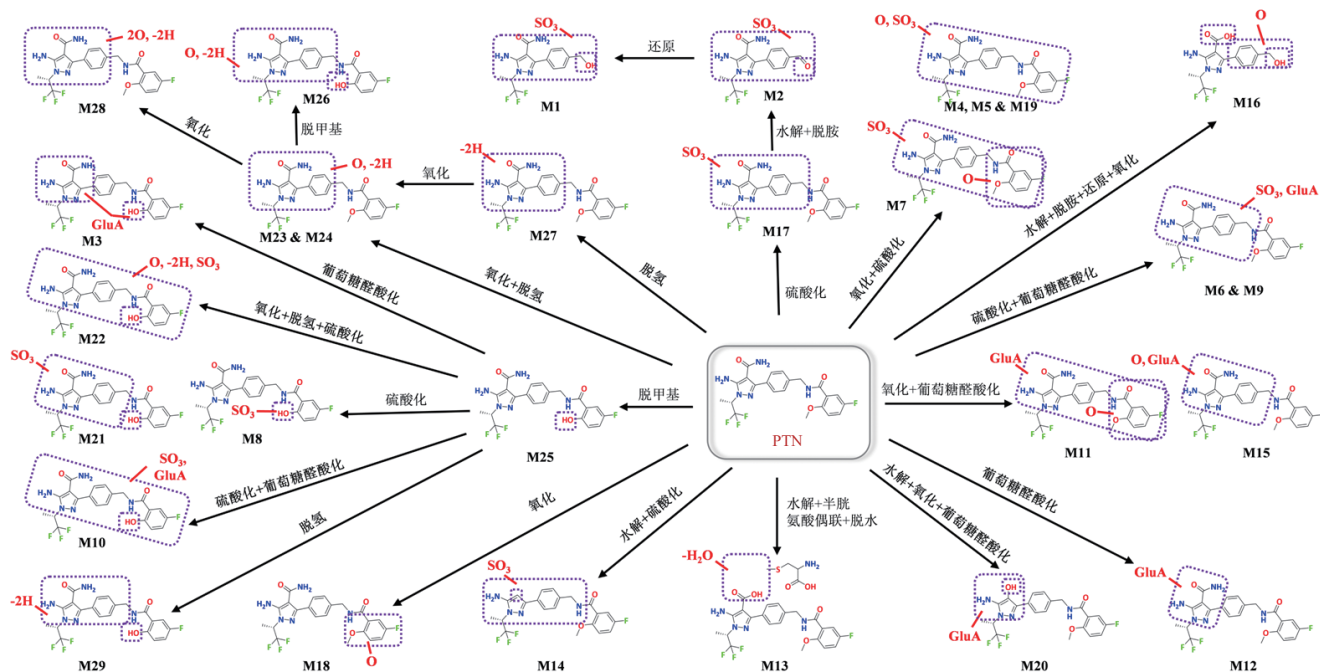


图2 PTN 在大鼠体内的代谢途径总结

合反应的代谢产物有20个,主要包括葡萄糖醛酸化代谢产物以及硫酸化代谢产物。

本研究发现,有4种PTN代谢产物仅可在血浆样本中检出,这可能由于其未被转化生成极性更大、更容易被排泄出体外的代谢产物,或是由于其其在尿液或粪便中的含量太低而未被检出;有6种代谢产物仅可在粪便中检出,均为发生硫酸化和葡萄糖醛酸化反应后形成的代谢产物,说明此类通过Ⅱ相代谢反应后得到的代谢产物可以快速从血液排泄到粪便^[10]。

目前,笔者尚未检索到关于PTN在体内的代谢产物结构或代谢途径的文献报道。在本研究中,笔者根据质谱裂解信息及RT等信息对PTN代谢产物的取代基位置进行了推断。笔者参考文献报道的方法^[11-12],利用Compound Discoverer 3.0软件对质谱数据进行解卷积并提取响应较大的峰,获得每个峰的 m/z 、RT和信号强度等信息,再对列表中化合物的二级质谱信息进行有针对性的分析和结构鉴定。值得注意的是,由于药物代谢存在种属差异^[13],大鼠体内PTN的代谢数据不能完全反映其在人体内的代谢过程。

综上所述,本研究利用UHPLC-Orbitrap Exploris 240系统,在大鼠生物样本中共鉴定出29种PTN的代谢产物(在血浆、尿液和粪便中分别鉴定出17、19和22种),其主要代谢途径为氧化、硫酸化、葡萄糖醛酸化等。

参考文献

[1] GOMEZ E B, EBATA K, RANDEIRA H S, et al. Preclinical characterization of pirtobrutinib, a highly selective, noncovalent (reversible) BTK inhibitor[J]. *Blood*, 2023, 142(1):62-72.

[2] LEWIS K L, CHEAH C Y. Non-covalent BTK inhibitors: the new BTKids on the block for B-cell malignancies[J]. *J Pers Med*, 2021, 11(8):764.

[3] SHIRLEY M. Bruton tyrosine kinase inhibitors in B-cell malignancies: their use and differential features[J]. *Target Oncol*, 2022, 17(1):69-84.

[4] TELARAJA D, KASAMON Y L, COLLAZO J S, et al. FDA approval summary: pirtobrutinib for relapsed or re-

fractory mantle cell lymphoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2024, 30(1):17-22.

[5] MONTOYA S, THOMPSON M C. Non-covalent Bruton's tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic lymphocytic leukemia[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(14):3648.

[6] MAK K K, EPEMOLU O, PICHKA M R. The role of DMPK science in improving pharmaceutical research and development efficiency[J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(3):705-729.

[7] YOKOI T. A new era in the study of individual differences in drug metabolism and pharmacokinetics[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013, 28(1):1-2.

[8] WEN B, ZHU M S. Applications of mass spectrometry in drug metabolism: 50 years of progress[J]. *Drug Metab Rev*, 2015, 47(1):71-87.

[9] ZHU M S, ZHANG H Y, GRIFFITH HUMPHREYS W. Drug metabolite profiling and identification by high-resolution mass spectrometry[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(29):25419-25425.

[10] ZAMEK-GLISZCZYNSKI M J, HOFFMASTER K A, NEZASA K I, et al. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 27(5):447-486.

[11] 谭艳, 汤明海, 杜蕾蕾, 等. UHPLC-MS/MS研究抗肿瘤化合物E28在不同种属肝微粒体中的代谢产物[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(20):2044-2050.

[12] 梁幼玲, 史旭华, 白俊其, 等. 采用UHPLC-MS和质量亏损过滤技术分析二苯乙烯苷在大鼠体内的代谢产物和代谢途径[J]. *中国药房*, 2021, 32(6):675-681.

[13] BAILLIE T A, RETTIE A E. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra- and inter-species differences in drug metabolism[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 26(1):15-29.

(收稿日期:2024-12-10 修回日期:2025-03-19)

(编辑:林 静)