·重大新药创制专项巡礼·

基因毒性杂质的毒理学评估策略

石富江,王全军
(军事医学研究院毒物药物研究所,抗毒物药物与毒理学国家重点实验室,国家北京药物安全评价研究中心,北京 100850)

[摘要] 基因毒性杂质的限度确定是药物安全研究的重要内容。有潜在基因毒性的杂质根据其结构特征和毒理学数据可分为5类:已知有致突变性及致癌性的杂质、有致突变性但致癌性未知的杂质、含有与药物活性成分结构无关的警示结构但无致突变性数据的杂质、含与药物活性成分相关警示结构的杂质以及致癌风险高的特殊杂质。本文以毒理学评价的方法,分类对基因毒性杂质的评估策略进行综述,并示例杂质限度确定的方法。

[关键词] 基因毒性杂质;安全性评价;毒理学
[中图分类号] R994 [文献标志码] A [文章编号] 1003-3734(2020)03-0232-04

Toxicological evaluation strategy of genotoxic impurities

SHI Fu-jiang, WANG Quan-jun
(*National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research*, *State Key Laboratory of Medical Countermeasures and Toxicology*, *Institute of Pharmacology and Toxicology*, *Academy of Military Sciences*, *Beijing* 100850, *China*)

[**Abstract**] The determination of acceptable limits for genotoxic impurities is an important part of drug safety research. Impurities with potential genotoxicity can be divided into five categories according to their structural characteristics and toxicological data: known mutagenic carcinogens, known mutagens with unknown carcinogenic potential, substances containing alerting structure that are unrelated to the structure of the drug substance but without mutagenicity data, substances containing alerting structure related to the drug substance and special impurities with high carcinogenic potency. This paper uses the method of toxicological evaluation to review the evaluation strategies of genotoxic impurities, and illustrate the method for determining acceptable limits.

[**Key words**] genotoxic impurities; safety evaluation; toxicology

基因毒性杂质是药物在合成、储存或者制剂过程中形成的能与细胞或生物体的DNA反应,对DNA有潜在破坏性的杂质,也包括一些结构上类似基因毒性物质但未经实验证明具有基因毒性的杂质。

基因毒性物质的特点是在任何暴露量下都有可能对DNA产生损伤,进而可能诱发肿瘤。因其毒性较强、潜在风险大,对用药的安全性有强烈的威胁。近年来在已上市药品中因为痕量的基因毒性杂质残留而引发的医疗事故和禁售事件也陆续被发现,如最早引发关注的甲磺酸奈非那韦事件和近两年出现的*N*-亚硝基二甲胺事件,因此人用药品注册技术要求国际协调会议(ICH)、欧洲EMEA及美国FDA等机构都陆续提出了基因毒性杂质研究策略和限度要求[1],我国国家药品监督管理局药品审评中心(CDE)也于2020年5月8日发布了《化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行)》[2],为"关注杂

[基金项目] 国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2018ZX09711003-007,2018ZX09721003-001-005,2018ZX09201017-003)
[作者简介] 石富江,男,实验师,主要从事药物毒理学与药物非临床安全评价研究。联系电话:(010)66874613-421,E-mail:sidgon@163.com。
[通讯作者] 王全军,男,研究员,博士生导师,主要从事药物毒理学与药物非临床安全评价研究。E-mail:wangquanjunbeijing@163.com。

质”的研究和控制提供指导,国内外医药机构在新药研发过程中也越来越关注基因毒性杂质的控制和检测。

杂质在化合物合成过程中是难以避免的,且种类多、分类困难,为了区分普通杂质和基因毒性杂质,各法规和指导原则普遍采用了“警示结构”的方法,将可能引起基因毒性的结构列入关注队列,含有这些基团的杂质通常被认为具有潜在基因毒性。化合物是否含基因毒性杂质可以通过化学反应机制来分析确认,实际产生的有明确遗传毒性阈值的杂质,可以通过制定限度标准将暴露水平限定在安全范围内;对于有潜在基因毒性的杂质,可通过查询“警示结构”数据库来确认,这类杂质由于没有充分的证据或实验来支持其阈值相关机制,所以无法确定安全剂量,需要进行药学和毒理学评估。

药学评估主要是选择适当的配方和生产策略,以避免或减少基因毒性杂质的产生,在遵循“合理可行的最低限量”(as low as reasonably practicable, ALARP)原则的基础上,再经过毒理学评估以验证其合理性。

基因毒性杂质的毒理学评估遵循“具体问题具体分析”原则[3],本文根据杂质的结构特征和毒理学数据,将杂质分为 5 类分别对毒理学评估策略进行综述,并示例杂质限度确定的方法。

1 基因毒性杂质的毒理学评估策略

1.1 已知有致突变致癌性的杂质,包括具有足够遗传毒性作用机制数据的动物致癌物和人类致癌物 这类物质可基于文献报道和数据库来确认,其致突变和致癌性实验结果为阳性,但是只有在超过一定限度才产生毒性效应。对于有足够致癌性数据的物质,可以直接采用已公布的测定数据制定限度标准,或根据动物致癌性强度数据,采用线性外推法计算人体可接受摄入量;对于有明确遗传毒性阈值的物质,可以参照 ICH Q3C 的方法,根据相关动物实验的“未观察到效应水平”(no-observed effect level, NOEL)或“观察到有害效应的最低水平”(lowest-observed adverse effect level, LOAEL),计算“每日允许暴露量”(permissible daily exposure, PDE)。致突变致癌物数据主要来源于毒理学研究结果,因此对于权威数据库中已列出的基因毒性杂质,可根据已知数据将杂质限定在安全限度之下,无需再进行毒理学实验。此类杂质在药物研发和生产过程中应尽量避免产生,如果无法避免,应该优化相关工艺以减少其含量,并制定合理的分析检测方法进行限度控制。

1.2 已知具有致突变性但致癌性未知的杂质 这类物质通常在体外遗传毒性实验中为阳性结果,如细菌回复突变实验、染色体畸变实验,但是啮齿类动物的致癌性数据未见报告。在缺乏体内关联信息时,通常体外基因毒性物质也被假定为体内诱变剂和致癌剂,但由于缺乏产生生物学意义的阈值数据,安全暴露水平无法确定,因此在欧洲 EMA 发布的《基因毒性杂质限度指导原则》中引入了“毒理学关注阈值”(threshold of toxicological concern, TTC)的概念,为无法确定暴露水平的基因毒性杂质提供一个可接受的摄入水平,通常认为摄入量在低于此水平时患癌的风险将远低于正常风险水平,经过对多个致癌性物质的致癌能力概率分布进行分析验证,得到适用于大多数致癌物质的 TTC 估值为每人 1.5 $\mu g \cdot d^{-1}$。因此对于无法确定阈值的基因毒性杂质,通常认为人每日摄入量低于 1.5 μg 时,诱发癌变的风险是可以接受的。一些特殊的不宜采用 TTC 评估的杂质,如果在体外遗传毒性实验中呈阳性结果,也可以采用一些反应机制相似或具有预期靶组织暴露的体内试验(如微核试验、体内基因突变试验、彗星试验等[3])进行关联性研究,为设定限度指标提供数据支持。

对于一些例外情况,如短期用药,用来治疗威胁生命疾病的药物,用药者的存活期预期较短,或该杂质由其他途径获得的暴露量远高于药物时,需要进行风险效益评估,必要时 TTC 值可以高于 1.5 $\mu g \cdot d^{-1}$。

1.3 含有与药物活性成分结构无关的警示结构但无致突变性数据的杂质 警示结构的重要性在于提示可能存在的基因毒性和致癌性,为进一步安全性评价和制定控制策略指明方向,但具有警示结构并不一定具有基因毒性,因此对这一类杂质,需要通过毒理学方法来评价,通常采用细菌回复突变实验检测分离的杂质或杂质与药物活性成分的混合物,如果实验结果为阴性,可按照一般杂质控制,如果细菌回复突变实验显示警示结构具有基因毒性,可采用 TTC 来确定限度,必要时根据体外实验的阳性结果追加合适的体内试验进一步验证。例如,对于细菌回复突变实验在非 S9 代谢活化条件下出现的阳性结果,可采用 *Pig-a* 基因突变实验来检测直接作用的致突变物,或采用微核试验检测直接诱变剂和染色体断裂剂;如果细菌回复突变实验的阳性结果仅

出现在 S9 代谢活化条件下,且推测该杂质可在肝脏诱导大的加合物,可采用大鼠肝脏程序外 DNA 合成实验;如果已有信息表明杂质具有导致 DNA 前期损伤的化学结构特异性作用,如形成碱基不稳定位点或单链断裂,可选择彗星试验。

1.4 警示结构与药物活性成分相关的杂质 所含警示结构与药物活性成分的结构相同,或与药物中结构相关化合物的警示结构相同,此类杂质如果已有数据或实验证明该警示结构无致突变性,则按一般杂质控制,不需要对杂质进行毒理学实验。

1.5 致癌风险高的特殊杂质 另外有一些特殊物质,在长期毒性研究中有确切致癌性证据,或在国际认可的数据库中被列为高风险致癌物,如黄曲霉素类、*N*-亚硝基物和偶氮类化合物,它们的摄入量在低于 1.5 $\mu g \cdot d^{-1}$ 时仍有非常高的致癌风险[4],因此使用通常的 TTC 值来评估并不合适,需要建立特定的风险评估方法,具体问题具体分析。CDE 发布的《化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行)》正是基于这类杂质的特殊性提出的,对于此类杂质,应采取"避免为主,控制为辅"的策略,在毒理学评估中,可以参考以下思路[2]。

对于在权威机构数据库中有足够致癌数据的杂质,可以根据其 50% 肿瘤发生率(TD_{50})的剂量外推计算十万分之一肿瘤发生率的剂量,以此作为该杂质的可接受摄入量,再结合药品的每日最大用药量,可以得到杂质的控制限度。在选择 TD_{50} 时,应选择已有数据中最保守的值,即"来自研究设计完善的致癌性试验中的最低 TD_{50} 值,或与人类风险评估最相关的种属、性别和肿瘤发生器官部位的最低 TD_{50} 值"。

如果数据库中没有该致癌性杂质的 TD_{50} 值,可通过构-效关系分析来选择效应相似且有 TD_{50} 的同类杂质,导用其 TD_{50} 值来计算杂质限度。

2 根据毒理学数据确定杂质限度的示例

2.1 根据 TD_{50} 线性外推法计算 *N*-亚硝基二甲胺(nitrosodimethylaniline,NDMA)的可接受摄入量 NDMA 被世界卫生组织国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer,IARC)列为 2A 类致癌物,在遗传毒性与致癌性实验中均为阳性结果,对动物致癌证据充分,对人的致癌风险较高,因此不适合按每人 1.5 $\mu g \cdot d^{-1}$ 的 TTC 值来制定限度,需要根据 NDMA 的致癌性数据进行特定风险评估。致癌性数据库(Carcinogenicity Potency Database,CPDB)[5]提供的数据显示,在研究完善的致癌性实验中,NDMA 在大鼠与小鼠的 TD_{50} 值分别为 0.095 9 和 0.189 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,其中大鼠的 TD_{50} 值更保守。人体重以 50 kg 计算,肿瘤发生风险设为 0.1‰,则按大鼠 TD_{50} 线性推导出人对 NDMA 的可接受摄入量为:$0.095\,9\ mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1} \times 50\ kg \div 50\% \times 10^{-5} = 0.000\,095\,9\ mg \cdot d^{-1}$。

以 2018 年 7 月检出含 NDMA 杂质的缬沙坦原料药为例,缬沙坦每日最大用药以 320 mg 计算,则其中 NDMA 杂质的限度设定为:$0.000\,095\,9\ mg \cdot d^{-1} \div 320\ mg \cdot d^{-1} = 0.000\,03\%$。

2.2 根据"未观察到效应水平"计算苯胺的"每日允许暴露量" 苯胺为一种已知的动物致癌物,可诱导大鼠脾脏肿瘤生成,且研究显示其致癌性存在阈值,因此不适用 TD_{50} 线性推导的方法,可采用相关动物实验的未观察到效应水平来计算每日允许暴露量。根据来自化学工业毒理学研究所(Chemical Industry Institute of Toxicology,CIIT)一项 2 年的大鼠致癌性研究数据,喂饲相当于 7.2,22 和 72 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 苯胺剂量水平的盐酸苯胺,在 72 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 剂量雄性中观察到肿瘤,并在 22 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 剂量组发现一个脾脏间质肉瘤,基于以上数据,7.2 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 的剂量被用来作为肿瘤的 NOEL,按 ICH Q3C 中的方法使用不确定因子来计算苯胺的每日允许暴露量,PDE = (NOEL × 体重校准) ÷ (F1 × F2 × F3 × F4 × F5),其中:体重校准 = 50 kg;F1 = 5(从大鼠到人)种属间差异系数;F2 = 10(个体间差异系数);F3 = 1(研究持续时间至少为动物寿命的一半);F4 = 10(严重毒性 - 非遗传毒性致癌性);F5 = 1(使用 NOEL),由此可计算苯胺在人体的终生 PDE = $7.2\ mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1} \times 50\ kg \div (5 \times 10 \times 1 \times 10 \times 1) = 0.72\ mg \cdot d^{-1}$。

3 小结

对于基因毒性杂质或潜在基因毒性杂质,无论其是否有阈值相关机制的证据,研究和控制的依据都是毒理学数据,尤其是遗传毒性和致癌性实验结果,其中最基础的是细菌致突变实验,通常用来评估杂质致突变的可能性及控制的必要性。但是常规遗传毒性实验方法存在局限性,如无法检出非遗传毒性致癌剂,体外实验与体内的相关性需要验证,且不适用于确定"可接受的摄入水平"。因此在开展毒理学评估前,首先应该查询"警示结构"数据库和已知致癌物数据库,并根据文献或计算机毒理学分析

杂质的化学结构,判断开展毒理学实验的必要性,并预测其可能的遗传损伤终点或作用机制,选择检测终点一致或能提供机制信息的实验方法。另外由于检测灵敏度限制,使用含杂质的原料药进行研究,可能会由于杂质含量太低而出现阴性结果,这时使用分离出的杂质进行研究更合理。在根据毒理学数据确定杂质限度时,可参考的文献和数据较多,使用不同的数据得出的限度会有差异[6],只要有充分合理的依据,通常都是可以接受的。

基因毒性杂质的来源和构成复杂,其安全性评价需要综合运用多种手段,毒理学评估作为其中一个环节,也要结合化学及药学相关知识、相关工艺和检测技术,充分利用新方法和毒理学数据,制定合理的评估策略,同时在必要时开展机制研究,或采用体内相关性研究来帮助确定杂质的限度,将基因毒性杂质对人体的潜在威胁控制在安全范围内。

[参 考 文 献]

[1] ICH M7(R1). Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk[S]. 2017.

[2] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则(试行)[S]. 2020.

[3] 国家食品药品监督管理总局. 药物遗传毒性研究技术指导原则[S]. 2018.

[4] 国家药品监督管理局. 世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单[EB/OL]. (2017). http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2068/329742.html.

[5] National Library of Medicine. Carcinogenicity Potency Database (CPDB)[EB/OL]. (2020-06-03). https://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/.

[6] 汪生, 杭太俊. 药物中基因毒性杂质检测策略的研究[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(23):2840-2846.

编辑:刘卓越/接受日期:2020-10-26