

左羟丙哌嗪和羟苯磺酸钙中 2 个 1 类杂质的遗传毒性(Q)SAR 评价及质控限度评估*

祝清芬, 魏霞, 耿雪, 曲见松, 胡德福**

(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘要 目的: 对左羟丙哌嗪和羟苯磺酸钙的已知杂质进行遗传毒性评价, 并对现行标准杂质限度的合理性进行评价。**方法:** 按照 ICH M7 指导原则的要求, 采用基于专家知识规则的 Derek 和基于统计学的 Sarah 两类(Q)SAR 评价系统, 对左羟丙哌嗪的 3 个杂质右羟丙哌嗪、苯基哌嗪、缩水甘油, 羟苯磺酸钙及其杂质 I(氢醌)进行评价和分类。对于确定为遗传毒性杂质的, 根据药物临床用量计算杂质的暴露量, 并按照遗传毒性杂质相关指导原则的要求, 对其标准限度进行评估。**结果:** 右羟丙哌嗪、苯基哌嗪预测结果为阴性, 缩水甘油和氢醌预测结果为阳性, 且分类为 1 类。缩水甘油的标准限度低于可接受安全剂量。氢醌的标准限度过高, 存在安全隐患。**结论:** 缩水甘油和氢醌为 1 类遗传毒性杂质, 缩水甘油的标准限度合理, 氢醌的标准限度应该进一步严格。**关键词:** (定量) 构效评价; 缩水甘油; 氢醌; 杂质; 遗传毒性杂质; 毒理学关注阈值; 风险评估

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)02-0354-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.02.25

Assessment and control of two class 1 genotoxic impurities in levodropropizine and calcium dobesilate*

ZHU Qing-fen, WEI Xia, GENG Xue, QU Jian-song, HU De-fu**

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

Abstract Objective: To assess the genotoxicity of impurities in levodropropizine and calcium dobesilate, and to evaluate the limits of these impurities. **Methods:** According to ICH M7 guidelines, two(Q)SAR prediction methodologies were applied (expert rule-based Derek and statistical-based Sarah) to assess and classify three impurities in levodropropizine (dextropropizine, 1-phenylpiperazine and glycidol), calcium dobesilate and its impurity I (hydroquinone). If any impurity was characterized as genotoxic, the potential exposure was calculated based on the dosage. Then the limit of a genotoxic impurity was evaluated according to guidelines of genotoxic impurities. **Results:** (Q)SAR evaluation showed that dextropropizine and 1-phenylpiperazine were non-mutagenic while glycidol and hydroquinone were positive, both of which were classified as class 1. The limit of glycidol was less than the acceptable intake, while the limit of hydroquinone was too high to ensure the safety of the drug. **Conclusion:** Glycidol and hydroquinone were class 1 genotoxic impurities. The limit of glycidol in

* 重大新药创制科技重大专项(2009ZX09313023), 国家药典会 2015 年、2016 年药品标准提高项目

** 通信作者 Tel:(0531)81216506; E-mail: hudefu@sdfda.gov.cn

第一作者 Tel:(0531)81216599; E-mail: zhuqingfen73@163.com

levodropropizine was appropriate. The limit of hydroquinone in calcium dobesilate should be reduced.

Keywords: (quantitative) structure-activity relationships [(Q) SAR] ; glycidol ; hydroquinone ; impurity ; genotoxic impurity ; threshold of toxicological concern (TTC) ; risk assessment

药品杂质限度控制是药物质量标准研究的重要内容。近年来,国际上对药物杂质的遗传毒性越来越重视,EMA、美国FDA等先后颁布了遗传毒性杂质(genotoxic impurities, GTIs)控制的指导原则^[1-3],2014年,ICH正式发布了M7指导原则:为控制潜在的致癌风险的DNA反应性(致突变性)药物杂质的评价和控制,对具有DNA活性(致突变性)的杂质的控制提出了通用的要求,目前已在各成员国药品注册中使用^[4]。根据国家药典会的科研项目安排,本实验室按照ICH M7指导原则的要求,采用(定量)构效关系计算机模型((Q)SAR)技术对中国药典2015年版二部中收录的已知杂质进行了筛查,发现2个分类为1类的杂质,分别为左羟丙哌嗪的杂质缩水甘油(glycidol)、羟苯磺酸钙的杂质I(氢醌,hydroquinone),并结合其质控限度的合理性,对遗传毒性杂质的评价和控制进行分析。

1 (Q)SAR 评价软件

1.1 Derek

版本:Derek Nexus:5.0.1,数据库(Knowledge):Derek KB 2015 1.0,数据库版本:1.0,数据库日期:2015年12月7日,英国Lhasa公司研制(<http://www.lhasalimited.org/>)。

Derek是经典的SAR毒理学预测软件,可以对包括遗传毒性、致癌性等在内的59个毒理学预测终点进行评价,并提供触发的警戒结构信息。Derek作为基于专家知识的评价系统用于杂质遗传毒性预测,在EMA、美国FDA相关指导原则中均为被推荐的软件之一。Derek用于杂质遗传毒性预测,基本设置为:物种设为细菌,预测终点设置为遗传毒性项下的致突变性。

1.2 Sarah

版本:Sarah Nexus:2.0.1,模型:Sarah Model 1.1.19,模型版本:2.0.1。英国Lhasa公司研制(<http://www.lhasalimited.org/>)。

Sarah是基于统计的(Q)SAR软件,主要是配合专家知识规则的软件,对药物杂质的致突变性进行预测。

1.3 Nexus

版本Nexus:2.1.0,英国Lhasa公司(<http://www.lhasalimited.org/>)旗下Derek、Sarah、Vitic、Meteor、Zeneth

等软件的整合平台。

在Nexus系统中,使用Derek和Sarah进行遗传毒性评价,也可以分别使用2个软件。同时,Nexus系统中已固化了组合的ICH M7模式(ICH M7 Prediction),并能够采用ICH M7分类模式(ICH M7 Batch Classification)对杂质遗传毒性进行预测和分类。

2 评价方法和结果

2.1 评价方法

采用Chemdraw 12.0绘制药物活性成分(API)及杂质的化学结构图,分别为左羟丙哌嗪及其3个杂质右羟丙哌嗪、苯基哌嗪、缩水甘油(见图1),羟苯磺酸钙及其杂质I(氢醌)结构式(见图2),输入Nexus 2.1.0(整合了Derek和Sarah等软件的综合软件)。

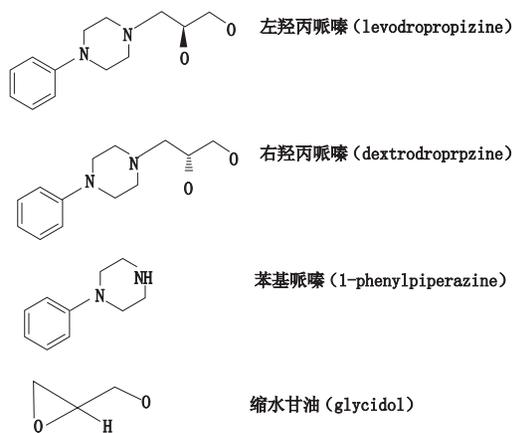


图1 左羟丙哌嗪、右羟丙哌嗪、苯基哌嗪、缩水甘油结构

Fig. 1 Structures of levodropropizine, dextropropizine, 1-phenylpiperazine and glycidol

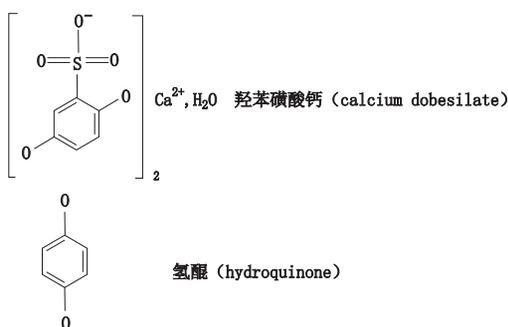


图2 羟苯磺酸钙、氢醌的结构

Fig. 2 Structures of calcium dobesilate and hydroquinone

采用 ICH M7 模式和 ICH M7 分类模式,对左羟丙哌嗪及 3 个杂质、羟苯磺酸钙及其杂质 I 进行遗传毒性预测。

2.2 结果

评价结果综合于表 1 中。右羟丙哌嗪和苯基哌嗪 Derek 和 Sarah 预测结果均为阴性,分类为 5 类。

缩水甘油 Derek 和 Sarah 预测结果均为阳性,ICH M7 分类为 1 类。缩水甘油 Derek 预测触发的警戒结构为 019 环氧化物。在 Sarah 预测时,基于数据库中化合物结构精确匹配(已有文献资料)及表 2 中所列 3 个支持性结构,缩水甘油遗传毒性阳性的可信度为 100%。

表 1 杂质遗传毒性 [Q] SAR 预测结果

Tab. 1 [Q] SAR prediction summary for the genotoxicity of the impurities

杂质 (impurity)	Derek		Sarah		ICH M7 分类 (ICH M7 class)
	结果 (result)	警戒结构 (alert)	结果 (result)	可信度 (confidence) / %	
左羟丙哌嗪 (levodropropizine)	 阴性 (negative)	/	 阴性 (negative)	25	/
右羟丙哌嗪 (dextropropizine)	 阴性 (negative)	/	 阴性 (negative)	25	Class 5
苯基哌嗪 (1-phenylpiperazine)	 阴性 (negative)	/	 阴性 (negative)	100	Class 5
缩水甘油 (glycidol)	 可能的 (plausible)	019 环氧化物 (epoxide)	 阳性 (positive)	100	Class 1
羟苯磺酸钙 (calcium dobesilate)	 阴性 (negative)	/	 阴性 (negative)	23	/
氢醌 (hydroquinone)	 阴性 (negative)	/	 阳性 (positive)	100	Class 1

表 2 缩水甘油及氢醌 Sarah 阳性预测详细信息

Tab. 2 Sarah prediction details for the positive results of glycidol and hydroquinone

杂质 (impurity)	结构 (structure)	编号 (ID)	描述 (description)	结果 (result)	可信度 (confidence) / %	例数 (example)
缩水甘油 (glycidol)		H-761	假说 (基于数据库中化合物结构精确匹配) [hypothesis (supported by exact match from training set)]	阳性 (positive)	100	125
		H-871	假说 (基于数据库中化合物结构精确匹配) [hypothesis (supported by exact match from training set)]	阳性 (positive)	100	163
		H-1046	假说 (基于数据库中化合物结构精确匹配) [hypothesis (supported by exact match from training set)]	阳性 (positive)	100	1 344
氢醌 (hydroquinone)		H-1045	假说 (基于数据库中化合物结构精确匹配) [hypothesis (supported by exact match from training set)]	阳性 (positive)	100	3 117

氢醌 Derek 预测结果为阴性, Sarah 预测结果为阳性,分类为 1 类。在 Sarah 预测时,基于数据库中化合物结构精确匹配(已有文献资料)及表 2 中所列 1 个支持性结构,该化合物遗传毒性阳性的可信度

为 100%。

3 遗传毒性杂质控制的基本要求

根据杂质的诱变性和致癌性以及其应控制的措施, ICH M7 指导原则将药物杂质分为 5 类,见表 3。

表 3 ICH M7 基于杂质遗传毒性和致癌性对杂质的分类和控制策略

分类 (class)	定义 (definition)	控制策略 (proposed action for control)
1	已知遗传毒性阳性的致癌物 (known mutagenic carcinogens)	控制在 ≤ 按照本身作用确定的可接受限度 (control at or below compound-specific acceptable limit)
2	已知遗传毒性阳性, 未明确为致癌物 (细菌突变试验阳性, 但无啮齿类动物致癌性资料) [known mutagens with unknown carcinogenic potential (positive bacterial mutagenicity*, without rodent carcinogenicity data)]	控制在 ≤ 可接受限度 (合适的 TTC) [control at or below acceptable limits (appropriate TTC)]
3	有警戒结构, 与药物结构无关; 无遗传毒性资料 (alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance; no mutagenicity data)	控制在 ≤ 可接受限度 (合适的 TTC) 或进行细菌突变试验: 如为非遗传毒性, 按第 5 类处理如为遗传毒性, 按第 2 类处理 [control at or below acceptable limits (appropriate TTC) or conduct bacterial mutagenicity assay; if non-mutagenic = Class 5 if mutagenic = Class 2]
4	有警戒结构, 药物本身, 或者研究表明为遗传毒性阴性的药物相关物质 (如中间产物) 具有同样的警戒结构 [alerting structure, same alert in drug substance or compounds related to the drug substance (e.g., process intermediates) which have been tested as non-mutagenic]	按非遗传毒性杂质控制 (control as non-mutagenic impurity)
5	无警戒结构, 或者有足够的资料表明该警戒结构无遗传毒性 (no structural alerts, or alerting structure with sufficient data to demonstrate lack of mutagenicity or carcinogenicity)	按非遗传毒性杂质控制 (control as non-mutagenic impurity)

对于遗传毒性杂质的控制, M7 指导原则引入了 TTC (a threshold of toxicological concern) 的概念, 一个具有遗传毒性的杂质, 每人每天摄入 1.5 μg 时其风险被认为可以忽略 (终生暴露的情况下理论的患癌风险小于十万分之一)^[5]。一般长期用药 (≥ 10 年) 的药物遗传毒性杂质, 且无致癌试验数据 (2 类和 3 类), 可以采用 TTC 作为默认的可以接受的标准。

根据 TTC 计算遗传毒性杂质限度公式如下 (1 ppm 相当于 1 μg · g⁻¹):

$$\text{杂质限度 (ppm)} = \frac{\text{TTC (1.5 } \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1})}{\text{每日剂量 (g} \cdot \text{d}^{-1})}$$

另外, 也可根据化合物特定的风险评估计算其可接受摄入量 (acceptable intakes, AIs)。如对于有阳性致癌数据的杂质, 可以采用线性计算方法; 对于有实际阈值证据的遗传毒性杂质, 可以根据其阈值计算日允许暴露量 (permissible daily exposures, PDEs) 等。2015 年, ICH 颁布了 M7 指导原则的增补 (ICH M7 R1), 对于 15 个 (类) 遗传毒性或致癌性明确的化合物进行了 AIs 或 PDEs 的计算和规定^[6]。其中包括缩水甘油, 根据其 TD₅₀ 计算 AI 为每天 4 μg。

4 讨论

采用 (Q)SAR 评价通过警戒结构 (structural alerts) 预测化合物的遗传毒性已经有 30 多年的历史^[7]。ICH M7 指导原则最显著的特点之一是引入了 (Q)SAR 评价的概念。对于杂质的遗传毒性评价, 一般进

行细菌的基因突变评价即可。M7 指导原则中规定, 应采用 (Q)SAR 技术对杂质毒性进行计算机评价, 以预测细菌基因突变的结果。对于 2B 和 3 期临床试验的药品, 申报时要提供一份 (Q)SAR 评估的杂质清单, 所有实际存在或潜在的 1、2、3 类要提供控制方案。

不同于 EMA 和美国 FDA 以前对于遗传毒性杂质评价的要求, ICH M7 要求使用两类互补的 (Q)SAR 评价体系, 一类是基于专家知识规则的, 另一类是基于统计学的。如果 2 个互补的 (Q)SAR 评价体系均没有发现警戒结构 (评价结果为阴性), 则足以说明该杂质没有遗传毒性, 不需要进一步检测。无论哪类软件预测提示有警戒结构, 均需要按照指导原则的程序进行杂质分类和控制。但可以经有经验的专家对 (Q)SAR 结果进行评价和解读, 甚至推翻其结论^[8]。ICH M7 是目前唯一将 (Q)SAR 评价结果作为以注册为目的的申报资料的最终结论的法规性文件。已有研究对包括 Derek、Sarah 等软件组合的预测效果进行评价^[9-10], Derek 和 Sarah 的组合符合 OECD 的认证体系, 并为美国 FDA 等认可。

本次评价发现的 2 个遗传毒性阳性的杂质, 实际上均为明确的致突变或致癌物质。缩水甘油, CAS 号为 000556-52-5, 2000 年被世界卫生组织下属的国际癌症研究所 (IARC) 列为 2A 类致癌物^[11,12]。氢醌 (hydroquinone), CAS 号为 000123-31-9, 1999

年被 IARC 列为 3 类致癌物^[13]。两者采用符合 ICH M7 指导原则的 [Q]SAR 模型评价结果均为阳性,且分类为 1 类,因此其质控限度应严格按照遗传毒性杂质的限度制定。

缩水甘油作为左羟丙哌嗪的杂质,左羟丙哌嗪为镇咳药^[14],收载于中国药典 2015 年版二部和欧洲药典 8.0,作为有关物质的限度分别为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[15]^[156]、^[16]^[2610]。根据药品说明书,本品临床每日最大用量为 180 mg (每次 60 mg,每日 3 次)。按照上述标准,每日暴露量为 0.9 μg (中国药典)和 1.8 μg (欧洲药典),均低于 ICH M7 指导原则补充件规定的 4 μg ,因此其限度制定是合理的。

氢醌作为羟苯磺酸钙的杂质,羟苯磺酸钙为毛细血管保护药^[17],也收载于中国药典 2015 年版二部和欧洲药典 8.0,作为有关物质的限度均为 0.1%^[15]^[1225]、^[16]^[1733]。本品临床 1 d 最大用量为 3 g (每次 1 g,每日 3 次)。按 0.1% 计算,每日暴露量为 3 mg,该暴露量较高,存在较大的安全隐患,因此,建议从严修订羟苯磺酸钙中杂质 I (氢醌) 的限值。如参考 TTC ($1.5 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$) 计算的限值,为 0.5 ppm ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。但 TTC 是一个高度保守的暴露量,另外, TTC 一般用于 2 类、3 类杂质的控制。对于 1 类杂质,一般通过文献资料或实验研究,提供充分的实验证据,根据其作用机制、50% 致癌剂量 (TD_{50})、最大无毒剂量 (NOEL) 等数据计算可以接受的暴露量,然后计算杂质质量标准的限值。根据 NIH 公开的氢醌致癌性资料,氢醌致癌性 TD_{50} 为大鼠 $82.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、小鼠 $225 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[18]。按照 ICH M7 (R1) 推荐的可接受摄入量 (AI) 计算公式^[6]:

$$\text{AI} = \text{TD}_{50} / 50\,000 \times 50 \text{ kg}$$

以 $82.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 计算氢醌 AI 为 $82.8 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$,对应杂质限度为 27.6 ppm ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),因此,建议修订羟苯磺酸钙中杂质 I (氢醌) 的限值为 30 ppm ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。当然,过于严格的标准会增加生产工艺的难度,提高生产成本,对于致突变杂质的控制还要考虑生产工艺和检测方法的可行性。

参考文献

[1] EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities [EB/OL]. 2006. [2017-05-18]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf

[2] EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Question & Answers on the CHMP Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities [EB/OL]. 2010. [2017-05-18]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002907.pdf

[3] FDA.U.S.FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). DRAFT guidance for industry. Genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products: recommended approaches [EB/OL]. 2008. [Withdrawn].

[4] ICH. M7: assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. 2014. [2017-05-18]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_Step_4.pdf

[5] KROES R, KLEINER J, RENWICK A. The threshold of toxicological concern concept in risk assessment [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 86 (2): 226

[6] ICH. ADDENDUM TO ICH M7: assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. 2015. [2017-05-18]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_Addendum_Step_2.pdf

[7] ASHBY J, TENNANT RW. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U. S. NTP [J]. *Mutat Res*, 1991, 257 (3): 229

[8] POWLEY MW. (Q)SAR assessments of potentially mutagenic impurities: a regulatory perspective on the utility of expert knowledge and data submission [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015, 71 (2): 295

[9] SUTTER A, AMBERG A, BOYET S. *et al.* Use of in silico systems and expert knowledge for structurebased assessment of potentially mutagenic impurities [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2013, 67 (1): 39

[10] GREENE N, DOBO KL, KENYON MO, *et al.* A practical application of two in silico systems for identification of potentially mutagenic impurities [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015, 72 (2): 335

[11] IARC. Glycidol Some Industrial Chemicals. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol 77 [R]. France, 2000: 469

[12] AASA J, VARE D, HITESH VM, *et al.* Quantification of the mutagenic potency and repair of glycidol-induced DNA lesions [J]. *Mutation Res*, 2016, 805 (7): 38

[13] MCGREGOR D. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2007, 37 (10): 887

[14] ZANASI A, LANATA L, FONTANA G, *et al.* Levodropropizine for treating cough in adults and children: a meta-analysis of published studies [J]. *Multidiscip Resp Med*, 2015, 10 (1): 19

[15] 中国药典 2015 年版. 二部 [S]. 2015: 158, 1225
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 158, 1225

[16] EP 8. 0 [S]. 2014: 2610, 1733

[17] RABEL E, BALLARINI S, LEHR L. A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical study on the efficacy and safety of calcium dobesilate in the treatment of chronic venous insufficiency [J]. *Phlebology*, 2016, 31 (4): 264

[18] NIH Hydroquinone: Carcinogenic Potency Database [EB/OL]. 2007. [2017-09-8]. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/chempages/HYDROQUINONE.html>

(本文于 2017 年 2 月 9 日收到)