

## ICH 遗传毒性结果评价和追加试验策略指导原则介绍

——ICH S2 (R1) 人用药物遗传毒性试验和结果分析指导原则介绍 (二)

黄芳华\*

国家食品药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100038

中图分类号: R994.23 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2009)02-0081-03

遗传毒性试验能检出 DNA 损伤及其损伤的固定。以基因突变、较大范围染色体损伤、重组和染色体数目改变形式出现的 DNA 损伤的固定, 一般被认为是可遗传效应的基础, 并且是恶性肿瘤发展过程的环节之一(这种遗传学改变仅在复杂的恶性肿瘤发展变化过程中起了部分作用)。染色体数目的改变还与肿瘤发生有关并可提示生殖细胞发生非整倍体的潜在性。在检测这些类别损伤的试验中呈阳性的化合物为潜在人类致癌剂和/或致突变剂。由于在人体中已建立了某些化合物的暴露和致癌性之间的关系, 而对于遗传性疾病尚没有证明有类似的关系, 故遗传毒性试验主要用于致癌性预测。但是, 因为已经确定生殖细胞突变与人类疾病有关, 所以对可能引起可遗传效应的化合物与可能引起癌症的化合物应引起同样的关注; 此外, 这些试验的结果还可能有助于致癌性试验分析。

遗传毒性研究在药物研发中处于比较重要的位置, 尤其是在药物筛选阶段, 在很大程度上遗传毒性试验结果将影响到药物开发的进程。但是遗传毒性的假阳性和假阴性结果难以避免, 尤其是近年来体外哺乳动物细胞试验系统阳性结果(该结果与人用危险不相关)过高的问题已引起了广泛关注。因此对结果进行综合分析尤为重要。FDA 于 2006 年出台了推荐的遗传毒性试验结果综合分析法指导原则(Guidance for industry and review staff: Recommended approaches to integration of genetic toxicology study results), 对遗传毒性试验出现阳性结果如何评价和处理进行了讨论。ICH 于 2006 年启动了遗传毒性指导原则的修订工作, 对该问题也给予了高度关注, 对试验方法的要求进行了修订, 2008 年 3 月公布的 ICH S2 (R1) 人用药物遗传毒性试验和结果

分析指导原则(Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use)(Draft), 对遗传毒性结果评价和追加试验策略进行了重点阐述。笔者已在前文介绍了遗传毒性实验标准组合的最新要求<sup>[1]</sup>, 本文重点介绍对进行遗传毒性试验及结果评价有着重要的参考价值的遗传毒性结果评价和追加试验策略。

对比试验已明确显示, 在预测药物对啮齿类动物的致癌性时每种体外检测系统均可产生假阴性和假阳性结果。遗传毒性试验组合(包括体内和体外试验)检测的是具有直接的遗传损伤机制的致癌剂, 如绝大多数已知的人类致癌剂。因此, 这些组合无法检测出非遗传毒性致癌剂。体外试验的一些实验条件, 如体外代谢活化系统有限的的能力, 可能导致假阴性结果。试验组合方法的设计是为了减少有潜在遗传毒性化合物的假阴性结果的风险, 但是, 任何一种遗传毒性试验中的阳性结果并不一定能说明受试物对人体真正具有遗传毒性或致癌性的危险。

虽然体外试验阳性资料可提示药物内在的遗传毒性特征, 在大多数情况下恰当的体内试验资料确定这些体外试验信号的生物学意义。而且, 由于许多遗传毒性的非直接机制仅在某些浓度以上才有作用, 对于具有这些机制证据的药物类别有可能确定安全剂量水平(阈值)。

### 1 生物学相关性评估

假定试验已采用合适的剂量间距、毒性水平等进行, 建议如下:

体外或体内遗传毒性表现上的小的增加, 首先应评价是否有重现性和生物学意义。不被认为有生

物学意义的结果的例子包括:

i. 小的增加与阴性或溶剂对照组值相比有统计学意义,但是在试验条件的历史对照范围内。

ii. 弱/可疑结果不可重复。

若以上任一情况应用证据权衡提示缺乏潜在遗传毒性,该试验被认为是阴性或该发现无生物学相关性,无需进行进一步的试验。

## 2 体外试验结果评价

在评价阳性结果时,尤其是细菌突变试验,应考虑受试物的纯度,以确定阳性结果是否归因于污染物。

### 2.1 体外细菌突变试验阳性结果的评价

有关于菌落的假升高而事实上是不相关的典型例子,这可发生于由于氨基酸的污染(为沙门氏菌株提供组氨酸或为 E. Coli 菌株提供色氨酸),因此细菌回复突变试验不适合检测可能降解的肽类。也有细菌突变试验阳性结果并不提示在人体内有遗传毒性潜力的一些例子,例如当细菌特异性代谢发生时(如通过细菌硝基还原酶活化)。

### 2.2 体外哺乳动物细胞试验阳性结果的评价

IWGT 报告中讨论了关于阳性遗传毒性试验结果时的证据权衡评估和追加试验的建议。另外,科研文献中给出了一些可能导致有疑问相关性的体外试验阳性结果的情况。因此,任何体外试验阳性结果应基于下述的证据权衡法进行评价。以下所列并不详尽,仅供下结论时参考:

i. 体内不存在的条件(pH 值、渗透压、沉淀物)

注意:1 mmol/L 的限度避免了渗透压的升高,如果受试物改变了 pH 值,建议在给药时调整未给药培养基的 pH 值至正常 pH 值。

ii. 该作用仅发生于最高毒性浓度

在 MLA 试验升高发生于 RTG 减少 $\geq 80\%$ 时

对体外遗传细胞学试验,生长抑制 $\geq 50\%$

如果以上情况应用证据权衡提示缺乏潜在的遗传毒性和在一个试验为阴性的标准组合(选择 1)之外无附加试验,可能需进行体内的试验。

### 2.3 体外试验阴性结果评价

对于体外试验阴性结果,在一些特殊情况下需考虑进行进一步的试验,比如(以下所列并非详尽,仅供下结论时参考):受试物的化学结构或已知代谢提示采用的标准体外代谢活化技术可能不合适;化合物的结构或已知活性提示采用其他检测方法或系统更合适。

## 3 体内试验结果评价

体内试验方法具有考虑到与人体应用相关的吸收、分布、排泄的优点,而体外试验则不具备。此外,体内代谢相对于体外试验常规使用的代谢系统更具有相关性。如果体外与体内试验的结果不一致,对其中的差异应采用具体问题具体分析的原则进行考虑/解释分析,如代谢的差异、化合物在体内可能发生快速和高效能的排泄,等等。

体内遗传毒性试验也有给出误导的阳性结果的可能性,该结果并不提示真正的遗传毒性。例如:微核的升高发生于未给任何遗传毒性物质,而是由于干扰了红血球生成,DNA 加合物数据可解释为内源性加合物的已知背景水平,以及间接的、毒性相关的作用可能影响 DNA 链断裂试验的结果(如碱洗脱和彗星试验)。因此评价遗传毒性数据时考虑所有的毒理学和血液学发现很重要。与毒性改变相关的间接作用可能有安全范围,并可能与临床不相关。

## 4 对阳性结果追加研究策略

### 4.1 对体外哺乳动物细胞试验发现的追加

以下讨论基于假定 Ames 细菌突变试验结果为阴性。

#### 4.1.1 机制/体内试验追加

为评价体外哺乳动物细胞试验阳性结果(当在无充分证据提示缺乏相关性时),为提供试验证据,建议对哺乳动物细胞试验进行追加,无论是通过体外附加试验或通过进行两种合适的体内试验。

i. 有助于对缺乏相关遗传毒性提供证据权衡的机制信息,常产生于体外,如诱导 MLA 试验中染色体畸变或突变的受试物不是 DNA 损伤物质的证据(如 Ames 试验外附加其他阴性突变/DNA 损伤试验;结构考虑),或者对于与体内试验不相关的间接/阈值机制的证据(如抑制 DNA 合成、仅在高浓度时产生活化氧簇,等等)。相似研究也可用于体外微核试验阳性结果的追加,或在证据包含有提示染色体丢失/非整倍体的已知机制,或者着丝点染色试验提示染色体丢失的情况下。

如果上述机制信息和证据权衡支持缺乏遗传毒性,仅需要一个体内试验,并有暴露的合适证据,以确定缺乏遗传毒性作用。这是一个代表性的细胞遗传学试验,以及为染色体丢失潜力进行追加试验时需进行体内微核试验。

多倍体在体外染色体畸变试验常见。虽然非整倍体可诱导多倍体,多倍体单独也不能提示非整倍

体潜力,可能仅能提示细胞周期受干扰;它也常与细胞毒性升高有关。如果在体外试验中可见多倍体,而非结构上的染色体断裂,在保证有充分暴露的体内微核试验上的阴性结果,通常可提供缺乏诱导非整倍体潜力的充分证据。

ii. 进行两个合适的体内试验,通常采用不同的组织,以及有支持暴露的证据。

总之,如果体外哺乳动物细胞试验结果为阳性,和无充分证据权衡或机制信息以排除遗传毒性潜力,要求进行两种采用合适的终点和在合适的组织上(通常是两种不同的组织),以及重点在于在体内模型上获得充分暴露的体内试验。

在两种对终点测定有充分的验证,并证明有暴露的合适的体内试验阴性结果,足以说明缺乏遗传毒性作用。

#### 4.1.2 依赖于S9的体外试验阳性结果的追加

当阳性结果仅见于S9活化系统存在条件下,首先应确认是代谢活化的原因而非其他一条件导致(如与非活化培养 $\geq 10\%$ 的血清比较,S9混合物中低或无血清)。因而追加策略目的是确定体外产生活化代谢与体内条件的相关性,通常可重在肝脏上进行的体内试验。

#### 4.2 对体内微核试验阳性结果的追加

若体内微核有升高,应对所有的毒理学资料进行评价,以确定是否是由于非遗传毒性作用的原因或是其中的一个作用因素。如果怀疑有非特异性的

干扰红血球生成的作用或生理学作用(如体温偏低或过高),对于染色体畸变一项体内试验更为适合。如果一个“真正”的升高被怀疑,需采用能证明该升高是否是由于染色体丢失或染色体断裂的策略。有证据表明非整倍体诱导作用,如纺锤体抑制剂,有非线性剂量反应关系。因此,可能需确定是否有低于不得到染色体丢失的阈值暴露,以及确定与临床暴露比较是否有合适的安全范围。

总之,化合物遗传毒性潜力的评价应考虑所有的发现和信息的内在价值和体内体外试验的局限性。

#### 5 致癌性生物测定的肿瘤发现相关的追加遗传毒性试验

在标准试验组合中呈阴性,但在致癌性生物测定显示肿瘤发生率升高,而无充分证据以建立非遗传毒性作用机制的化合物,应在合适模型上进行附加遗传毒性试验。为了了解作用方式,追加试验可包括改变体外试验的代谢活化条件或包括测定肿瘤诱导靶器官遗传损伤的体内试验,如DNA链断裂试验(如彗星试验或碱洗脱试验)、肝UDS试验、DNA加合试验(如通过 $^{32}\text{P}$ -后标记)、转基因突变诱导试验,或肿瘤相关基因遗传变化的分子特征性分析。

#### 参考文献:

- [1] 黄芳华. ICH 遗传毒性标准实验组合的最新要求[J]. 药物评价研究, 2009, 32(1):10-12.

### 中药注射剂安全性再评价工作将全面启动

国家食品药品监督管理局(SFDA)将在近期全面启动中药注射剂安全性再评价工作。本次中药注射剂安全性再评价,将以保证药品安全为核心,围绕风险排查、综合评价、提高标准开展工作。要求中药注射剂生产企业对照《中药注射剂安全性再评价质量控制要点》,全面排查中药注射剂生产环节可能产生的风险,主动采取有效措施,切实控制中药注射剂安全风险。要求中药注射剂生产企业对照《中药注射剂安全性再评价基本技术要求》主动开展研究,SFDA将分批分阶段对中药注射剂的质量控制和风险效益开展综合评价。同时,生产企业要积极开展中药注射剂质量标准的研究工作,加快药品标准的提高工作,确保中药注射剂产品质量。通过中药注射剂安全性再评价,达到提高中药注射剂药品标准、控制中药注射剂安全隐患、提高中药注射剂产品质量、及时淘汰存在严重安全隐患品种的目的。

(本刊讯)