

苹果酸舒尼替尼杂质的遗传毒性(Q)SAR评价及Ames试验评估

张娟¹, 祝清芬¹, 耿雪¹, 赵艳霞¹, 徐国芹², 陈晓荔², 毕爱莲²

1. 山东省食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室, 山东 济南 250101

2. 山东百诺医药股份有限公司, 山东 济南 250101

摘要: 目的 对苹果酸舒尼替尼的3个已知杂质进行(定量)构效关系计算机模型[(Q)SAR]评价,并对杂质E进行细菌回复突变(Ames)试验研究。方法 根据国际人用药品注册技术协调会(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,对苹果酸舒尼替尼的3个杂质——杂质v-7、杂质v-1及杂质E进行评价和分类。对于确定为遗传毒性阳性的杂质E,采用Ames试验进行验证。结果 苹果酸舒尼替尼的杂质v-7、杂质v-1预测结果为阴性,杂质E预测结果为阳性,且分类为3类。在加与不加S9的条件下,Ames试验中杂质E 8~5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{皿}^{-1}$ 质量浓度回复突变菌落数均未超过溶剂对照组的2倍,试验结果为阴性。结论 苹果酸舒尼替尼的3个杂质——杂质v-7、杂质v-1及杂质E均可以按照非遗传毒性杂质进行控制。

关键词: (定量)构效关系计算机模型[(Q)SAR]; 苹果酸舒尼替尼; 遗传毒性杂质; 细菌回复突变试验

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)12-2522-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.12.017

Assessment of genotoxicity of sunitinib malate impurities by (Q) SAR and Ames test

ZHANG Juan¹, ZHU Qingfen¹, GENG Xue¹, ZHAO Yanxia¹, XU Guoqin², CHEN Xiaoli², BI Ailian²

1. Shandong Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, Jinan 250101, China

2. Shandong Bainuo Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250101, China

Abstract: Objective Three known impurities of Sunitinib malate were evaluated by (quantitative) structure-activity relationship computer model [(Q) SAR], and to study the impurity which was classified as class 3 by Ames test. **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 Sunitinib malate (impurity v-7, impurity v-1 and impurity E). Ames test was used to verify impurity E which was confirmed as positive genotoxicity. **Results** (Q)SAR evaluation showed that impurity v-7 and impurity v-1 were non-mutagenic while impurity E was positive, which was classified as class 3. The results of Ames test indicated that the number of revertant colonies of test sample group was no more than twice of solvent control group induced revertant colonies and the test result represented negative at doses from 8 to 5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{plate}^{-1}$ with or without S9. **Conclusion** The three impurities of sunitinib malate -- impurity v-7, impurity v-1 and impurity E can be controlled as non-genotoxic impurities.

Key words: (quantitative) structure-activity relationship computer model [(Q) SAR]; sunitinib malate; genotoxic impurity; Ames test

随着公众对药品安全的日益关注,杂质控制已成为药品质量控制中的关键环节^[1],药品杂质限度控制是药物质量标准研究的重要内容^[2]。遗传毒性杂质的评价和控制主要是根据国际人用药品注册技术协调会(ICH)M7(R1)《评估和控制药物中DNA反应性(致突变)杂质以限制潜在致癌风险》指

南^[3-4],《中国药典》2020年版四部中也专门收录了《遗传毒性杂质控制指导原则》^[5]。遗传毒性杂质具有重大的遗传毒性安全风险,极微量水平即能诱发DNA突变,是需要重点控制的杂质,对其控制的水平直接体现了药品质量标准的水平^[6]。

苹果酸舒尼替尼是新型小分子多靶点酪氨酸

收稿日期: 2022-08-01

第一作者: 张娟,女,副主任药师,研究方向为毒理学、药理学、药物安全性评价。Tel:(0531)81216519 E-mail:zhangjuan1357@163.com

激酶抑制剂,主要通过抑制肿瘤新生血管阻断肿瘤细胞增殖所需血供及营养供给发挥作用,临床推荐用于治疗成人晚期转移性肾癌^[7],甲磺酸伊马替尼治疗失败或不能耐受的胃肠间质瘤,不可切除的、转移性高分化进展期胰腺神经内分泌瘤成年患者。目前国内企业生产的苹果酸舒尼替尼胶囊在2019年12月开始相继获批上市,目前未发现苹果酸舒尼替尼杂质超过定量限的报道,为保证人民用药安全,仍需要评价其杂质的遗传毒性。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]技术对苹果酸舒尼替尼的已知杂质进行了筛查,并对预测发现阳性的杂质进行体外细菌回复突变(Ames)试验。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

苹果酸舒尼替尼杂质E,山东百诺医药股份有限公司,质量分数>96.9%,淡黄色固体,批号ANP752,不溶于水,用二甲基亚砜(DMSO)配制;DMSO,由国药集团化学试剂有限公司生产,批号20180515,规格500 mL。

Aroclor1254 诱导雄性SD大鼠肝匀浆(S9),上海宝录生物科技有限公司,批号4020;敌克松,Chem Service公司,批号425-144B;丝裂霉素C,东京化成工业株式会社,批号D285H-PK;2-氨基苄,上海晶纯试剂公司,批号13152;1,8-二羟基蒽醌,Sigma-Aldrich公司,批号WXBB7902V;环磷酰胺,Sigma-Aldrich公司,批号SLBG4216V;叠氮钠,RIEDEL-SEELZE公司,批号13412;灭菌注射用水,辰欣药业股份有限公司,批号1904152161。

1.2 遗传毒性(Q)SAR评价软件

Derek(英国Lhasa公司,Derek Nexus:6.0.1,数据库:Derek KB 2018 1.1,2017年11月23日)用于杂质遗传毒性预测,物种设置为细菌,预测终点设置为遗传毒性项下的致突变性。

Sarah(英国Lhasa公司,Sarah Nexus:3.0.0,模型:Sarah Model 2.0)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。

Nexus(英国Lhasa公司,Nexus:2.2.1)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,并能够采用ICH M7分类模式对杂质遗传毒性进行预测和分类^[8]。

1.3 主要仪器

Stuart温控摇床培养箱(英国Stuart公司);高压蒸汽灭菌器(日本SANYO公司);隔水式恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);BP 211D电子天平(德国Sartorius公司);BSC-1100A2生物安全柜(北京中联哈尔仪器公司)。

1.4 菌株

鼠伤寒沙门氏菌TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535,上海宝录生物科技有限公司。5支鼠伤寒沙门氏菌株分别进行了组氨酸缺陷、脂多糖屏障缺陷、氨苄青霉素抗性、切除修复缺陷、四环素抗性和自发回变菌落数的鉴定,所用菌株符合Ames试验要求。

2 方法

2.1 遗传毒性(Q)SAR评价方法

采用Chemdraw 12.0绘制苹果酸舒尼替尼活性成分(API)及杂质的化学结构图,分别为苹果酸舒尼替尼及其3个杂质(杂质v-7、杂质v-1及杂质E),化学结构见图1,分别将结构式输入Nexus 2.1.0(整合了Derek和Sarah等软件的综合软件),采用ICH M7分类模式进行遗传毒性预测。

2.2 Ames试验方法

试验采用标准平板掺入法,通过苹果酸舒尼替尼杂质E对TA100菌株的细菌毒性预试验结果,确定其对组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌的试验浓度。溶剂采用DMSO,试验设5 000、1 000、200、40、8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5个质量浓度组,受试物配制成50、10、2、0.4、0.08 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5个浓度。试验时,在2 mL 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温的顶层培养基中每管依次加入各组

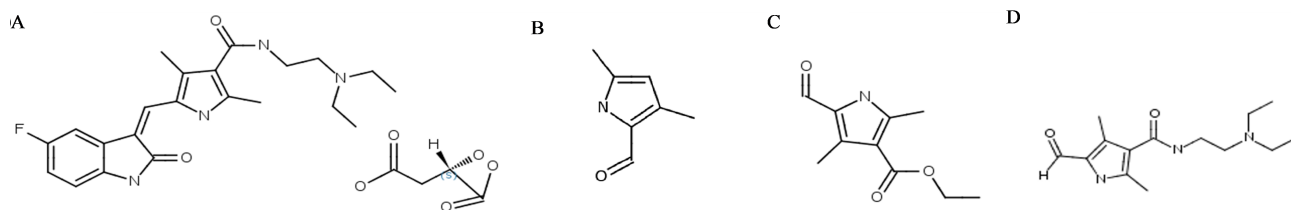


图1 苹果酸舒尼替尼(A)及杂质v-7(B)、杂质v-1(C)、杂质E(D)的结构

Fig. 1 Structure of sunitinib malate (A) and impurity v-7 (B), impurity v-1 (C), impurity E (D)

受试溶液0.1 mL、各试验菌株增菌液0.1 mL和0.5 mL磷酸盐缓冲液(非代谢活化组)或者0.5 mL 10%的S9混合液(代谢活化组),上述溶液迅速混匀,转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上,平放固化,约0.5 h后将培养皿倒置,37 °C培养48 h,计数每皿细菌回变菌落。试验同时设自发回变组、溶剂对照组(DMSO)和阳性对照组,在加与不加S9混合液条件下同时进行试验。每一剂量平行3个皿,试验重复1次。阳性对照组所用阳性物为敌克松 $50 \mu\text{g}\cdot\text{皿}^{-1}$ 、2-氨基苄 $10 \mu\text{g}\cdot\text{皿}^{-1}$ 、叠氮钠 $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{皿}^{-1}$ 、丝裂霉素C $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{皿}^{-1}$ 、1,8-二羟基蒽醌 $50 \mu\text{g}\cdot\text{皿}^{-1}$ 、环磷酸胺 $200 \mu\text{g}\cdot\text{皿}^{-1}$ 。苹果酸舒尼替尼杂质E遗传毒性评价结果以至少在1个菌株上,在

加与不加S9混合液的条件下,受试物所诱发的回复突变菌落数出现浓度相关性的增加和(或)在1个或多个浓度组上出现可重复的增加,判定为阳性结果,否则结果为阴性^[9-10]。







3 结果

3.1 遗传毒性(Q)SAR评价结果

结果如表1所示,杂质-7、杂质v-1预测结果Derek为不活跃的(inactive),Sarah为阴性(negative),归为5类,建议按照遗传毒性阴性杂质控制;杂质E Derek为不活跃的(inactive),Sarah为阳性(positive),有一类软件结果阳性,分类为3类,建议按照遗传毒性杂质控制或进行进一步试验研究。

表1 杂质遗传毒性(Q)SAR预测结果

Table 1 Results of (Q)SAR prediction of impurity genotoxicity

杂质	Derek		Sarah		ICH M7 分类
	结果	警示结构	结果	可信度/%	
杂质 v-7	 不活跃	/	 阴性	21	5类
杂质 v-1	 不活跃	/	 阴性	40	5类
杂质 E	 不活跃	/	 阳性	31	3类

3.2 苹果酸舒尼替尼杂质E Ames 试验结果

在2次Ames试验中,在加与不加S9混合液条件下,苹果酸舒尼替尼杂质E在作用剂量为5 000、1 000、200、40、8 $\mu\text{g}\cdot\text{皿}^{-1}$ 时,对TA97a、TA98、TA100、TA102和TA1535诱导回变菌落数与溶剂对照组相比,均无统计学上的显著性差异,且未呈现浓度相关性增加,各试验菌株溶剂对照组和自发回变组的回变菌落数均落在正常范围内,阳性对照组回变菌落数均多于溶媒对照组的2倍,即在本试验条件下,受试物对鼠伤寒沙门氏菌为致突变阴性。结果见表2。

4 讨论

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,其中1、2、3类需按照遗传毒性杂质进行严格控制^[11]。(Q)SAR评估方法是根据化合物警示结构和对细菌回复突变试验的预测对化合物进行分类^[12]。ICH M7指导原则是目前唯一将(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^[8,13]。基因突变是肿瘤发生的分子基础。以碱基突变为评价终点的Ames试验,是杂质遗传毒性风险评价的首选试验方法,其试验数据已获得美国FDA的认可^[14]。

本次(Q)SAR评价发现苹果酸舒尼替尼的3个杂质中杂质E为3类遗传毒性杂质,根据ICH M7指导原则的要求需要进行严格控制或进一步实验研究。本课题根据(Q)SAR评价结果进一步对杂质E进行Ames试验。在加与不加S₉的条件下,苹果酸舒尼替尼杂质E在8~5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{皿}^{-1}$ 剂量范围内均无明显遗传毒性作用,试验结果均为阴性。

对于致突变性计算机评价的结果,可以进行专家分析,以确认或者否定。另外,对于应用(Q)SAR方法评估归为3类的杂质,可以进一步开展Ames试验。如果试验结果为阳性,则该杂质可以归为2类;如果试验结果为阴性,则该杂质可以归为5类^[12]。

以上阴性结果提示,苹果酸舒尼替尼杂质E可参照ICH M7分类的5类杂质进行监管,按非遗传毒性杂质进行控制。苹果酸舒尼替尼杂质E的CAS号为356068-86-5,目前苹果酸舒尼替尼还未被《中

表2 苹果酸舒尼替尼杂质E Ames试验结果

Table 2 Results of sunitinib malate impurity E Ames test

组别	S9	TA97a 回变菌落数		TA98 回变菌落数		TA100 回变菌落数		TA102 回变菌落数		TA1535 回变菌落数	
		第1次试验	第2次试验	第1次试验	第2次试验	第1次试验	第2次试验	第1次试验	第2次试验	第1次试验	第2次试验
溶剂对照	-S9	110±9	115±16	31±1	32±2	106±13	118±4	241±29	235±18	19±4	19±9
	+S9	115±22	111±29	32±3	35±3	138±7	142±4	298±42	296±22	22±6	17±6
阳性对照	-S9	2 812±99 ^①	2 467±317 ^①	1 054±111 ^①	972±27 ^①	618±54 ^①	555±49 ^①	911±77 ^④	844±54 ^④	452±30 ^⑤	513±41 ^⑤
	+S9	889±106 ^②	1 094±150 ^②	1 627±236 ^②	2 100±194 ^②	734±57 ^②	788±91 ^②	1 001±212 ^⑤	1 046±188 ^⑤	203±47 ^⑥	213±22 ^⑥
自发回变	-S9	108±12	127±8	31±2	32±3	131±40	153±45	237±47	255±13	19±7	20±8
	+S9	113±32	120±7	33±3	34±3	137±2	113±38	272±52	265±15	22±2	18±7
杂质 E 5 000 μg·mL ⁻¹	-S9	96±5	120±17	37±4	34±5	157±72	130±18	218±2	205±38	25±6	30±8
	+S9	106±28	152±18	38±3	32±2	126±9	111±7	236±23	277±37	22±3	20±2
杂质 E 1 000 μg·mL ⁻¹	-S9	104±3	133±9	32±2	32±1	104±23	142±6	217±13	224±16	27±15	22±4
	+S9	111±41	152±23	34±5	33±2	105±5	140±17	286±48	295±32	19±7	16±6
杂质 E 200 μg·mL ⁻¹	-S9	110±18	136±9	36±6	32±1	153±28	140±29	257±20	213±38	19±4	26±6
	+S9	108±13	140±20	33±3	33±3	112±2	131±7	300±72	287±12	21±5	22±12
杂质 E 40 μg·mL ⁻¹	-S9	120±20	123±20	33±3	35±5	146±32	133±20	180±56	224±12	14±10	22±2
	+S9	133±30	130±14	36±4	34±3	130±2	142±19	296±40	289±34	18±3	18±8
杂质 E 8 μg·mL ⁻¹	-S9	123±14	127±18	34±4	32±2	111±20	122±9	219±75	216±11	16±11	21±8
	+S9	123±32	159±17	33±4	33±3	119±6	138±21	276±49	306±12	21±2	16±4

-S9: 非代谢活化组; +S9: 代谢活化组; ① 敌克松 50 μg·mL⁻¹; ② 2-氨基苄 10 μg·mL⁻¹; ③ 叠氮钠 1.5 μg·mL⁻¹; ④ 丝裂霉素 C 0.5 μg·mL⁻¹; ⑤ 1, 8-二羟基蒽醌 50 μg·mL⁻¹; ⑥ 环磷酰胺 200 μg·mL⁻¹

-S9: non-metabolically activated group; +S9: metabolically activated group; ① diquaxone 50 μg·plate⁻¹; ② 2-aminofluorene 10 μg·plate⁻¹; ③ sodium azide 1.5 μg·plate⁻¹; ④ mitomycin C 0.5 μg·plate⁻¹; ⑤ 1, 8-dihydroxyanthraquinone 50 μg·plate⁻¹; ⑥ cyclophosphamide 200 μg·plate⁻¹

国药典》2020年版、《美国药典》43版、《欧洲药典》10.0版收载。本研究为苹果酸舒尼替尼杂质E的进一步研究提供了实验数据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 王维剑, 刘斐, 牛冲, 等. 药品杂质控制与评价研究进展 [J]. 药学研究, 2016, 35(11): 657-662.
Wang W J, Liu F, Niu C, et al. Research advances on drug impurity control and safety evaluation [J]. J Pharm Res, 2016, 35(11): 657-662.
- 祝清芬, 魏霞, 耿雪, 等. 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 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(2): 354-358.
Zhu Q F, Wei X, Geng X, et al. Assessment and control of two class 1 genotoxic impurities in levodropropizine and calcium dobesilate [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(2): 354-358.
- ICH M7: Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. (2017-03-31)[2022-08-11]. [https:// database. ich. org/ sites/ default/ files/ M7_R1_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf).
- 祝清芬, 王维剑. (Q)SAR技术在药物杂质遗传毒性评价中的应用 [J]. 中国药物评价, 2021, 38(5): 371-374.
Zhu Q F, Wang W J. Application of (Q) SAR analysis in the genotoxic evaluation of drug impurities [J]. Chin J Drug Eval, 2021, 38(5): 371-374.
- 中国药典 [S]. 一部. 2020: 527-530.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020: 527-530.
- 张慧敏, 林建群, 冯康彪, 等. 药品中遗传毒性杂质的评估和控制 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(9): 1160-1166.
Zhang H M, Lin J Q, Feng K B, et al. Evaluation and control of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2014, 31(9): 1160-1166.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sorafenib in advanced clear-cell carcinoma [J]. N Engl J Med, 2007, 356: 125-134.
- Greene N, Dobo K L, Kenyon M O, et al. A practical application of two in silico systems for identification of potentially mutagenic impurities [J]. Regul Toxicol

- Pharmacol, 2015, 72(2): 335-349.
- [9] 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学实验方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 247-249.
- Yuan B J, Liao M Y, Li B. *Experimental Methods and Techniques of Drug Toxicology* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 247-249.
- [10] 国家食品药品监督管理局. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2018.
- State Food and Drug Administration. Technical Guidelines for drug genotoxicity Research [S]. 2018.
- [11] 祝清芬, 魏霞, 王维剑, 等. 基于杂质遗传毒性谈药物中5-羟甲基糠醛的质量控制 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(3): 485-489.
- Zhu Q F, Wei X, Wang W J, et al. Assessment of 5-hydroxymethylfurfural as an impurity in drugs based on its genotoxicity [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(3): 485-489.
- [12] 曲见松, 张娟, 耿雪, 等. 硝苯地平中杂质的遗传毒性(Q)SAR评价及Ames试验研究 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(9): 1289-1292.
- Qu J S, Zhang J, Geng X, et al. Assessment of mutagenicity of impurities in nifedipine by (Q) SAR and Ames test [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, 36(9): 1289-1292.
- [13] Sutter A, Amberg A, Boyer S, et al. Use of in silico systems and expert knowledge for structure-based assessment of potentially mutagenic impurities [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2013, 67(1): 39-52.
- [14] European Medicines Agency. ICH Guideline M7(R1) on Assessment and Control of DNA Reactive (mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk Step 5 [S]. 2018.

【责任编辑 兰新新】