

# 阿齐沙坦有关物质遗传毒性评估及限度研究

冯小龙, 朱慧明\* (石家庄学院, 石家庄 050035)

**摘要:** 目的 分析阿齐沙坦的合成工艺路线, 确定起始原料、中间体、副反应产物等有关物质信息, 研究有关物质的致突变性, 确定有关物质的限度, 为质量标准的建立提供依据。方法 检索相关数据库确定有关物质遗传毒性数据, 采用 2 种定量构效关系软件预测杂质的致突变性, 根据 ICH M7 指导原则, 对有关物质进行遗传毒性归类, 结合相关指导原则制定有关物质限度。结果 筛选出的 18 个有关物质中, 有 11 个无遗传毒性, 可按非遗传毒性杂质进行控制, 有 7 个化合物致突变性预测结果为阳性, 需要按遗传毒性杂质进行控制。结论 为保障用药安全, 终产品中总杂质的量不得>0.5%, 致突变性预测结果为阳性的有关物质单杂最高限度不得>0.001 875%, 其他有关物质单杂最高限度不得>0.1%。

**关键词:** 阿齐沙坦; 遗传毒性; 有关物质; 质量标准

中图分类号: R927.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)10-1313-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221159

引用本文: 冯小龙, 朱慧明. 阿齐沙坦有关物质遗传毒性评估及限度研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(10): 1313-1316.

## Genotoxicity Assessment and Limit Study of Azilsartan Related Compounds

FENG Xiaolong, ZHU Huiming\* (Shijiazhuang University, Shijiazhuang 050035, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To analyze the synthetic route of azilsartan, determine the information of starting materials, intermediates, side reaction products and other related compounds, study the mutagenicity of related compounds, determine the limit of related compounds, and provide basis for the establishment of quality standards. **METHODS** The genotoxicity data of related compounds were determined by searching related databases, and the mutagenicity of impurities was predicted by using two kinds of quantitative structure-activity relationship software. The genotoxicity of related compounds was classified according to ICH M7 guidelines, and the limits of related compounds were determined according to relevant guidelines. **RESULTS** Among the 18 compounds screened, 11 were non-genotoxic and could be controlled as non-genotoxic impurities, while 7 compounds showed positive mutagenicity prediction results and needed to be controlled as genotoxic impurities. **CONCLUSION** In order to ensure the safety of drug use, the total impurities in the final product should not >0.5%, the maximum limit of single impurity should not >0.001 875% for related compounds with positive mutagenicity prediction results, and the maximum limit of single impurity for other related compounds should not >0.1%.

**KEYWORDS:** azilsartan; genotoxicity; related compounds; quality standard

阿齐沙坦是血管紧张素 II 受体拮抗剂, 用于治疗成人高血压<sup>[1]</sup>, 由日本武田制药公司研发, 2012 年 4 月在日本上市, 其前体药物阿齐沙坦酯于 2011 年经美国 FDA 批准上市, 国内尚未获批上市。阿齐沙坦安全性良好, 无致癌性, 但在遗传毒性研究中, 中国仓鼠肺细胞遗传学检测结果显示, 阿齐沙坦酯、阿齐沙坦及其人体主要代谢产物均为染色体结构畸变阳性<sup>[2]</sup>, 在阿齐沙坦合成过程中, 可能会产生>15 个有关物质<sup>[3]</sup>, 这些杂质是否具有危害性(主要是遗传毒性), 尚未见文献报道, 难以制定合理的质量控制限度。本研究将依据 ICH M7 的指导原则, 对相关杂质进行遗传毒性定量构效关系 (quantitative structure activity

relationships, QSAR) 预测研究, 确定杂质分类, 为阿齐沙坦原料质量标准的制定提供依据, 以保障临床用药安全。

### 1 材料

#### 1.1 有关物质的确认

阿齐沙坦合成路线有多条<sup>[3]</sup>, 结合避开专利、市场供应等问题, 本研究确定采用以下工艺路线进行分析研究<sup>[4]</sup>, 见图 1。在研发过程中, 为缩短工艺周期, 避免工艺过度开发并降低环保压力, 本研究采用已高度商业化的中间体 {2-乙氧基-1-[(2'-胍基连苯-4-取代)甲基]苯并咪唑}-7-羧酸乙酯} 为起始原料, 经闭环、加成、噁二唑环的形成和酯水解反应生产阿齐沙坦。通过对工艺路线的

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2013ZX09402103)

作者简介: 冯小龙, 男, 博士, 教授, 高级工程师  
zhmoon22@163.com

E-mail: 15031137856@163.com

\*通信作者: 朱慧明, 女, 博士, 正高级工程师

E-mail:

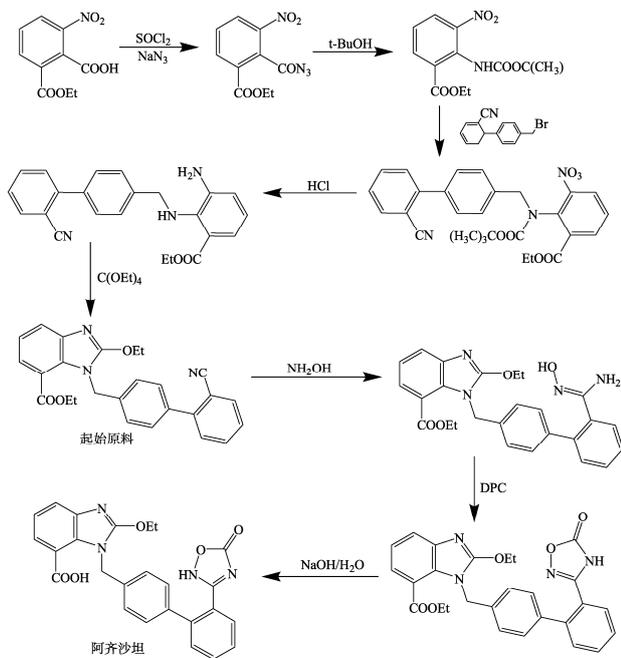


图1 阿齐沙坦合成工艺路线

Fig. 1 Synthetic process of azilsartan

反应过程分析, 最终确认 18 个需进行研究的杂质(结构式等信息见表 1、图 2): 起始原料(starting material, SM)1 个, 起始原料引入杂质(start material introduces impurities, SMI)5 个, 工艺中间体(intermediate, IM) 3 个, 有关物质(related compounds, RC)9 个。

### 1.2 杂质危害性评估方法

根据 ICH M7<sup>[5]</sup>, 有关物质危害性分析首先采用数据库细菌诱变数据文献检索分析, 如果无法获得这样的分类数据, 应采用 QSAR 方法进行计算学毒性评估, 预测细菌诱变结果。QSAR 预测方法需采用 2 个相互补充的方法, 一个方法应是依据专家规则的, 另一个方法则应该是统计方式的。如果没有发现警示结构, 则足以得出该杂质没有诱变可能的结论, 直接按非诱变性杂质进行控制, 不需要做进一步的检测; 当有 1 种或 2 种方法预测发现警示结构, 可以采用充分的控制措施, 或者对该杂质单独进行细菌诱变测试。根据 QSAR 预测方法危害性分析结果, 可将杂质分类为第 1~5 类, 分类方法见表 2, 根据分类即可制定杂质控制策略。

### 1.3 QSAR 预测软件<sup>[6]</sup>

**1.3.1 专家规则预测软件** Toxtree, 版本 3.1.0, 由欧盟委员会欧洲化学品局联合研究中心开发。Toxtree 软件是 EMA、美国 FDA 及相关指导原则均推荐的软件<sup>[7]</sup>。它主要以决策树的形式运行, 根

据警示结构对物质进行分类和预测, 常用于遗传毒性、皮肤致敏性和水生生态毒性的预测分析。

**1.3.2 统计方式预测软件** ADMET predictor<sup>[8]</sup>, 版本 9.5, 由美国 Simulations Plus 公司开发。它是 FDA、EPA、制药企业、学术单位运用最广的 ADMET 预测软件之一, 用户覆盖了世界前 50 强的制药企业及 FDA, 常用于化合物理化、吸收、分布、代谢、毒性、生物利用度等性质参数预测。

## 2 结果

### 2.1 有关物质分类

通过检索已有数据库对筛选出的有关物质进行遗传毒性初步分析, 检索数据库主要包括 TOXNET(包含 CPDB、GENE-TOX 等)、Toxicity Japan MHLW、ECHA-CHEM、Bacterial mutagenicity ISSSTY、Micronucleus ISSMIC、Micronucleus OASIS 等, 研究发现筛选出的 18 个有关物质均无实验数据。QSAR 评估研究, 2 种软件均无遗传毒性警示结构的有关物质共 10 个, 可以划分为 5 类杂质, 另外 8 个杂质有 1 种以上的软件预测为有遗传毒性警示结构, 可划分为 3 类杂质, 结果见表 1、图 2。

### 2.2 杂质限度确定

本研究采用的生产工艺较稳定, 适于生产应用, 根据样品质量, 将有关物质限度标准可定为各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积 0.5 倍(0.5%), 即总杂最高限度不得>0.5%, 单个杂质峰面积均不得大于对照溶液主峰面积的 0.1 倍(0.1%), 即单杂最高限度不得>0.1%。考虑到 RC-8 为阿齐沙坦代谢物(原研文献中的 TAK-53 M-II)<sup>[9]</sup>, 限度可适当放宽, 其峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 0.2 倍(0.2%)。

针对 3 类杂质, 参照 M7 指导原则, 可采用开展细菌诱变试验或直接控制在可接受限度[合适的毒理学关注阈值(threshold of toxicological concern, TTC)]以下 2 种方法, 因开展试验难度较大, 建议采用 TTC 法确定杂质控制限度。阿齐沙坦, 属终生暴露, 基于 TTC 计算的可接受日摄入量  $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$  被认为是在终生每日暴露情况下可以受到保护的量。阿齐沙坦片的最大日用量不得> $80 \text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ , 参照公式: 杂质浓度  $C=\text{TTC}/\text{日剂量}$ , 如采用终产品控制, 则 3 类警示结构杂质单杂最高限度不得>0.001 875%。

表 1 阿齐沙坦有关物质遗传毒性预测分类结果

Tab. 1 Prediction results of genotoxicity of organic impurities in azilsartan

杂质	CAS	分子式	杂质来源	toxtree	ADMET Predictor	分类
SMI-1	114772-54-2	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> BrN	起始原料引入	alerts	Negative	3
SMI-2	-	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>6</sub>	起始原料引入	No alerts	Positive	3
SMI-3	-	C <sub>28</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	起始原料引入	No alerts	Negative	5
SMI-4	-	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	起始原料引入	No alerts	Negative	5
SMI-5	136285-69-3	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	起始原料引入	alerts	Positive	3
SM	139481-41-7	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	起始原料	No alerts	Negative	5
IM-1	1397836-41-7	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	中间体	No alerts	Positive	3
IM-2	-	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	中间体	No alerts	Positive	3
IM-3	1403474-70-3	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	中间体	No alerts	Negative	5
RC-1	1397836-52-0	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	工艺、降解杂质	No alerts	Negative	5
RC-2	1586011-04-2	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	工艺杂质	No alerts	Negative	5
RC-3	1696392-11-6	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	工艺、降解杂质	No alerts	Negative	5
RC-4	-	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	工艺、降解杂质	No alerts	Positive	3
RC-5	-	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	工艺杂质	alerts	Positive	3
RC-6	-	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	工艺杂质	alerts	Positive	3
RC-7	-	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	工艺、降解杂质	No alerts	Negative	5
RC-8	1442400-68-1	C <sub>23</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	工艺、降解杂质	No alerts	Negative	5
RC-9	1403474-76-9	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	工艺、降解杂质	No alerts	Negative	5

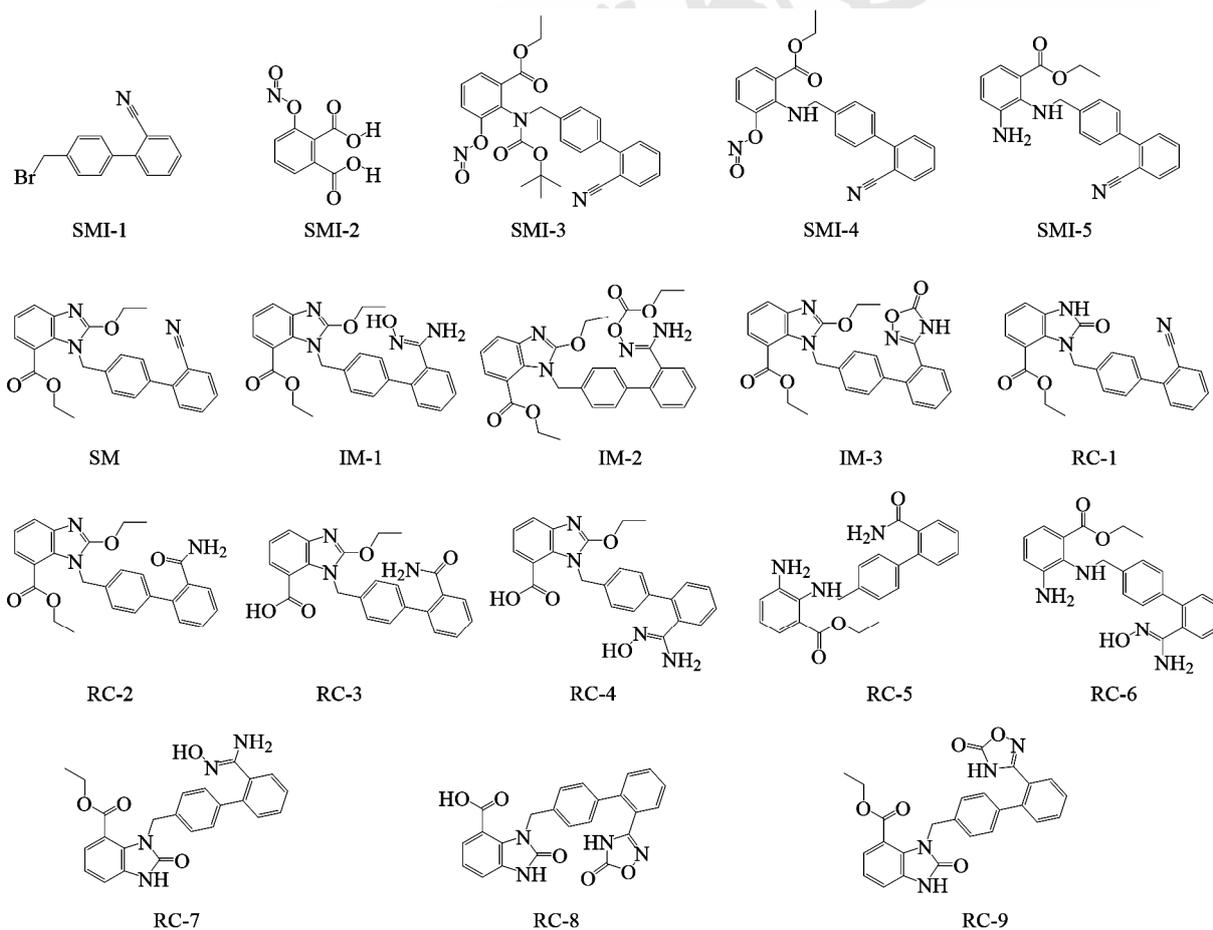


图 2 阿齐沙坦有关物质结构式

Fig. 2 Structural formula of azilsartan related compounds

表 2 杂质分类方法

Tab. 2 Impurity classification method

分类	定义	拟定控制措施
1	已知有致突变性的致癌物质	控制不高于化合物可接受限度
2	致癌性未知的已知致突变性物质(细胞诱变呈阳性*, 无啮齿动物致癌数据)	控制不高于可接受限度(适当的毒理学关注阈值)
3	含有警示结构, 与原料药结构无关, 无致突变性数据的物质	①控制不高于可接受限度(适当的毒理学关注阈值) ②检测细菌诱变: 如果非诱变性=第 5 类 如果具有诱变性=第 2 类
4	警示结构与药物本身或经研究证明为遗传毒性阴性的相关物质(如中间体)具有相同的警示结构	与非诱变性杂质同等对待
5	无警示结构, 或有充分的数据证明警示结构无致突变性或致癌性的物质	与非诱变性杂质同等对待

注: \*或其他相关阳性诱变数据, 说明与诱导基因变性的 DNA 反应活性(例如, 体内基因诱变研究显示阳性)。

Note: \*Or other relevant positive mutagenicity data indicative of DNA-reactivity related induction of gene mutations(e.g., positive findings in *in vivo* gene mutation studies).

### 3 讨论

由于杂质结构的多样性特点, 多数杂质的遗传毒性没有实验数据支持。在药物开发过程中, 遗传毒性和致癌性杂质的研究和控制涉及多个学科, 包括原料药合成工艺、分析方法、毒理研究等。遗传毒性警示结构承担了连接纽带作用, 基于大量理论研究和实践经验总结出的警示结构<sup>[10-11]</sup>, 对于杂质的潜在致癌性有重要提示作用。QSAR 预测方法写入 ICH M7 指导原则, 可以减少毒理学评价的工作量, 对药物开发过程中质量控制水平的提高有重要的意义。本研究采用了欧盟委员会欧洲化学品局联合研究中心开发的基于专家规则的毒性预测平台 Toxtree, 以及由美国 Simulations Plus 公司开发的基于统计学规则的 ADMET predictor, 可用于未知物质的遗传毒性预测分析, 且符合 ICH 指导原则要求。

按照 QSAR 预测结果分类方法, 部分预测为有遗传毒性警示结构的杂质可归为 4 类, 即警示结构与药物本身或经研究证明为遗传毒性阴性的相关物质(如中间体)具有相同的警示结构, 本研究直接归为了 3 类杂质。因为阿齐沙坦在部分试验中有致突变活性, 部分杂质虽与阿齐沙坦可能具有相同的警示结构, 但要取得其是否为遗传毒性杂质的实验数据仅进行诱变实验难以实现, 可能需要开展致癌研究, 因实验难度大、周期过长、基于用药安全的考虑, 建议直接参照 3 类杂质,

按 TTC 的方法确定杂质限度。

遗传毒性杂质的控制总体包括源头控制, 例如起始原料、溶剂质量标准控制; 过程控制, 例如生产环境的设备运行条件控制、产品工艺过程控制、工艺参数控制、中间体控制; 终点控制, 例如通过原料药或制剂的质量标准控制等。为减轻终产品的分析检测难度, 降低产品检测压力, 建议结合工艺研究, 制定终产品控制和中间体控制相结合的质量控制方法。

### REFERENCES

- [1] PERRY C M. Azilsartan medoxomil: A review of its use in hypertension[J]. Clin Drug Investig, 2012, 32(9): 621-639.
- [2] Current Medication Information for Edarbi (Azilsartan Kamedoxomil) Tablet (Revised: October 2012) [EB/OL]. (2018-07-10) [2022-03-21]. <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=75b16bfc-38c1-4133-bd7d-13258d54edec>.
- [3] ZHOU W T, ZHOU Y X, SUN L L, et al. Structural elucidation of potential impurities in Azilsartan bulk drug by HPLC[J]. J AOAC Int, 2014, 97(6): 1552-1562.
- [4] HAN S L. Synthetic process and quality control of azilsartan[D]. Tianjin: Tianjin University, 2014.
- [5] ICH M7: assessment and control of DNA reactive(mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk[EB/OL]. (2014-06-23) [2022-03-21]. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_site/ICH\\_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7\\_Step\\_4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_Step_4.pdf).
- [6] BHATARAI B, WILSON D M, PARKS A K, et al. Evaluation of TOPKAT, toxtree, and derek Nexus in silico models for ocular irritation and development of a knowledge-based framework to improve the prediction of severe irritation[J]. Chem Res Toxicol, 2016, 29(5): 810-822.
- [7] FENG X L, ZHU H M. (Quantitative) Structure-activity relationships to predict the genotoxicity of rivaroxaban organic impurities[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(11): 1289-1293.
- [8] ZHANG F, BARTELS M, CLARK A, et al. Performance evaluation of the GastroPlus(TM) software tool for prediction of the toxicokinetic parameters of chemicals[J]. SAR QSAR Environ Res, 2018, 29(11): 875-893.
- [9] KUZE Y, KOGAME A, JINNO F, et al. Development, validation and application of the liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of azilsartan medoxomil (TAK-491), azilsartan (TAK-536), and its 2 metabolites in human plasma[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015(1001): 174-181.
- [10] SHI F J, WANG Q J. Toxicological evaluation strategy of genotoxic impurities[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(3): 232-235.
- [11] BENIGNI R, BOSSA C. Structure alerts for carcinogenicity, and the Salmonella assay system: A novel insight through the chemical relational databases technology[J]. Mutat Res, 2008, 659(3): 248-261.

收稿日期: 2022-04-03

(本文责编: 沈倩)