

中图分类号: R95; R968 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)11-0048-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.11.010



专家评估在杂质遗传毒性(定量)构效关系评价中的应用

耿雪^{1,2}, 祝清芬¹, 魏霞¹, 苏昕宇¹, 刘娜¹, 钱利民^{3Δ}

(1. 山东省食品药品检定研究院·国家药监局仿制药研究与评价重点实验室·山东省仿制药一致性评价工程技术中心, 山东 济南 250101; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 3. 山东第一医科大学第一附属医院·山东省千佛山医院, 山东 济南 250014)

摘要:目的 通过专家评估获得或变更(定量)构效关系[(Q)SAR]评价分类结果实例, 提供一种基于人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)M7(R1)指导原则进一步利用专家进行评估的杂质遗传毒性评价程序。方法 采用 Lhasa 公司的 Nexus 2.5.0 版软件平台(整合了 Derek Nexus 和 Sarah Nexus)对杂质进行遗传毒性评价, 任意选择 3 个预测得到阳性、阴性、相互矛盾或未分类结果的实例, 进行专家回顾评估, 获得最终分类结果。结果 实例 1, Derek 预测结果为阴性, Sarah 预测结果为阳性, 专家评估后分类结果由 3 类变更为 5 类; 实例 2, Derek 预测结果为阴性, Sarah 预测结果为模棱两可, 专家评估后界定为 5 类; 实例 3, Derek 和 Sarah 预测结果均为阴性, 专家评估后分类结果由 5 类变更为 1 类。结论 通过对实例化合物遗传毒性分类结果论证过程的描述, 为专家评估在杂质遗传毒性(Q)SAR 评价中的应用提供了基本的参考程序。

关键词: 遗传毒性评价; (定量)构效关系评价; 人用药品技术要求国际协调理事会 M7(R1)指导原则; 专家评估

Application of Expert Review in the Evaluation of (Quantitative) Structure - Activity Relationship of the Genotoxicity of Impurities

GENG Xue^{1,2}, ZHU Qingfen¹, WEI Xia¹, SU Xinyu¹, LIU Na¹, QIAN Limin³

(1. Shandong Institute for Food and Drug Control · NMPA Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs · Shandong Research Center of Engineering and Technology for Consistency Evaluation of Generic Drugs, Jinan, Shandong, China 250101; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong, China 250355; 3. The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University · Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Jinan, Shandong, China 250014)

Abstract: Objective To provide an evaluation procedure for impurity genotoxicity with expert review based on the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) M7(R1) guidelines by examples of (quantitative) structure - activity relationship [(Q) SAR] classification results, which were obtained or modified by using expert evaluation. **Methods** Nexus 2.5.0 software platform including Derek Nexus and Sarah Nexus provided by Lasha Limited were used to evaluate the genotoxicity of impurities. Three cases of compounds with positive, negative, conflicting or inconclusive prediction results were randomly selected, and experts' review and evaluation were conducted to obtain the final classification results. **Results** For case 1, Derek prediction result was negative while Sarah prediction result was positive, and the compound should be assigned class 5 instead of class 3 after implementing the expert review. For case 2, Derek prediction result was negative and Sarah prediction result was ambiguous, and the compound was classified into class 5 after implementing the expert review. For case 3, Derek and Sarah prediction results were both negative, and the compound should be assigned class 1 instead of class 5 after implementing the expert

第一作者: 耿雪, 女, 博士研究生在读, 主管药师, 研究方向为药理毒理学和药物安全性评价, (电话)0531-81216532(电子信箱) gengxue5927111@163.com。

Δ通信作者: 钱利民, 男, 大学本科, 主管药师, 研究方向为临床药理学和药物安全性评价, (电子信箱)13708922327@163.com。

platelet pharmacogenetics in common clinical practice of patients with ST - segment elevation myocardial infarction[J]. International Journal of Cardiology, 2013, 167(6):2882 - 2888.

[19] 杨秀峰, 刘净, 乔馨, 等. 缺血性脑卒中患者抵抗阿司匹林干预与 GP1BA 基因多态性关系的探讨[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(8): 1251 - 1253.

[20] YUAN DD, SHI XF, GUO LP, et al. Lower Platelet Aggregation Is a Risk Factor for Dual Antiplatelet Therapy - Associated Bleeding: A Preliminary Retrospective Study with Genotype Analysis[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e923758.

[21] 潘彩桃. 肝功能 ALT 异常相关因素分析[J]. 医学理论与实践, 2013, 26(5): 643.

[22] 周监强, 杨志, 颜智聪. 血肌酐、胱抑素 C 与老年高血压肾损伤程度及肾功能恢复的相关性[J]. 心血管病防治知识, 2022, 12(3): 14 - 17.

[23] 陈文华, 毋崇岭, 何宝明, 等. 汉中地区住院患者凝血指标异常与临床出血风险分析[J]. 山西医药杂志, 2018, 47(8): 949 - 951.

(收稿日期: 2022-11-04; 修回日期: 2022-12-28)

review. **Conclusion** The description of the genotoxicity classification results of example compounds can provide a reference of the basic expert review program in the evaluation of the genotoxicity of impurity by using (Q) SAR.

Key words: genotoxicity evaluation; (Q)SAR; ICH M7(R1); expert review

药物遗传毒性杂质的控制是药品质量和风险管理的重要方面。(定量)构效关系[(Q)SAR]评价是目前药物杂质遗传毒性评价的有效手段^[1],评价结果可作为杂质遗传毒性确定的依据及药品注册资料。人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)M7(R1)指导原则基于风险评估的原则,按照物质的致癌性和突变性风险,将药物杂质分为1~5类,规定评价程序为检索文献中杂质的致突变性、致癌性数据,并分为1类、2类、5类^[2]。(Q)SAR方法是根据警示结构和对细菌回复突变试验的预测进行分类,要求采用2个互补的(Q)SAR预测方法,分别基于专家规则和统计学^[3]。目前,常用的商业化软件包括Nexus软件、CASE Ultra软件、Model Applier软件等^[4-5]。经预测,若杂质含有与原料药或与原料药相关的物质相同的警示结构如工艺中间体,且该原料药或与原料药相关的物质经测试为无致突变性,则可归为4类;若含有警示结构,但有充分数据认为该警示结构无致突变性或致癌性,或不含有警示结构,则可归为5类;若含有与原料药结构无关的警示结构,但无致突变性数据,则可归为3类^[6]。但(Q)SAR预测结果并不能保证完全准确,且在实际预测过程中,除出现阴性(4类、5类)、阳性(1类、2类、3类)结果外,有时还会得到未分类结果。对此,ICH M7(R1)指导原则中提到,对计算机系统得到的任何阳性、阴性、相互矛盾或超出域的预测结果,如有必要申请人可根据专家知识进行综合评估,提供进一步支持性证据,合理论证,并得出最终结论。应用专家知识进行评估可获得明确的分类结果,提高(Q)SAR的预测性能及准确性。Ames试验是化合物(Q)SAR建立的遗传毒性筛选数据库的重要基础^[7]。专家评估可通过比较具有细菌回复突变试验分析数据的结构类似的化合物(跨读法),确定该化合物是否有可能与DNA发生反应,采用第三方软件进行补充预测的方式^[8-10]。ICH M7(R1)并未提供指定的专家评估程序,故利用专家知识评价挑战性很强^[11-13],我国尚未见相关研究报道。为此,本研究中依据ICH M7(R1)指导原则相关要求,采用Derek Nexus(基于专家知识规则)和Sarah Nexus(基于统计学)软件对实例化合物进行遗传毒性杂质评价,并进一步利用专家知识评估,提供合理论证,获得最终分类结果,为药品审评过程中专家评估的应用提供参考。现报道如下。

1 软件版本与方法

1.1 软件版本

Nexus: 2.5.0, 英国 Lhasa 公司 (<http://www.lhasa->

limited.org/) 旗下 Derek, Sarah, Vitic, Meteor, Zeneth 等软件的整合平台。Derek Nexus 版本: 6.1.1; 数据库: Derek KB 2020; 数据库版本: 1.0。Derek 用于杂质遗传毒性预测,基本设置为,物种(species)设置为细菌(bacterium),预测终点(endpoints)设置为遗传毒性(genotoxicity)项下的致突变性(mutagenicity)。Sarah Nexus 版本: 3.2.0; 模型: Sarah Model - 2022.1; 模型版本: 1.9。

1.2 方法

绘制实例1、实例2、实例3的化学结构图,输入Nexus软件,采用ICH M7(R1)分类模式对杂质进行遗传毒性预测。

2 结果

2.1 实例 1

杂质实例1: 预测结果Derek为阴性(Inactive), Sarah为阳性(Positive), 软件分类为3类。Sarah阳性可信度为23%, 基于软件标注, 提供了4个结构阳性假说, hypotheses ID分别为H-32, H-248, H-285, H-254(表1)。根据软件内置的专家评价机制, 按Lhasa公司的警示结构-预测假设关联规则, 依据与杂质化学结构的相似度排序, 采用Derek分析相似度最大的17个遗传毒性阳性化合物, 发现其造成杂质遗传毒性阳性的警戒结构包括代号分别为329, 344, 326, 664, 027, 007的芳香硝基化合物、1,2-二羰基化合物或前体、偕二卤、 α, β 不饱和化合物、烷化剂、N-硝基或N-亚硝基化合物, 均不存在于杂质实例1(表2)。人为添加软件中的讨论意见18内容见图1。最终经软件评价和专家评估, 将杂质实例1预测为遗传毒性阴性, 分类为5类(表3)。

2.2 实例 2

化合物实例2预测结果Derek为阴性(Inactive), Sarah为模棱两可(Equivocal), 软件未得到分类结果。基

表1 杂质实例1 Sarah 预测假说

Tab. 1 Sarah prediction hypothesis of impurity case 1





结构	hypotheses ID	描述	结果	可信度(%)	例子个数
	H-32	假设(被训练集范例推翻)	阳性	17	2 011
	H-248	假设(被训练集范例推翻)	阳性	2	624
	H-285	假设(被训练集范例推翻)	阳性	30	957
	H-254	假设(被训练集范例推翻)	阳性	21	4 173

表2 杂质实例1相似遗传毒性化合物信息

Tab. 2 Information of genotoxic compounds similar to impurity case 1

序号	结构代号	相似度 (%)	警戒结构代号	结构式	序号	结构代号	相似度 (%)	警戒结构代号	结构式
1	9705	54	329		9	10103	15	344	
2	6987	51	329		10	425	15	326	
3	5632	27	329		11	10103	14	007	
4	9689	26	329		12	11591	13	007	
5	9783	25	329		13	20551	13	027	
6	12361	19	007		14	9950	13	007	
7	5638	19	329		15	9935	12	027	
8	5637	18	329		16	10789	12	007	
					17	476	12	664	

注:标灰部分为警戒结构结构式。表4同。

Note: The gray part refers to the structural formula of the warning structure (for Tab. 2 and Tab. 4).

Arguments Available	Argument ...
18 - Toxicophore identified by Sarah Nexus is not causative of activity of supporting training set examples	Negative
The positive prediction produced by Sarah Nexus as a result of the identification of positive hypothesis/es is negated following removal of positive training set example compounds which contain additional and unrelated toxicophores (according to the Lhasa alert-hypothesis association rules). As a result, an overall in silico prediction of negative can be made.	

图1 讨论意见18内容

Fig. 1 Content of arguments opinion 18

于软件标注, Sarah提供了1个结构阴性假说(hypotheses ID为H-243)和1个结构阳性假说(hypotheses ID为H-275), 详见图2。根据软件内置的专家评价机制, 按照Lhasa公司的警示结构-预测假设关联规则, 依据与

表3 杂质实例1遗传毒性预测结果

Tab. 3 Genotoxicity prediction results of impurity case 1

结构	Derek	Sarah	(Q)SAR 结果	专家评估 结果	计算机 模拟结果
	■ ■ ■ □ 阴性	■ □ □ □ 阳性 - 23%	3类	5类*	阴性

注: *为经专家知识评估后最终的预测结果。表5至表6同。

Note: * refers to the final prediction result evaluated by expert review (for Tab. 4 - 6).

杂质化学结构的相似度排序,阳性假说H-275中相似度最大50个化合物中有25个化合物遗传毒性为阳性

(表4),对这25个化合物分别利用Derek分析后,发现其造成化合物遗传毒性阳性的警戒结构代号分别为

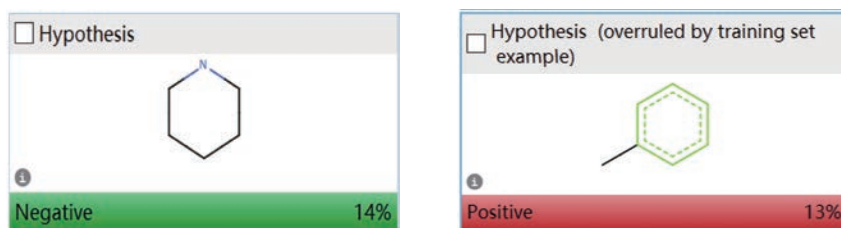


图2 杂质实例2 Sarah预测假说

Fig.2 Sarah prediction hypothesis of impurity case 2

表4 杂质实例2相似遗传毒性化合物信息

Tab.4 Information of genotoxic compounds similar to impurity case 2

序号	结构代号	相似度 (%)	警戒结构代号	结构式	序号	结构代号	相似度 (%)	警戒结构代号	结构式
1	4671-93-6	26	820		13	691	24%	073	
2	542	26	842		14	4295	23	074	
3	10690	26	074		15	4218	23	070	
4	11125	26	073		16	541	21	318	
5	11129	26	073		17	1936	21	072	
6	11149	26	318		18	11354	21	070	
7	11233	26	070		19	11495	21	074	
8	11870	26	304		20	12647	21	304	
9	11992	26	070		21	15938	21	073	
10	12092	26	072		22	Structure-255	20	617	
11	12549	26	794		23	1868	20	072	
12	43572	26	638		24	4263	19	rapidproto-type 154	
					25	548	19	317	

820, 842, 074, 073, 318, 070, 304, 072, 794, 638, 318, 617, repidprototype 154, 317的芳香硝基化合物、1,2-二羰基化合物或前体、偕二卤、烷化剂、N-硝基或N-亚硝基化合物、异氰酸酯或异硫氰酸盐、环氧化物、卤代硫醇衍生物、羟基脲/胍/氨基甲酸酯、叠氮化物、卤代烯烃、苯胺或前体、苄基二甲基三氮烯,均不存在于杂质实例2。人为添加软件中的讨论意见33内容见图3。最终经软件评价和专家评估,将杂质实例2判定为遗传毒性为阴性,分类为5类(表5)。

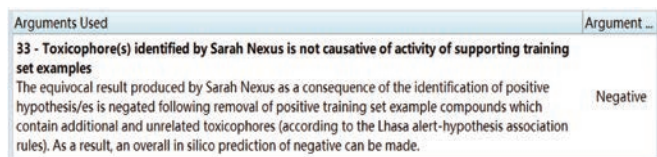


图3 讨论意见33内容

Fig. 3 Content of arguments opinion 33

表5 杂质实例2遗传毒性预测结果

Tab. 5 Genotoxicity prediction results of impurity case 2

结构	Derek	Sarah	(Q)SAR 结果	专家评估结果	计算机模拟结果
			未分类	5类*	阴性

2.3 实例3

化合物实例3预测结果Derek为阴性(Inactive), Sarah为阴性(Negative),软件预测结果为阴性。Sarah可信度为33%,基于软件标注,提供了1个结构阴性假说(hypotheses ID为H-235),数据集中有11个结构类似化合物,详见图4。根据软件内置数据库,发现该化合物有致癌性和致突变性试验数据,致癌性为阳性,Ames试验中TA98菌株既有阳性结果也有阴性结果(图5)。基于其致癌性风险,人为添加软件中的讨论意见39内容见图6。最

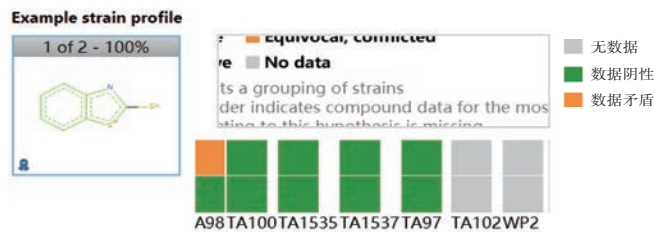


图5 Ames试验菌株结果示意图

Fig. 5 Schematic diagram of the Ames test result

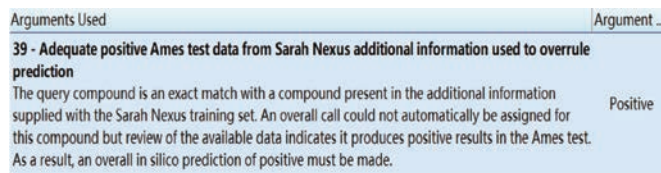


图6 讨论意见39内容

Fig. 6 Content of arguments opinion 39

The compound is predicted to be negative with 33% confidence for the 'Mutagenicity *in vitro*' endpoint in the model: 'Sarah Model - 2020.1'. Supporting hypothesis containing similar examples from the training set has been found.

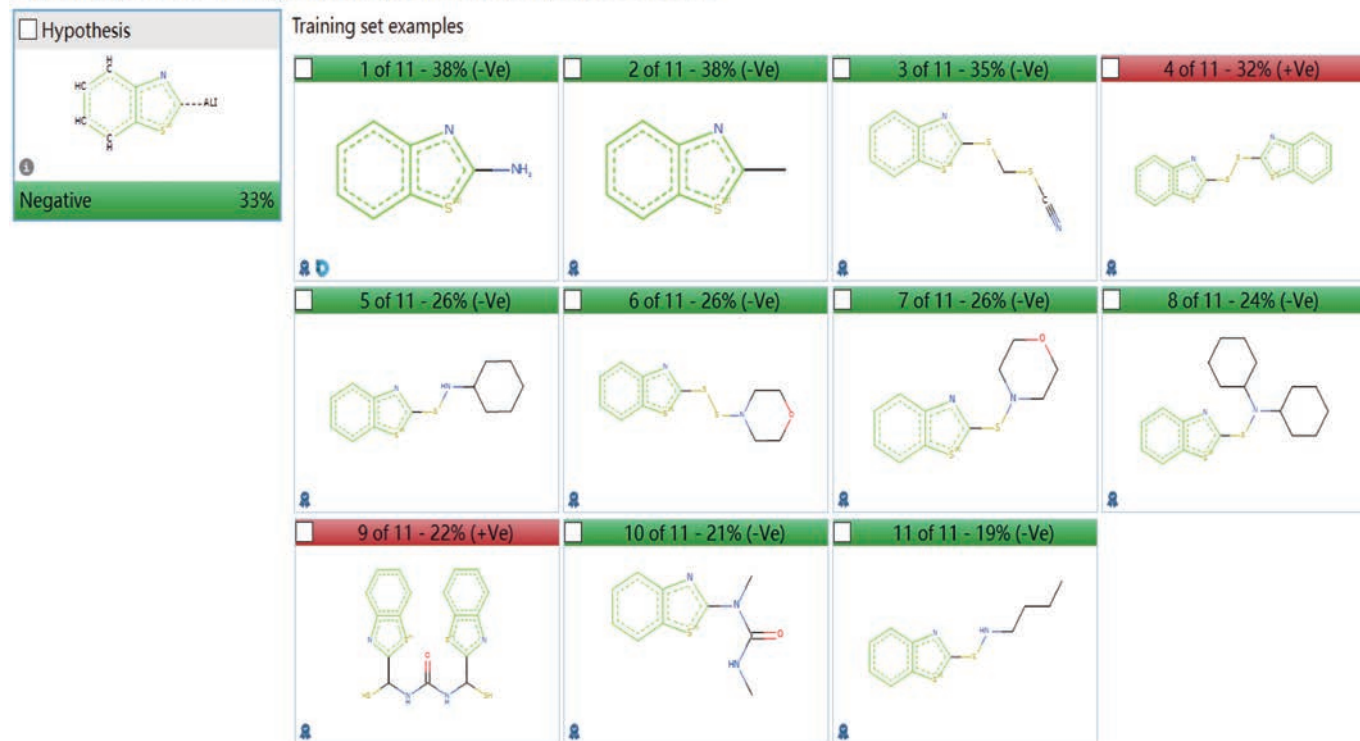
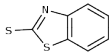




图4 杂质实例3 Sarah 预测假说

Fig. 4 Sarah prediction hypothesis of impurity case 3

表6 杂质实例3遗传毒性预测结果

Tab. 6 Genotoxicity prediction results of impurity case 3

结构	Derek	Sarah	(Q)SAR 结果	专家评估 结果	计算机 模拟结果
	 阴性	 阴性 - 33%	5类	1类*	阴性

终经软件评价和专家评估,将杂质实例3预测为遗传毒性为阳性,分类为1类(表6)。

3 讨论

ICH M7 (R1)指导原则建议使用互补(Q)SAR模型作为Ames试验的高通量替代检验方法来评估药物杂质的致突变潜力,还指出在必要时应使用专家知识回顾来为任何阳性、阴性的未分类或有冲突的预测结果提供明确的理论依据,并得到最终结论。一项美国食品和药物管理局(FDA)对2017年4月至2019年3月在药品监管申请中评估的1 002种杂质的回顾性分析中,评估了专家审查对(Q)SAR预测的影响,专家知识回顾推翻了26%的错误预测,解决了91%的模棱两可(Equivocal)的预测和75%的超出域(Outside domain)的结果^[14]。261个被推翻的预测中,15%的预测上调至“模棱两可”或“阳性”,79%的预测下调至“模棱两可”或“阴性”^[14]。

应用专家知识对预测结果进行评价取决于预测结果的质量,如是否可信度较高、是否存在无法正确判断的结构等信息。对于两类软件给出了一致的预测结果,专家评估较易给出结论,但对于两类软件结果不一致、模棱两可、超出域等情况,进行专家评估需要研究者具备深厚的专业知识的和丰富的的工作经验。利用专家知识进行评估时,依据要充分,特别是将阳性预测结果评价为阴性时,一定要充分考虑被评价杂质的风险^[15]。近年来,越来越多的学者开始关注专家评估,并给出了经典案例^[11,16]。本研究中提供的3个案例均为笔者在杂质遗传毒性评价工作中遇到的实际案例,不仅包含了2类软件结果不一致、未得到分类结果,还包含了1个一致阴性预测结果被推翻的实例,可为药物杂质遗传毒性评价中应用专家知识评估提供参考。

参考文献

[1] 董晓亚,雷勇胜,傅琳,等. 毒性杂质的预测研究策略[J]. 中国新药杂志,2015,24(12):1369-1373.
[2] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7(R1)[A/OL]. (2017-03-31)[2022-06-01]. <https://database.ich.org/>

sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf.

[3] AMBERG A, BEILKE L, BERCU J, et al. Principles and procedures for implementation of ICH M7 recommended (Q) SAR analyses[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 77: 13-24.
[4] HONMA M. An assessment of mutagenicity of chemical substances by (quantitative) structure - activity relationship [J]. *Genes Environ*, 2020, 42: 23.
[5] BENIGNI R, BASSAN A, PAVAN M. In silico models for genotoxicity and drug regulation[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2020, 16(8): 651-662.
[6] 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.
[7] 刘玉明,蒋定文,李珂娴,等. 银参胶囊遗传毒性研究[J]. *中国药业*, 2020, 29(3): 17-19.
[8] FUKUCHI J, KITAZAWA A, HIRABAYASHI K, et al. A practice of expert review by read - across using QSAR Toolbox [J]. *Mutagenesis*, 2019, 34(1): 49-54.
[9] KAMBER M, FLÜCKIGER - ISLER S, ENGELHARDT G, et al. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity [J]. *Mutagenesis*, 2009, 24(4): 359.
[10] HANSEN K, MIKA S, SCHROETER T, et al. Benchmark data set for in silico prediction of Ames mutagenicity [J]. *J Chem Inf Model*, 2009, 49(9): 2077-2081.
[11] BARBER C, AMBERG A, CUSTER L, et al. Establishing best practise in the application of expert review of mutagenicity under ICH M7 [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015, 73(1): 367-377.
[12] 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): 295-300.
[13] FURUKAWA A, ONO S, YAMADA K, et al. A local QSAR model based on the stability of nitrogen ions to support the ICH M7 expert review on the mutagenicity of primary aromatic amines [J]. *Genes Environ*, 2022, 44(1): 10.
[14] JAYASEKARA PS, SKANCHY SK, KIM MT, et al. Assessing the impact of expert knowledge on ICH M7 (Q) SAR predictions. Is expert review still needed? [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2021, 125: 105006.
[15] FOSTER RS, FOWKES A, CAYLEY A, et al. The importance of expert review to clarify ambiguous situations for (Q) SAR predictions under ICH M7 [J]. *Genes Environ*, 2020, 42: 27.
[16] HEMINGWAY R, FOWKES A, WILLIAMS RV. Carbamates and ICH M7 classification: Making use of expert knowledge [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2017, 86: 392-401.

(收稿日期:2022-08-31;修回日期:2023-02-10)