

Beşeri İlaçlarda Genotoksik Safsızlıklar

Genotoxic Impurities in Drugs for Human: Review

Şaziye Sezin PALABIYIK,^a
Terken BAYDAR,^b
Gönül ŞAHİN^c

^aFarmasötik Toksikoloji AD,
Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Erzurum

^bFarmasötik Toksikoloji AD,
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Ankara

^cFarmasötik Toksikoloji AD,
Doğu Akdeniz Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Gazi Magosa, KKTC

Geliş Tarihi/Received: 06.12.2015
Kabul Tarihi/Accepted: 16.02.2016

Yazışma Adresi/Correspondence:
Şaziye Sezin PALABIYIK
Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Toksikoloji AD, Erzurum,
TÜRKİYE/TURKEY
sezinp@gmail.com

ÖZET Üretim esnasında veya saklama sırasında oluşan her safsızlık, farmasötik ürünün kalite ve güvenliğinde risk oluşturur. Aktif farmasötik bileşendeki ve dozaj formundaki safsızlıkların yönetilmesi, özellikle beşeri ilaç geliştirilmesinde önemli bir tartışma konusudur. Hasta güvenliği söz konusu olduğu için, safsızlığın tamamen giderilmesi veya azaltılması ve yıkım ürünlerinin en aza indirilmesine ilaç endüstrisinde büyük çaba sarf edilmektedir. Bu safsızlıklardan en önemlisi, varlıkları nedeni ile ilaç endüstrisinin ve düzenleyici mekanizmaların endişe duyduğu ve tartışmalara neden olan genotoksik safsızlıklardır. Düzenleyici mekanizmaların bu safsızlıklara ilgisi, genetik mutasyon ile kromozomal kırıkların indüklemesi ve sonuç olarak kansere neden olma olasılıkları nedeni ile son dönemlerde artmıştır. Pek çok uluslararası kılavuz ve ulusal rehber, ilaç geliştiricilerine ve düzenleyici kuruluşlara ilaç maddesindeki ve ilaç ürünündeki safsızlıkların kontrolü ve değerlendirilmesi konusunda bilgi sağlar. Ayrıca, bu kılavuzlar safsızlıkların genotoksik olup olmadığını belirlemek için kullanılması gereken testler hakkında da bilgi verir. Bununla birlikte, mevcut kılavuzlar genotoksik safsızlıkların düzeylerinin nasıl kontrol edileceği konusunda yeterli değildir. Bir ilaç molekülünün geliştirilmesi için 8-12 yıl ve hatta daha uzun sürelerle ihtiyaç duyulması nedeni ile, ilaç geliştiren şirketlerin yeni bir ilaç için, düzenleyicilerin ileride ne gibi beklentileri olacağını öngörmeleri oldukça önemlidir. Bu çalışmada, bu konuya açıklık getirilmeye çalışılarak ilaç maddelerinde ve beşeri ilaçlarda genotoksik safsızlıkların düzeylerinin kontrolünde kullanılabilecek uygulamalı ve teorik yöntemler tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İlaç; genotoksisite; safsızlık

ABSTRACT Any impurities that occur during storage or production pose a risk to the safety and quality of pharmaceutical products. Managing the impurities in active pharmaceutical ingredient and dosage form is an important challenge in the drug development, especially in human medicines. For the safety of the patient concerned, pharmaceutical industry are making great effort to eliminate completely or reduce the impurities and minimizing the degradation products. The most important of these impurities are genotoxic impurities which the pharmaceutical industry and the regulatory mechanisms concerned about and make challenges against its presence. In recent years, the regulatory mechanisms are focused on these impurities due to its induction of genetic mutations and chromosomal breaks and as a result potential to cause cancer. Several international and regional guidance are informed drug developers and regulatory mechanisms about controlling and evaluating of drug substances and drug products. Additionally, guidelines give information about the tests that needs to use whether substances are genotoxic or not. However, these guidelines are not sufficient to give information about how to control the levels of these genotoxic impurities. Discover and develop a drug takes more than 8-12 years and even more years for drug molecule development, it is important for innovator companies to know the regulatory mechanisms are expected what in the future. With trying to clarify this issue this review discussed the practical and theoretical methods that controls genotoxic impurities in drug substance and human medicines.

Key Words: Drug; genotoxicity; impurity

doi:10.5336/pharmsci.2015-48824

Copyright © 2016 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Pharm Sci 2016;5(1):52-64

İlgili yasal kurumlar ve ilaç endüstrisi için, ilaç ham maddelerinde veya son ürün olan ilaçtaki olası safsızlıklar son yıllarda önemli bir konu haline gelmeye başlamıştır.¹ İlaçlarda bulunan safsızlıklar herhangi bir yarar sağlamadığı gibi riske de neden olmaktadır. Bu safsızlıklar kalıntı başlangıç maddelerinden, ara ürünlerden, yan reaksiyonlardan, yıkım ürünlerinden ve paketlenmeden kaynaklanabilir. Aynı zamanda eksipiyanlar da safsızlık kaynağı olabilir.² Söz konusu yıkım ürünleri ışık, sıcaklık, pH, nem, eksipiyan maddelerle reaksiyon veya primer paket ile temasa bağlı olarak saklama sırasında oluşan kimyasal değişiklikler sonucu meydana gelir. Genellikle yıkım ürünü ve safsızlık terimleri birbirlerinin yerine kullanılır, ancak aralarında bazı kavramsal farklılıklar vardır. İlaç maddesi veya ürününde bulunan safsızlıklar, organik (ham madde, alt ürün “sub-product”, ara ürünler, yıkım ürünleri, reaktifler ve katalizörler gibi) veya inorganik (reaktifler ve katalizörler, ağır metaller veya diğer metal kalıntıları, inorganik tuzlar ve sentezde kullanılan diğer maddeler gibi) kaynaklı maddelerdir. Yıkım ürünleri ise ilaç maddesinin ve/veya eksipiyanların yıkımı sonucu oluşan organik safsızlıklardır.³ Penisilinler ve sefalosporinler, yıkım ürünlerinin iyi bilinen örnekleridir.⁴ Aktif farmasötik etken maddelerin üretimi sırasında pek çok başlangıç maddesi, sentez ara ürünleri ve reaktifler kullanılmaktadır. Bu maddeler, hem toksik olabilir hem de aktif etken maddede veya son ilaç ürününde düşük konsantrasyonlarda safsızlık olarak bulunabilir. Bununla beraber, toksik safsızlıklar insanlarda advers etkilere neden olabilecek kadar yüksek konsantrasyonlara da ulaşabilir.⁵ Genel olarak safsızlıklar, 1) ilaç etken maddesinin yıkımı ile (ilaç kaynaklı), 2) ilaç etken maddesinin üretimi sırasında (üretim kaynaklı) ve 3) ilacın üretimi ve saklanması sırasında (üretim kaynaklı) oluşabilir.⁶⁻⁸

Uluslararası Uyum Konferansı [International Conference on Harmonisation (ICH)] tarafından yayınlanan S2 (R1) kılavuzunda genotoksisite “oluşum mekanizmasına bakılmaksızın, genetik materyaldeki herhangi bir istenmeyen değişiklik” şeklinde geniş anlamda tanımlanmaktadır.* Muta-

jenite ise “kalıtım yoluyla aktarılabilecek, hücre veya organizmadaki genetik materyalin yapısında veya miktarında kalıcı değişiklikler” olarak ifade edilmektedir. Her iki terim birbiri yerine kullanılabilir de, düzenleyici kılavuzlarda “genotoksik safsızlıklar” (GS) olarak ifade edilmektedir.[†] Kılavuzlarda kullanılan diğer kavramlar karsinojen ve karsinojenitedir. Karsinojen (kanserojen); hücrelerdeki düzensiz çoğalmayı, genom veya hücredeki metabolik etkilere hasar vererek indükleyen ve sonunda kansere neden olan maddelerdir. Karsinojenite (kanserojenite, kanser) ise “tümör gelişimine neden olan süreci” ifade eder.⁹

Safsızlıklardan genetik mutasyonları, kromozom hasarları ve/veya kromozomal değişiklikleri indükleyebilenler ile insanlarda kanser oluşturma potansiyeli olanlar GS olarak isimlendirilirler.^{4,10,11} Bu safsızlıkların genotoksik aktivitesi in vivo memeli hücre testleri (örneğin; mikronükleus testi) ve in vitro testler (örneğin; Ames mutasyon testi, in vitro kromozomal aberasyon testi, fare lenfoma tk mutasyon testi) ile gösterilmiştir.¹² Hidroperoksitler ve epoksitler gibi oksidatif bozunma ürünleri ve anilinler gibi hidroliz ürünleri olası GS'lere örnek olarak verilebilir. Aynı zamanda, eksipiyan bileşenler aktif farmasötik ürünle reaksiyona girebilir veya iyon alışverişi ile genotoksik olabilecek yeni bir safsızlık oluşturabilirler (örneğin; halojenli furanolar).¹³

Safsızlıkların belirlenmesi için daha geçerli ve duyarlı yöntemlerin geliştirilmesi, düzeylerinin en aza indirilmesi veya tamamen önlenmesi için üretim aşamalarının düzenlenmesi ve değiştirilmesi için büyük çaba harcanmaktadır. Ancak bu durum üretim maliyetini artırmakta ve üretim sürecini uzatmaktadır. Yeni ilaç geliştirme araştırmalarının sürekliliğini sağlamak için, bu safsızlıkların kabul edilebilir sınırlarının ne olabileceği konusu tartışılmaktadır.¹⁴ Kanser tedavilerinde kullanılan sitotoksik bazı aktif farmasötik maddelerin genotoksik ve karsinojenik özellikleri kabul edilebilirken, diğer ilaç maddelerinde ve ürünlerinde bunların sınırlandırılmaları zorunludur. Özellikle yenilikçi

* ICH, Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use, Current Step 4 version, 9 Kasım 2011.

† Snodin DJ, Elder DP. Genotoxic Impurities Part 1: General Overview. J Pharm&Biopharm Cont Serv May 2012.

ilaç üreticileri, olası riskleri en düşük düzeyde tutmak ve hatta tamamen ortadan kaldırmak için çabalamaktadırlar.¹⁵

İlaçlarda çok düşük düzeylerde bulunan, ancak bu dozlarda bile kansere ve genetik mutasyonlara neden olabilen GS'lerin belirlenmesi ve kontrolü, ilaç endüstrisinin ve düzenleyici kuruluşların giderek artan ilgisini çekmektedir.^{1,7} GS'nin belirlenmesi ve kontrolü ise düzenleyici mekanizmaların kılavuzları ile sağlanmaktadır.¹ Bu safsızlıklar ilaçlardan tamamen uzaklaştırılmadığından "güvenli konsantrasyonlarda sınırlamak" için çalışmalar yapılmaktadır.⁷ İlaç güvenliliği konusunda asıl endişe, bu safsızlıklara maruziyetin uzun süre devam etmesiyle, bu bileşiklerin DNA'yı alkilemesi ve sonuçta karsinojenik bir yanıt oluşturabilmesidir.¹⁵ Bir başka sorun ise, ilaç ürünlerine uygulanan mevcut karsinojenite ve mutajenite/genotoksikite test yöntemlerinin, genellikle milyonda bir kısım (ppm) düzeylerinde bulunan DNA-reaktif safsızlıklar ile ilişkili olası ters etkileri değerlendirmek için yeterli duyarlılıkta olmamasıdır.[†] Bunun yanında, ilaç etken maddesinin sentezi sürecindeki reaktifler, başlangıç maddesi ve/veya sentetik ara ürünlerde ortaya çıkan genotoksik maddelerden tamamen kaçınmak pratik olarak mümkün değildir. Bu durumlarda, güvenilirlik için uygun sınırlamalar ile güçlü kontrol stratejisi gerekmektedir.⁶ Bu strateji, üretim kapasitesinin değerlendirilmesi ve kontrolü, aktif farmasötik maddenin/bileşiğin ve ilaç ürününün stabilitesinin ve safsızlığın belirlenmesi ve kontrol için kullanılacak analitik tekniklerin geliştirilmesini kapsamalıdır.⁶

GENOTOKSİK SAFSIZLIKLAR İLE İLGİLİ DÜZENLEMELER

İlaç ham maddelerinde ve ilaç ürünlerinde safsızlıkların güvenilirliğini belirlemek önemlidir. Safsızlıkların genotoksik etkisinin değerlendirilmesi ve GS'lerin kabul edilebilir düzeylerinin belirlenmesi bazı kılavuzlarda zor bir konu olarak yerini almıştır.¹ Pek çok uluslararası yönetmelik ve ulusal kılavuz, ilaç araştırmacılarını ve düzenleyici ku-

rumları ilaç ham maddeleri ve ilaç ürünlerindeki safsızlıkların kontrolü ve değerlendirilmesi konularında bilgilendirmektedir. İlaç kullanımındaki risk ve yarar arasındaki denge, ilaçlardaki safsızlıklar için geçerli değildir; safsızlıklar sadece risk taşımaktadır.¹⁶ Safsızlıklar tamamen giderilemez olduğundan ve pratik olarak çok düşük düzeylerde bulunmaları ancak kabul edilebilir olduğundan, safsızlıklar için spesifikasyonlar belirlenmelidir.⁵ Genotoksik olmayan safsızlıklar için belirlenen limitler, olası advers etkiler ve insan sağlığı için daha fazla dikkat gerektirdiğinden GS'ler için uygulanmaz.¹¹

İlaç ham maddeleri ve ilaç ürünlerindeki safsızlıkların kontrolü konusunda geliştirilen ICH Q3A(R2), Q3B(R2), Q3C(R4) ve Q3D kılavuzlarını da içeren pek çok düzenleyici kılavuz, safsızlığın tanımlanması, toksikolojik niteliği ve bu safsızlıkların, ilaç ürünlerindeki yıkım ürünlerinin ve çözücülerin kabul edilebilir düzeyleri konusunda öneriler sağlamaktadır.^{5,16} Q3A kılavuzunda ilaç maddesindeki safsızlıklar,[§] Q3B'de ilaç ürünlerindeki safsızlıklar (yıkım ürünleri),** Q3C kılavuzunda ise kalıntı çözücülerin safsızlıkları ile ilgili sınırlamalar bulunmaktadır.^{††} Q3C'nin bazı karsinojenik çözücülerle ilgili kontrol önerileri dışında, GS'lerin çok daha sıkı bir şekilde kontrol edilmesi önerilmesine rağmen, bu kılavuzlarda belirgin olarak GS'ler irdelenmemiştir.^{17,**} Q3D ise henüz geliştirme aşamasındadır ve bu kılavuzda ağır metal kaynaklı safsızlıkların düzeylerinin belirlenmesine çalışılmaktadır.^{‡‡} Organik safsızlıkların kabul edilme ölçütü Q3A'da verilmiştir. Buna göre, eğer bir ilaç maddesinin dozu 2 g/gün'e kadar çıkıyorsa safsızlığın eşik limit değeri ya %0,15 (1.500 ppm) veya 1 mg/gün'dür.^{15,18,§} Ancak, önerilen tüm safsızlık limitleri genotoksik veya karsinojenik potansiyele dayanarak belirlenmemiştir. Kılavuz sadece karsinojenite ile ilişkili bir veri olduğunda, matematiksel modeller uygulanarak ekstrapolas-

§ ICH, Guidance for Impurities in New Drug Substances Q3A (R2), Current Step 4 version, 25 October 2006

** ICH, Guidance for Impurities in New Drug Products Q3B (R2), Current Step version 4, 2 June 2006

†† ICH, Impurities: Guideline for residual solvents, ICH Q3C (R5), Current Step version 4, 4 February 2011

‡‡ ICH, Guideline for Elemental Impurities, Q3D, Current Step 2b version, 26 July 2013

† Snodin DJ, Elder DP. Genotoxic Impurities Part 1: General Overview. J Pharm&Biopharm Cont Serv May 2012.

yonaya dayalı maruziyet limitlerinin belirlenmesi ile ilgili önerilerde bulunmaktadır.⁵ Mevcut ICHQ3 kılavuzları GS'lerin nasıl değerlendirilmesi gerektiği konusuna açıklık getirmemiştir ve GS'lere özgü önerilerde bulunmamaktadır. ICHQ3 kılavuzunda sadece sıklıkla gözlenmeyen toksik safsızlıklar için uygun olabilecek düşük eşik değerlerden bahsedilmiştir.^{11,16} Kılavuzun toksikolojik araştırmalar bölümünde ise bakteriyel ters mutasyon testi (Ames testi) ve kromozom aberasyon testi genotoksisite testleri olarak yer almaktadır, ancak GS'ler eser miktarlarda bile kansere neden olabileceğinden ilaç ürünlerinde araştırılmalıdır ve gerekiyorsa tedavinin risk/yarar oranını bozmayacak şekilde düzeylerinin sınırlandırılması önerilmektedir.⁷ ICH Q3C kılavuzunda genotoksik olmayan safsızlıklar için izin verilen günlük maruziyet düzeyi [permitted daily exposure (PDE)] ile çözücülerin kabul edilebilir alım düzeyi hesaplanmaktadır. Ancak, bazı karsinojenik maddeler, özellikle de DNA ile reaksiyona girenler, herhangi bir konsantrasyonda hasara neden olabileceğinden herhangi bir maruziyet sınırı belirlemek mümkün olmayabilir. Bu nedenle bazı GS'lerin PDE düzeyleri hesaplanamayacağından, ilacın güvenilirliği için yeni bir yaklaşım gerekmektedir.⁷

Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency (EMA)) bünyesindeki "İnsan Kullanımı İçin Tıbbi Ürünler Komitesi" (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)) tarafından 2002 yılında GS'lerin limiti için taslak bir metin çıkarılmıştır. 2003 yılında Londra'da yapılan EMA toplantısında, bu taslak kılavuzdaki kabul edilebilir safsızlık limitleri tartışılmıştır.¹⁹ Taslakta bahsedilmeyen, klinik geliştirme aşamasında GS'lerin kontrolünü konu alan bir makale ise 2006 yılında Farmasötik Araştırma ve Üretim Derneği (Pharmaceutical Research & Manufacturing Association (PhRMA)) tarafından yayınlanmıştır.²⁰ Bu çalışmaların ardından, ocak 2007 tarihinde GS'ler için limitlerin belirlendiği EMA kılavuzu (EMA/CHMP/QWP/251344/2006) yürürlüğe girmiştir.^{5,6,11,19} Bu kılavuz, yeni aktif maddelerdeki GS'ler konusunda pratik yaklaşımlar ve mevcut aktif maddeler ile ilgili yeni uygulamalar hakkında genel bir çerçeve sunmaktadır.¹¹ EMA kılavuzuna

uyum çalışmaları kapsamında 2008 yılında Sorular ve Cevaplar Belgesi (Question & Answer Document)'ni çıkarmıştır. Mart 2008 tarihinde Avrupa İlaç ve Sağlık Hizmeti Kalite Müdürlüğü [European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM)] olası GS'ler için monografların yenilenmesi ve ayrıntılanmasını konu alan bir belge yayınlamıştır. Aralık 2008 tarihinde ise, İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi [Center for Drug Evaluation and Research (CDER)] endüstri için "İlaç Maddelerinde ve Ürünlerinde Genotoksik ve Karsinojenik Safsızlıklar: Önerilen Yaklaşımlar" isimli özet bir kılavuz çıkarmıştır. Bu kılavuz, GS'lere Gıda ve İlaç Dairesi [Food and Drug Administration (FDA)]'nin yaklaşımı konusunda ilaç üreticileri için bilgilendirmeyi ve ICH kılavuzlarında genotoksik ve karsinojenik safsızlıklar ile ilgili bölümleri birleştirmeyi hedeflemiştir.⁷ 2008 yılında FDA, EMA ile büyük ölçüde örtüşen taslak bir rehber yayınlamıştır.^{5,6} Bu çalışmalara ek olarak, karsinojenik risk olasılığını sınırlamak için 2013 yılında ICH tarafından yayınlanan "Farmasötiklerde DNA Reaktif (Mutajenik) Safsızlıkların Kontrolü ve Değerlendirilmesi" isimli M7 Kılavuzunda (5. Taslak, Yayın tarihi: 28 Mayıs 2015), mutajenik safsızlıkların karsinojenite riskine karşı değerlendirilmelerini ve kontrollerini içeren öneriler bulunmaktadır.^{6,21} DNA-reaktif mutajenik safsızlıkların tanımlanması, sınıflandırılması, niteliği ve kontrolünü içeren bu kılavuzda, benzer yapıda ve benzer etki mekanizmaları olan birden fazla GS bulunduğu yapılmaması gereken toksikolojik değerlendirme için eşik değer [threshold for toxicological concern (TTC)] hesaplamaları konusunda da bilgi sunmaktadır.⁹ Taslak kılavuz, GS'lerin risk yönetiminin önemini de vurgulamaktadır.³ 2014 yılında, EMA tarafından ortak özellikteki farklı tıbbi ürünlerin imalatında risk tanımlamaları için kullanılacak maruziyet düzeylerini tanımlayan kılavuzda, tıbbi farmasötik ürünlerde olduğu gibi veteriner ilaçlar için de PDE ve TTC kavramları hakkında bilgiler verilmiştir.⁸⁸

⁸⁸ EMA, Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities, 20 November 2014.

DÜZENLEYİCİ KURULUŞLARIN GENOTOKSİK SAFSIZLIKLARA GÜNCEL YAKLAŞIMLARI

Pek çok düzenleyici kılavuz, rehber ve belge GS'lerin sınırlamaları ve kontrolüne odaklanmıştır.

AVRUPA İLAÇ AJANSI YAKLAŞIMI

Bu kılavuzlardan ilki olan EMEA kılavuzu (CPMP/SWP/5199/02, EMEA/CHMP/QWP/251344/2006) değerlendirildiğinde, GS'ler ile nasıl başa çıkılacağı konusuna genel bir yaklaşımın sunulduğu görülmektedir. Ancak bu kılavuz, piyasada mevcut olan ürünler için yeni başvuru yapıldığında veya üretim aşamasında değişiklik yapılacak ilaçlar için uygulanabilir. Bu kılavuzun olağan bir durum dışında, geriye dönük olarak ruhsat almış bir ürüne uygulanması gerekmez.⁷ Genel olarak genotoksik maruziyetin herhangi bir dozda DNA'ya hasar verebileceği düşünülse de genotoksik olayların da eşik değer ilişkili bir mekanizması olabileceği ve belli düzeylerde güvenli kabul edilebileceği bildirilmektedir. Aynı zamanda, bazı pozitif genotoksikite test sonuçlarının insan maruziyeti ile ilişkili olmayabileceği de düşünülmektedir.¹² Genotoksik karsinogenlerin kabul edilebilir maruziyet düzeylerinin belirlenebilmesi için olası etki mekanizması ve doz-yanıt ilişkisi önemli bileşenlerdir. EMEA tarafından yayınlanan kılavuzda, GS'lerin eşik değer mekanizması "bilinen ve hakkında yeterli deneysel veri olan" ve "bilinmeyen ve hakkında yeterli deneysel veri olmayan" şeklinde sınıflanmıştır.¹⁰ Bu kılavuzda ayrıca "doğrudan DNA ile reaksiyona giren GS'ler" ile "diğer mekanizmalarla etki gösteren safsızlıklar"ın ayrılması önerilmiştir. İlk grupta yer alan safsızlıklar herhangi bir konsantrasyonda hasar verebileceklerinden, asıl endişe duyulan safsızlıklardır.⁷ Eşik değer ilişkili mekanizması bilinen safsızlıklar için, advers etki görülmeyen düzey (no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) veya etki görülen en düşük düzey (lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) değeri ve güvenlik faktörü ile PDE değerlerinin hesaplanarak, kabul edilebilir maruziyet düzeylerinin belirlenmesi önerilmektedir.^{5,11,12,22} Bu kılavuz, eşik değer ilişkili mekanizması bilinmeyen safsızlıklar için, uygulanabilir en düşük miktar (as

low as reasonably practicable (ALARP) olarak da bilinen, pratik olarak mümkün olabilecek en az düzeye indirilme prensibinin uygulanarak GS'lerin kontrol edilmesini önerir.^{10,11,15} Temel yaklaşım, ilaç maddelerinin sentezi sırasında bu tür safsızlıkların oluşmaması için bütün çabanın sarf edilmesi, ancak mümkün olmuyorsa teknik uğraşlarla (örneğin; saflaştırma basamakları) azaltılmaya çalışılmasıdır. Bu sınıftaki bileşikler DNA ile doğrudan veya dolaylı olarak etkileşen alkilleyici, katım yapan veya serbest radikal oluşturan ajanlardır.¹⁵

Risk değerlendirme aşamasında reaktifler, ara ürünler ve yan ürünler dikkate alınarak üretim esnasındaki olası GS'ler yapısal alarm sistemleri kullanılarak, diğer GS'ler ise toksikolojik veriye dayanarak belirlenir. Olası GS'lerin GS olup olmadığı Ames mutasyon testi veya in vitro kromozomal aberasyon testi ile belirlenir.²¹ Ancak bu testlerin sonuçları pozitif/negatif olduğundan, maruziyet limitlerini belirlemek için kullanılamaz. Test sonucuna göre safsızlığın genotoksik olması durumunda alternatif sentez yolları ile bu safsızlıktan kaçınılmaya çalışılsa da bu ürünlerin kullanılması ve oluşumlarından kaçınılması pek de mümkün değildir. Risk değerlendirmenin bir parçası olan tehlikenin belirlenmesinde, mevcut olan kimyasal maddeye özgü bilgi ile güvenilirlik değerlendirilmesi yapılır. Belirlenen tehlike (doz-yanıt ilişkisi) ve ters etki oluşturmayacak tahmini alım düzeyinin belirlenmesi ile güvenilirlik değerlendirmesi tamamlanır.⁷

Toksikolojik değerlendirme için eşik değer de bu kılavuzda tartışılmıştır. Gıdalarla temas eden materyaller için kullanılan bir yaklaşımdan uyarlanan TTC kavramı, sınırlı veri olduğunda güvenli maruziyeti belirlemek ve desteklemek için denetleme mekanizması olarak geliştirilmiştir. Bu değer, olası genotoksik bir karsinogen için genotoksik olsa bile bu sınırların altında kanser riskini artırmasının göz ardı edilebilir olduğu sınırı ifade eder.^{5,23} 1,5 µg/birey/gün olan TTC sınırı, hayat boyunca (ortalama 70 yaş kabul edildiğinde) kanser riskini 10⁻⁶ kat artırabilen tahmini günlük maruziyet düzeyi olarak tanımlanmıştır.^{18,19} TTC kavramı günlük maruziyet dozu tahminen 1,5 µg/gün olan, genotoksik ve genotoksik olmayan 700'den fazla

karsinojenin kemiricilerde karsinojenik etki analizine dayanan ve ortanca toksik doz (median toxic dose (TD50) değerlerinden yararlanılarak hesaplanan bir kavramdır. Bu öngörüye göre, pek çok genotoksik karsinojen için karsinojenite riski hayat boyu milyonda biri geçmez.^{2,18,23} GS, aflatoksinler veya N-nitröz veya azo bileşikler gibi genotoksik etki gücü yüksek bileşikler sınıfından herhangi birine dâhil ise TTC sınırı olarak en düşük sınır olan 0,5 µg/birey/gün uygulanmalıdır. Bu duruma alternatif olarak, yüksek güçlü genotoksik karsinojenler için bileşiğe özgü risk değerlendirilmesi yapılabileceği de kılavuzda belirtilmiştir.^{7,11}

Birden fazla GS olması, risk analizini daha da karmaşık hâle getirir. TTC kavramı genellikle tek GS'de maruziyet için kabul edilmektedir.²² EMEA Q&A kılavuzu aynı üründe birden fazla GS olduğu durumlar için, eğer bir ilaç maddesinde birden fazla safsızlık varsa ve bunlar yapısal olarak benzer değilse her biri için TTC sınırının uygulanmasını, eğer yapısal olarak benzerse safsızlığın toplamı için 1,5 µg/gün/birey olarak uygulanmasını önermektedir.^{11,***}

FARMASÖTİK ARAŞTIRMA VE ÜRETİM DERNEĞİ YAKLAŞIMI

EMEA yaklaşımında TTC kavramı hayat boyu maruziyet düşünülerek ortaya çıkarılmış, ancak geliştirme aşamasında ilaca maruziyetin daha kısa süreli olduğu durumlarda GS ile nasıl başa çıkılacağı kılavuzda yer almamıştır.¹⁸ TTC kavramı yaşam süresi olarak 70 yıl ile hesaplandığından, daha kısa süreli maruziyetler için PhRMA'nın Genotoksik Safsızlık Görev Birimi (Genotoxic Impurities Task Force) tarafından 2006 yılında yayınlanan çalışmada, klinik çalışma sırasında GS limitini belirlemek için "evrelendirilmiş TTC" kavramını değerlendirmek önerilmektedir.^{5,15,20,23} Bu kavram ile yaşam boyu tedaviden daha kısa süreli durumlar için farklı sınırlamalar hesaplanabilmektedir. Evrelendirilmiş TTC sınırları, 0,15 µg/birey/gün olan TTC değerinden elde edilen lineer ekstrapolasyon kullanılarak hesaplanır. Bu

yüzden evrelendirilmiş TTC sınırı 28 günlük klinik denemeler için 120 µg/gün olarak belirlenirken, bir-üç aylık çalışmalar için 40 µg/gün ve 12 aya kadar olan klinik çalışmalarda ise 20 µg/gün olarak belirlenmiştir. Tedavi sırasında herhangi bir yarar beklentisi olmayan sağlıklı gönüllüler için 0,15 µg/birey/gün sınırının uygulanmasına devam edilebileceği belirtilmiştir.¹⁸ Bu önerilen sınırlar kısa dönem maruziyet (<12 ay) için 10⁻⁶ kat kanser riski öngörülürken, 12 aydan uzun süren klinik çalışmalarda bireylerde endikasyon amaçlandığından ve tedaviden yarar görülebileceğinden EMEA kılavuzları ile de uyumlu bir şekilde 10⁻⁵ kat riske dayanarak hesaplanmıştır.¹⁵ Bu öneri EMEA'nın 2010 yılında yayınladığı Q&A dokümanında da kabul edilmiş ve lineer sapmalar için düzeltme faktörü olarak 2 sayısı belirlenmiştir. Bu yüzden 120 µg tek doz uygulamada kabul edilirken bir, üç ve altı ay uygulama için maruz kalınacak safsızlık sınırları 60, 20 ve 10 µg/birey/gün olarak kabul edilmiştir. Bir yıl süren klinik çalışmalar için, 5 µg/birey/gün, daha uzun süren klinik çalışmalar için ise sınır 1,5 µg/birey/gün olarak kalmıştır.^{†††}

Bu yaklaşımda DNA ile reaksiyona girdiği bilinen bazı alarm veren yapısal fonksiyonel gruplardan da bahsedilmiş ve bu yapılar üç gruba ayrılmıştır. Grup 1: Aromatik gruplar (örneğin; N-hidroksilariller, pürin ve pirimidinler), Grup 2: Alkil ve aril grupları (örneğin; aldehitler, N-nitrözamin, nitro bileşikler, karbamatlar, epoksitler, hidrazinler ve azo bileşikler), Grup 3: Heteroaromatik gruplar (örneğin; Michael-reaktif akseptörler, fosfonatlar veya sülfonatların alkil esterleri, haloalkenler, alkil ve aril-CH₂ gibi primer halojen tuzları).^{4,10} PhRMA, mevcut bilgiler ışığında safsızlıkları risk düzeylerine göre değerlendirerek beşe ayırmıştır.^{5,7,10,13}

■ Kategori 1: Bilimsel yayınlarda en az bir hayvan modelinde karsinojenitesi ile ilgili veri bulunanlar; hem genotoksik (mutajenik) hem karsinojenik olduğu bilinenler en riskli safsızlıklardır.

*** Questions and answers on the "Guideline on the limits of genotoxic impurities", EMEA/CHMP/SWP/431994/2007, Rev.3, 23 September 2010.

††† Questions and answers on the "Guideline on the limits of genotoxic impurities", EMEA/CHMP/SWP/431994/2007, Rev.3, 23 September 2010.

■ Kategori 2: Karsinojenik potansiyeli bilinmeyen mutajenler (Ames testi pozitif, ancak in vivo karsinojenite verisi bulunmayanlar).

■ Kategori 3: Ames testi ile doğrulanmayan ancak yapısal alarm veren bileşikler (ilaç maddesi ile yapısal farklılığı olanlar).

■ Kategori 4: İlaç maddesi ile paylaşılan, yapısal alarm veren bileşikler. İlaç maddesinin genotoksisite özelliği tanımlanabildiğinden safsızlık nitel olarak kabul edilir.

■ Kategori 5: Yapısal alarmı olmayan bileşikler veya genotoksik olmadığı ile ilgili yeterli veri bulunmaz.

Kategori 1'deki bileşiklerin genotoksisite riskleri yüksektir. Bu safsızlıkların üretimden uzaklaştırılması mümkün olmuyorsa buldukları miktarlar için güvenlik sınırları (TTC sınırı) uygulanmalıdır. Kategori 2'deki safsızlıklar için TTC sınırı uygulanabilir veya spesifik toksikolojik risk değerlendirilmesi yapılabilir. Eğer eşik değer ilişkili mekanizma belirlenebilirse PDE hesaplanabilir. Kategori 1 ve 2'deki safsızlıklar reaksiyon koşulları ve sentez basamakları bakımından değerlendirilir ve eğer çıkarılabilirse daha ileri araştırmalara gereksinim duyulmaz. Kategori 3'teki safsızlıklar için de iki seçenek vardır; ya TTC sınırı belirlenir ya da Ames testi ile olası genotoksik etki değerlendirilir. Eğer test pozitif ise safsızlık TTC sınırlarına indirilmeye çalışılır veya daha fazla toksikolojik değerlendirme yapılabilir. Ames testinin negatif olması ise safsızlığın GS risk sınıflandırmasından çıkarılması ve böylece normal üretim ile ilişkili safsızlık olarak kontrol edilmesi ve tanımlanmasını gerektirir. Q3A kılavuzundaki genotoksik olmayan safsızlıklar için yapılacaklar uygulanır ve Kategori 2'deki gibi eğer eşik değer ilişkili mekanizma belirlenebilirse PDE hesaplanabilir. Kategori 4 ve 5'de bulunan bileşikler Q3A kıstaslarına göre genotoksik olmayan safsızlık olarak değerlendirilir. Bu kategorilerdeki safsızlıklar kontrol ve güvenlik kalitesi bakımından uygun görülebilen safsızlıklardır.^{3,5,7}

GIDA VE İLAÇ DAİRESİ YAKLAŞIMI

FDA tarafından ICH Q3 kılavuzuna ek olarak yayınlanan "İlaç Maddeleri ve Ürünlerinde Genotok-

sik ve Karsinojenik Safsızlıklar: Önerilen Yaklaşımlar" kılavuzunda, genotoksik veya karsinojenik potansiyeli olduğundan şüphe edilen safsızlıklar için de öneriler bulunmaktadır. Bu kılavuzda klinik geliştirme ve pazarlama sırasında, lisans ve yeni ilaç başvurularında genotoksik ve karsinojenik safsızlıklar ile ilgili öneriler de yer almaktadır.¹¹ Üretim aşamasında veya formülasyonda bir değişiklik yapılan piyasadaki ilaçlar, ilaçta karsinojenik riski arttıracı değişiklikler olması durumunda (örneğin; yeni endikasyon, doz rejiminin değişmesi veya daha uzun dönem kullanım) ve özel bir endişe oluşan onaylanmış ilaçlar için kılavuzun uygulanabileceği belirtilmiştir.⁷ Bu kılavuzda önerilen yaklaşımlar: 1) GS oluşumundan korunmak, 2) GS sınırlarının düşürülmesi (1,5 µg/gün), 3) Genotoksik ve karsinojenik riskin ek karakterizasyonu ve 4) Safsızlığın özelliklerinin karakterizasyonunu destekleyecek yeni yaklaşımlar için esnek olunabileceğidir.^{4,10}

FDA kılavuzuna göre, bir safsızlığın genotoksik olduğu onaylanırsa veya mevcut veriler bu safsızlığın karsinojenite potansiyelini işaret ediyorsa, bu GS'nin varlığının sınırlanması için tüm olanaklar kullanılmalıdır. İlgili kılavuz, bu çabalara rağmen klinik gelişim aşamasında uygun sınırlara düşürülememesi durumunda, spesifik riskle sınırlandırma yapabilmek için söz konusu safsızlığın genotoksik ve karsinojenik özelliklerini karakterize etmeye devam etmeyi önermektedir. Aynı zamanda safsızlığın belirlenebilmesi için yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesi gerektiğine de kılavuzda vurgu yapılmıştır.⁷ FDA kılavuzunda karsinojenik ve GS'ler için sınırlar değerlendirildiğinde, piyasadaki ürün için TTC (1,5 µg/birey/gün) sınırının kabul edildiği görülmektedir. Bunun yanında, kansere duyarlılıkları daha yüksek olan iki yaşa kadar olan pediatrik grupta düzeltme faktörü 10 ve 2-16 yaş arası çocuklarda düzeltme faktörü 3 olarak belirlenmiştir.^{11,13} Dermal veya oftalmik gibi oral olmayan uygulamalar için de TTC sınırının kullanılabileceği ya da ilgili kurumlar ile iletişime geçilerek daha spesifik bir yaklaşımda bulunulabileceği bildirilmiştir. Birden fazla safsızlık bulunması durumunda, her safsızlığın TTC düzeyinde sınırlandırılmasının kanser riskini azaltabileceğini

garanti edemeyeceği ve özellikle sinerji olasılığı nedeni ile safsızlıkların tümünün bir bütün maruziyet olarak değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir. Klinik geliştirme aşamasında evrelendirilmiş TTC yaklaşımının GS'lerin kontrolünde uygun olduğu ifade edilmektedir. EMEA kılavuzunda bulunan aynı sınırların bu kılavuzda da önerildiği görülmektedir.⁷

TTC sınırları onkoloji ürünlerindeki GS'ler için esnekleştirilmiştir.¹⁰ FDA'nın taslak kılavuzuna göre; 1) Maruziyet 30 günden az ise, 2) Daha güvenli alternatifin olmadığı, hayatı tehdit eden bir durum varlığında, 3) Yaşam beklentisi beş yıldan az ise, 4) Bu GS'ye gıdalar gibi diğer kaynaklarla daha fazla miktarlarda maruz kalınıyorsa, 5) GS önemli bir metabolit ise ve 6) Bazı yetim ilaçları kullanan gruplarda olduğu gibi, eğer hasta popülasyonu küçükse, TTC düzeylerinin üstünde sınırlar uygulanabilir.^{7,10,†††} Antikanser ilaçlarla ilgili düzenleme yapan ICHS9 kılavuzu, ileri evre kanser tedavisinde uygulanan ajanlar için bu sınırların uygun olmadığını, daha yüksek sınırlar için bu durumun düşünülmesi gerektiğini ve GS sınırlarının yüksek olmasının bu tedavi alanında uygun olabileceğini belirtmiştir.^{6,10,§§§}

2015 yılında yeni şekli yayınlanan ICH M7 taslak kılavuzu, piyasadaki bir ürün ile ilgili ilaç maddesinin kimyasal yapısında, üretiminde ve kontrolünde (sentez yolları, reaktifler gibi) değişiklikler yapılacaksa, yıkım ürünleri bakımından yeniden analiz edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Bunun amacı, yapılacak değişikliklerle yeni bir mutajenik safsızlık oluşması veya kabul edilebilir en yüksek düzeyin aşılma durumlarının olup olmamasını belirlemektir. İlaç ürününde ruhsat sonrası (bileşiminde, dozaj formunda değişiklik gibi) değişiklikler ile yeni oluşabilecek mutajenik yıkım ürünü riskinin değişip değişmediği veya daha önce orijinal üründeki mutajenik yıkım ürününün düzeylerinin olası artışı değerlendirilmektedir.³ ICH M7 kılavuzu, risk yönetiminde tehlikenin belir-

lenmesi aşamasında, bilgisayar yöntemlerinin (in silico) ve yapısal mutajenik aktivitenin değerlendirilmesinde bilgisayar algoritmalarının kullanılması için çağrı yapmaktadır. Yapısal alarmların taranmasında uzman bir sistemin ve tamamlayıcı bir istatistiksel modelin birlikte kullanılmasını önermektedir.^{3,24}

GENOTOKSİK SAFSIZLIKLARA ÖRNEKLER

Bazı olası genotoksik yapılara örnek olarak alkil halidler, alkil sülfonatlar gibi alkilleyici ajanlar verilebilir. Bu moleküller genellikle reaktif olarak kullanılır veya kimyasal sentez sırasında oluşabilir. Buna ek olarak aromatik aminler ve nitro bileşikler DNA bazlarına doğrudan bağlanmazlar, ancak metabolik aktivasyon ile DNA bazlarına bağlanıp genotoksik etki gösteren aril nitrenyum iyonları oluştururlar (örneğin; 2-naftilamin). Akriyatlar Michael akseptörleridir ve nükleofilik katımlara duyarlıdır, ancak son veriler, etil akrilatın insanlarda genotoksik olmadığı yönündedir. Epoksitler ve aziridinler halka açılma reaksiyonları ile DNA'yı alkilleyebilirler. Bazı hidroperoksitler DNA da oksidatif hasara neden olabilir ve yıkım ürünleri DNA ile reaksiyona girebilirler. Hidrazinler aynı zamanda GS ve insanlarda olası karsinojen olarak bilinir.⁴ Aktif farmasötik ürünlerin bileşiminde kullanılan reaktiflerin diğerleri de pek çok katım reaksiyonunda kullanılan epoksitler, güçlü azot redükleyici hidrazinler, siklik amin oksit radikali TEMPO, bloklayıcı olarak kullanılan aromatik aminler ve karbon-karbon eşleme reaksiyonlarında kullanılan boronik asittir.⁹

Süstitüye anilinler pek çok ilacın sentezinde kullanılan moleküllerdir. Yaygın kullanımı nedeni ile muhtemel genotoksik etkisi üzerine oldukça fazla araştırma yapılmaktadır. Anilin tek başına Ames negatif sonuç verirken, pek çok süstitüye anilin pozitif sonuç verdiği için mutajenik olarak nitelendirilir. Yapılan çalışmalar, mutajenitenin aromatik halkanın şekli ve büyüklüğü ile nitrenyum iyonunun dayanıklılığından etkilendiğini göstermiştir. Hidrazin yine redükleyici ajan olarak ve hidrazidlerin oluşumunda kullanılan bir moleküldür. Tüberküloz tedavisinde kullanılan izoniazid/hidralazin ve iproniazid gibi pek çok ilacın

††† Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration. Guidance (Draft) for Industry Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches, December 2008.

§§§ICH, Guideline for Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals, S9, Current Step 4 version, 29 September 2009.

sentezinde kullanılır. Ames testinde pozitif sonuç veren hidrazin, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Research on Cancer (IARC) tarafından Grup 2B karsinojen olarak sınıflandırılmıştır. Etilen oksit ise polietilen glikol ve iyonik olmayan sürfaktanların üretiminde kullanılan moleküldür. Ames ve sıçan mikronükleus testinde pozitif sonuç verdiği için hem mutajenik hem de klastojenik olarak nitelendirilmelidir. Bir diğer örnek; resinlerin ve farmasötiklerin üretiminde sentez hareket maddesi olarak kullanılan formaldehittir. Ames testinde mutajenik olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. İn vivo ve in vitro kromozomal hasara neden olduğu gösterilmiştir. Alkil halidler, sentetik kimyada sıklıkla kullanılan bileşiklerdir. Elektrofilik doğaları gereği nükleofilik atağa oldukça duyarlıdır ve DNA gibi doğal bazlara atak yapabilirler. Metil iyodür ve benzil klorür Ames testinde pozitif, n-bütül klorür ise Ames ve in vitro kromozom aberasyon testlerinde negatif sonuç veren ve sıklıkla kullanılan alkil halidlere örnektir.²⁵

Sıklıkla organik çözücülerin pek çoğu ilaç üretim aşamalarında kullanılmaktadır. Bilindiği üzere endüstride yaygın olarak kullanılan benzen, karsinojenitesi nedeni ile pek çok alanda “toluen” ile yer değiştirmiştir. “Toluen”in genotoksitesisi için çalışmalar devam etmektedir. Klorobenzene ait in vitro ve in vivo çalışmalar pozitif genotoksitesite sonuçlarına rağmen, gen mutasyonu, kromozomal aberasyon, DNA hasarı ve in vivo kardeş kromozom değişimi [sister chromosome exchange (SCE)] testlerinde negatif sonuç vermekte ve bu nedenle klorobenzen genotoksik olarak değerlendirilmemektedir. Dimetilformamit kromozomal aberasyon sıklığını artırsa da in vitro ve in vivo genotoksitesite çalışmalarının çoğunda negatif sonuç vermesinden dolayı genotoksik kabul edilmemektedir.⁹

SAFSIZLIKLARIN GENOTOKSİTELERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILABİLECEK VERİ TABANLARI

Olası GS ve bilinen GS'ler, erken klinik geliştirme aşamasında kamuya açık veri veya özel yazılımlarla belirlenebilir. Pek çok maddenin genotoksik ve karsinojenik potansiyelleri “Uluslararası Kanser

Enstitüsü” tarafından yayınlanan teknik raporlarda ve çeşitli veri tabanlarında belirtilmiştir. Başlangıç maddeleri ve ara ürünlerin genotoksitesisi ve karsinojenitesi ile ilgili bilgiler TOXNET (<http://toxnet.nlm.nih.gov>), NIOSH (National Institute for Occupational Safety & Health; <http://www.cdc.gov/niosh>), GESTIS (<http://www.dguv.de/bgia/en/gestis>), NTP (<http://ntp-server.niehs.nih.gov>), ExPub (<http://www.expub.com>), Potency Database (<http://potency.berkeley.edu>), Vitic (Lhasa Ltd., <http://www.lhasalimited.org>) gibi veri tabanlarında bulunmaktadır.^{5,7,26}

Safsızlıkların genotoksitesileri ve karsinojeniteleri, yapı-aktivite ilişkisi analizi [structure-activity relationship (SAR)] ve nicel yapı-aktivite ilişkisi [quantitative- SAR (QSAR)] modelleri kullanılarak “in silico” denilen yöntemlerden elde edilen yapısal alarmlar ile değerlendirilebilir.²¹ Bu değerlendirme mevcut veriler ile yürütülebilir veya sayısal toksikolojik değerlendirmeler ile yapılabilir.¹⁵ DEREK (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge, LHASA Ltd., Leeds, İngiltere; <http://www.chem.leeds.ac.uk/luk/derek>), MCASE (Multi-Computer Automated Structure Evaluation, MultiCASE Inc., Beachwood, Ohio, ABD; <http://www.multicase.com>), ToxTree (Ideacon Ltd, Sofia, Bulgaristan) ve TOPKAT (<http://accelerlys.com/products/topkat>) gibi bilgisayar modelleme programları ise deneysel veri olmadan bileşiklerin karsinojenik ve mutajenik potansiyellerini araştıran ve yapıya dayalı araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bilgisayar modelleme programlarıdır.^{10,13,15,21}

SAFSIZLIKLARIN GENOTOKSİK POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Eğer bir safsızlık yapısal olarak alarm veriyorsa, bu safsızlık biyolojik veya “in silico” testlerde DNA reaktif olup olmadığı kanıtlanana kadar “olası GS” olarak isimlendirilir.^{****} Safsızlığın mevcut veya olası olarak tanımlanmasının ardından bir değerlendirme süreci başlar. “In silico” modellerle alarm veren yapı, çeşitli yazılım sistemleri aracılığı ile

**** Snodin DJ, Elder DP. Genotoxic Impurities Part 2: Toxicological Overview. J Pharm&Biopharm Cont Serv September 2012.

veri tabanlarında taranır. Bu veri tabanlarında herhangi bir bileşiğin ya da bu bileşiğe yapısal olarak benzeyen bir bileşiğin daha önce belirlenmiş genotoksisite verisi araştırılır.^{6,21} Yapısal olarak alarm veren bileşiğin genotoksisitesi bakteriyel mutasyon testleri ve kromozomal hasar için in vitro memeli hücre testleri (metafaz test veya fare lenfoma testi) ile belirlenir. İzole edilen safsızlıklar kullanılarak yapılan çalışmalar bazen yeterli olsa da bu çalışmaların safsızlık içeren yeni ilaç ham maddesi için de yapılabileceği kılavuzlarda bildirilmiştir. Ancak bu yaklaşım, genotoksisite testlerinin, olası GS'leri tespit edebilecek duyarlılıkta olup olmadığı sorunu akla getirmiştir.²

GENOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN TESTLER

Ames testi, mutajenitenin değerlendirilmesinde kullanılan, yapısal alarm sonucu olası GS'lerin genotoksik potansiyelini doğrulamak için yapılan ve anahtar rolü olan bir testtir. EMEA Q&A'ya göre, pozitif Ames test sonucu, TTC sınırlarının uygulanmasını gerektirir. Bu test, genellikle çoğu genotoksik madde için doğru sonuç verir. Ancak örneğin; karbamatlar gibi bu test ile hatalı sonuç verebilecek maddelerin, memeli hücresi mutajenite testi ile değerlendirilmesi gerekir.⁷ Ames testinde kullanılan en bilinen pozitif kontroller 2-aminoantrasen, sodyum azid, 2-nitrofluoren, 9-aminoakridin ve metil metansülfonattır.² Ames testi de dâhil in vitro genotoksik testleri ICHS2(R1) kılavuzunda bulunmaktadır.^{†††}

Ames testinin pozitif sonuç vermesi, söz konusu safsızlığın insanlarda mutajen olduğu anlamına gelmez. ICH S2 (R1) kılavuzunda belirtildiği üzere, belirsizlik durumunda mutajenite için aşağıdaki standart uygulama yapılır:^{11,†††}

Birinci seçenek olarak;

- Bakteriyel ters mutasyon testi ile mutajenitenin değerlendirilmesi,

- Kromozomal hasar için sitogenik test yapılması (in vitro metafaz kromozom aberasyon testi veya in vitro mikronükleus testi) veya in vitro fare lenfoma L51178Y hücre Tk (timidin kinaz) gen mutasyon deneyi (MLA),

- İn vivo genotoksisite testi; genellikle kemirici hematopoietik hücrelerin kullanıldığı kromozom hasar testleri (metafazdaki hücrelerde ya mikronükleus ya da kromozomal aberasyonlar için),

İkinci seçenek olarak;

- Bakteriyel ters mutasyon testi ile mutajenitenin değerlendirilmesi,

- İki farklı doku ile genotoksisitenin in vivo değerlendirilmesi, genellikle biri kemirici hematopoietik hücreleri kullanarak mikronükleus testi ve ikinci bir in vivo test; eğer başka bir doku önerilmediyse genellikle karaciğerde DNA sarmal kırık belirleme deneyi olabilir.^{†††}

Kılavuzlar, in vitro bakteriyel gen mutasyon testi ve in vitro kromozom aberasyon testini minimum görüntüleme tekniği olarak önermişlerdir. Bu genotoksisite testlerine ek olarak, tek türde ve 14-90 gün (genellikle 28 gün ve sıçanlarda yapılan çalışmalar) tekrarlanan doz çalışmaları da tasarlanmalıdır. Safsızlığın sınıfına göre ek testler de gerekebilir.¹¹

Memeli kromozomal hasarının değerlendirilmesinde yaygın olarak MLA kullanılır. Ancak Ames testine kıyasla, bu testin kemirici karsinogenitesi ile korelasyonunun zayıf olduğu gösterilmiştir. MLA testi, DNA hasarından kültür ortamının pH ve/veya ozmolalite değişimlerinin neden olduğu apoptoza kadar pek çok nedenden dolayı yalnızca pozitif sonuç verebilir.^{†††}

Özellikle yıkım sırasında oluşan GS'ler, insanda metabolizma sonucu oluşan önemli bir metabolit olabilir. Bu durumda risk değerlendirmesi metabolizma sonucu oluşan düzeyler dikkate alınarak yapılmalıdır. Eğer üretim veya stabilite kaynaklı oluşan safsızlığın miktarı in vivo oluşan

††† Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration. Guidance (Draft) for Industry Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches, December 2008, p. 13.

††† Snodin DJ, Elder DP. Genotoxic Impurities Part 2: Toxicological Overview. J Pharm&Biopharm Cont Serv September 2012.

miktarından az ise ilaç etken maddesi veya ilaç ürünü ile ilgili belirlenen TTC sınırlarından daha az sıkı kontrol stratejilerinin geliştirilmesi kabul edilmektedir. Ancak, safsızlık bilinen bir metabolit değilse ve pH 1-8 gibi enzimatik olmayan hidrolitik ortamlarda oluşuyorsa, fizyolojik koşullarda gastrointestinal sistemde oluşma olasılığı da düşünülmelidir.⁶

Safsızlıklarla ilgili son 10 yıldır ilaç endüstrisinde yaşanan endişeler, ilaç yardımcı madde üreticilerini de etkilemiştir. Mevcut kılavuzların yardımcı maddelere uygulanmasının da olası olduğu bildirilse bile, pek çok ilacın üretiminde sorun çıkabileceği düşünülmektedir. Amerika Uluslararası İlaç Yardımcı Maddeler Konseyi [The International Pharmaceutical Excipients Council of the Americas (IPEC)] bu kılavuzların neden yardımcı maddelere uygulanmaması gerektiğini açıklayan bir makale yayınlamıştır.¹⁸

Ters etkilerin zaman zaman görülmesine ve bu konudaki istenmeyen klinik deneyimlere rağmen, geniş bir popülasyon tarafından kullanılan bitkisel ilaç ürünlerindeki olası safsızlıklar konusunda da tartışmalar bulunmaktadır.¹⁸ 2006 yılında EMEA'nın Bitkisel İlaç Ürünleri Komitesi [Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), EMEA], bitkisel maddeler ve bunların hazırlanışlarında genotoksik bileşenlerin değerlendirilmesi için kılavuz geliştirilmesini öneren bir makale yayınlamıştır.^{§§§§}

GENOTOKSİK SAFSIZLIKLARIN FARMASÖTİK ÜRÜNLERDE ANALİZİ VE KULLANILAN YÖNTEMLER

TTC sınırı göz önünde bulundurulduğunda ve günlük dozu 100 mg'dan 1 g'a kadar olan ilaçlar için GS'nin sınırı 1,5-15 ppm arasında değişir. Bu değer ICH'nin belirlediği safsızlık sınırlarından neredeyse 500 kat daha düşüktür ve belirlenmeleri için analitik yöntem geliştirilmesinde sorun oluşturmaktadır.¹⁸ FDA'nın pediatrik ürünlerde

artırdığı güvenlik faktörleri, zaten çok düşük olan sınırları daha da azaltarak analitik ek sorunlara neden olmaktadır.¹³ Mevcut konvansiyonel sıvı kromatografilerinin 1-10 ppm arası duyarlılıkta ölçüm yapabildiği de göz önünde bulundurulduğunda, nicel olarak belirlemelerin zorluğu daha artmaktadır. Bu düzeylerde analitik ölçümler yapabilmek için sadece hassas cihazlar değil aynı zamanda seçicilik de önemlidir. Aktif farmasötik bileşiğin büyük bir kısmı düşük düzey safsızlıklar ile etkileşebilir. Üstelik tüm olası GS'leri tek bir analitik yöntem ile belirlemek de mümkün değildir; çünkü bu maddeler farklı fonksiyonel grupları yapılarında bulundurmaktadır. Ek olarak, bu safsızlıkların kendi doğaları gereği oldukça reaktif olmaları ekstraksiyon, örnek hazırlama veya analiz sırasında reaksiyona girmelerine ve yanlış sonuçlara neden olabilir. Aynı zamanda bazı GS'ler hafif uçucudur ve bu nedenle örnek hazırlama sırasında kaybolabilirler. Mutlaka GS'nin doğası ve niceliği araştırılarak uygun analitik yöntemler seçilmelidir.⁴ Farmasötiklerde düşük düzeylerdeki GS'lerin belirlenmelerinde karşılaşılan sorunları üç başlık altında toplamak mümkündür; farklı yapılarda olmaları ve farklı analitik yaklaşım gerektirmeleri, pek çok analitin dayanıklı olmaması veya doğada kimyasal olarak aktif olması nedeni ile özel elde etme teknikleri gerektirmesi ve GS analitleri ile birlikte yüksek düzeylerde aktif farmasötik ürün bulunmasının analizlerde girişimlere neden olması, aynı zamanda bazı bilinen veya bilinmeyen safsızlıkların neden olduğu girişimler.¹³

Yüksek duyarlılık nedeni ile bu alanda ppb düzeyinde ölçüm yapabilen kütle spektrofotometri tekniklerine gereksinim artmıştır. Kütle spektrofotometrelerinde girişim oldukça azdır. Ancak, insan maruziyetinin çok düşük olduğu durumlarda, maliyet/yarar açısından değerlendirildiğinde bu cihazların rutin olarak kullanımı uygun değildir. Eşik değer mekanizması bilinmeyen GS'lerin kontrolü bu nedenle daha zordur.^{4,12}

Safsızlığın uçucu olup olmamasına göre farklı analitik teknikler önerilmektedir. UV dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-UV) uçucu olmayan safsızlıklar için ilk olarak ter-

§§§§ Concept paper on the development of a guideline on the assessment of genotoxic constituents in herbal substances/preparations, EMEA/HMPC/413271/2006, 26 October 2006.

cih edilebilecek tekniktir. Ancak, eser düzeylerdeki safsızlıklar için yeterince hassas değildir. Eğer safsızlık yetersiz UV yanıt veriyorsa, UV-dedektör duyarlılığı daha iyi olduğundan ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) veya ultrahızlı sıvı kromatografisi (ultrafast-LC) tercih edilebilir. Eğer safsızlığın kromofor grupları yok ise refraktif (kırılma) indeks dedektörleri veya floresan dedektörler kullanılabilir. Son yıllarda, safsızlıkların belirlenmesi için birleştirilmiş tekniklerin kullanımını önerilmektedir. Ölçümlerde hassasiyetin artması ve ölçüm sürelerinin kısalması nedeni ile kütle spektrometresi-gaz kromatografisi (MS-GC) ve HPLC/UHPLC ile birleştirilmesi safsızlıkların belirlenmesi ve karakterizasyonu için tercih edilmektedir.⁴ Tüm bunlara rağmen, ppm düzeyinde GS'lerin saptanması için, duyarlılığı yüksek analitik yöntemlerin geliştirilmesi konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Uygun analitik yöntemler sadece hastaların güvenliğini sağlamak için değil aynı zamanda güçlü üretim sürecinin geliştirilmesi için de önemlidir. LC/MS ve GC/MS gibi daha gelişmiş analitik sistemler kullanılarak daha hızlı veri elde edilmeye ve örnek matriksi ile etkileşimlerden kaynaklanan sorunlar en aza indirilerek hassasiyet artırılmaya çalışılmaktadır. Aynı zamanda klinik çalışmalarla hızla değişen doz ve süre nedeni ile sınırların hızla değişebilmesi bu tekniklerin tercih nedenidir.¹³

P-nitrofenolün bir safsızlık olarak genotoksik ve karsinojenik etkisi, alkil ve benzil halidelerin aktif farmasötik üründe belirlenmesi, üretim aşamasında oluşan pazopanib hidroklorürün analizi, pantoprazolde bulunabilen genotoksik bir safsızlık olan 2-klorometil-3,4-dimetoksipiridin için yöntem geliştirmelerine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır.²⁷⁻³⁰

SONUÇ

Yeni bir ilacın piyasaya sürülmesinin amacı; belirli bir hastalığı önlemek, teşhis etmek veya tedavi etmek ve böylece hastanın yaşam sürecini uzatmak veya yaşam kalitesini iyileştirmektir. Bu nedenle ilaç geliştirme sürecinde etkinlik ve güvenlik hedef alınan esas noktalar. Aktif farmasötik bileşenlerdeki GS'lerin öngörülmesinde, kontrolünde ve belirlenmelerinde toksikologlar, farmasötik kimya ve analitik kimya alanında uzmanlar çok-merkezli iş birlikleri yapmalıdır. Bu işbirliği ile risk öngörülmesi, genotoksisite ile ilgili yapılar tanımlanmalı, aktif farmasötik bileşenlerdeki safsızlıklar ile ilgili bilgiler ortaya konmalı ve insan maruziyet değerlendirmesinin yönetilmesi için gerekli veri sağlanmalıdır. Mevcut kılavuzlarla düzenleyici mekanizmaların tüm çabalarına rağmen, yeni ilaç üretiminde GS'ler hâlen tartışma konusudur. GS'ler ile ilgili başarılı araştırmalar, güvenli ve yararlı ilaç ürünleri ile sonuçlanmasında önemlidir.

KAYNAKLAR

- Zhu Q, Li T, Wei X, Li J, Wang W. In silico and in vitro genotoxicity evaluation of descarboxyl levofloxacin, an impurity in levofloxacin. *Drug Chem Toxicol* 2014;37(3):311-5.
- Jacobson-Kram D, Jacobs A. Use of genotoxicity data to positive genotox findings on or impurity Now what? *Int J Toxicol* 2005;24(3):129-34.
- Melo SR, Homem-de-Mello M, Silveira D, Simeoni LA. Advice on degradation products in pharmaceuticals: a toxicological evaluation. *PDA J Pharm Sci Technol* 2014;68(3):221-38.
- Reddy AV, Jaafar J, Umar K, Majid ZA, Aris AB, Talib J, et al. Identification, control strategies, and analytical approaches for the determination of potential genotoxic impurities in pharmaceuticals: a comprehensive review. *J Sep Sci* 2015;38(5):764-79.
- Bercu JP, Dobo KL, Gocke E, McGovern TJ. Overview of genotoxic impurities in pharmaceutical development. *Int J Toxicol* 2009;28(6):468-78.
- Dow LK, Hansen MM, Pack BW, Page TJ, Baertschi SW. The assessment of impurities for genotoxic potential and subsequent control in drug substance and drug product. *J Pharm Sci* 2013;102(5):1404-18.
- Giordani A, Kobel W, Gally HU. Overall impact of the regulatory requirements for genotoxic impurities on the drug development process. *Eur J Pharm Sci* 2011;43(1-2):1-15.
- Erkekoğlu P, Baydar T, Şahin G. [Pharmaceutical impurities from toxicological perspective: review]. *Turkiye Klinikleri J Pharm Sci* 2014;3(2):65-73.
- Szekely G, Amores de Sousa MC, Gil M, Castelo Ferreira F, Heggie W. Genotoxic impurities in pharmaceutical manufacturing: sources, regulations, and mitigation. *Chem Rev* 2015;115(16):8182-229.
- Raman NV, Prasad AV, Ratnakar Reddy K. Strategies for the identification, control and determination of genotoxic impurities in drug substances: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal* 2011;55(4):662-7.
- Cok I, Emerce E. Overview of impurities in pharmaceuticals: toxicological aspects. *Asian Chem Lett* 2012;16(1):87-97.

12. Kirkland D, Snodin D. Setting limits for genotoxic impurities in drug substances: threshold-based and pragmatic approaches. *Int J Pharm Med* 2004;18(4):197-207.
13. Liu DQ, Sun M, Kord AS. Recent advances in trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities. *J Pharm Biomed Anal* 2010;51(5):999-1014.
14. Leblanc B, Charuel C, Ku W, Ogilvie R. Acceptability of low levels of genotoxic impurities in new drug substances. *Int J Pharm Med* 2004;18(4):215-20.
15. McGovern T, Jacobson-Kram D. Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 2006;25(8):790-5.
16. Jacobson-Kram D, McGovern T. Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59(1):38-42.
17. Kenyon MO, Cheung JR, Dobo KL, Ku WW. An evaluation of the sensitivity of the Ames assay to discern low-level mutagenic impurities. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007;48(1):75-86.
18. Humfrey CD. Recent developments in the risk assessment of potentially genotoxic impurities in pharmaceutical drug substances. *Toxicol Sci* 2007;100(1):24-8.
19. Kasper P, Kirkland D, Leblanc B, Sjöberg P, Spindler P. Acceptability of low levels of genotoxic impurities in new drug substances. *Int J Pharm Med* 2004;18(4):221-3.
20. Müller L, Mauthe RJ, Riley CM, Andino MM, Antonis DD, Beels C, et al. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 2006;44(3):198-211.
21. Sutter A, Amberg A, Boyer S, Brigo A, Contrera JF, Custer LL, et al. Use of in silico systems and expert knowledge for structure-based assessment of potentially mutagenic impurities. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013;67(1):39-52.
22. Bercu JP, Hoffman WP, Lee C, Ness DK. Quantitative assessment of cumulative carcinogenic risk for multiple genotoxic impurities in a new drug substance. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008;51(3):270-7.
23. Delaney EJ. An impact analysis of the application of the threshold of toxicological concern concept to pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007;49(2):107-24.
24. Greene N, Dobo KL, Kenyon MO, Cheung J, Munzner J, Sobol Z, et al. A practical application of two in silico systems for identification of potentially mutagenic impurities. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015;72(2):335-49.
25. Teasdale A, Humfrey C. Compound-specific risk assessments for genotoxic impurities: examples and issues. In: Teasdale A, ed. *Genotoxic Impurities-Strategies for Identification and Control*. Chapt. 5. 1st ed. Canada: Wiley; 2010. p.121-67.
26. Dobo KL, Greene N, Fred C, Glowienke S, Harvey JS, Hasselgren C, et al. In silico methods combined with expert knowledge rule out mutagenic potential of pharmaceutical impurities: an industry survey. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012;62(3):449-55.
27. Eichenbaum G, Johnson M, Kirkland D, O'Neill P, Stellar S, Bielawne J, et al. Assessment of the genotoxic and carcinogenic risks of p-nitrophenol when it is present as an impurity in a drug product. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009;55(1):33-42.
28. Elder DP, Lipczynski AM, Teasdale A. Control and analysis of alkyl and benzyl halides and other related reactive organohalides as potential genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients (APIs). *J Pharm Biomed Anal* 2008;48(3):497-507.
29. Liu DQ, Chen TK, McGuire MA, Kord AS. Analytical control of genotoxic impurities in the pazopanib hydrochloride manufacturing process. *J Pharm Biomed Anal* 2009;50(2):144-50.
30. Venugopal N, Bhaskar Reddy AV, Gangadhar Reddy K, Madhavi V, Madhavi G. Method development and validation study for quantitative determination of 2-chloromethyl-3,4-dimethoxy pyridine hydrochloride a genotoxic impurity in pantoprazole active pharmaceutical ingredient (API) by LC/MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2012;70:592-7.