


Leki przeciwnadciśnieniowe a skażenie rakotwórczymi nitrozoaminami

The antihypertensive drugs and contamination with carcinogenic nitrosamines

Jan Tatarkiewicz, Magdalena Bujalska-Zadrozny 

Zakład Farmakodynamiki Centrum Badań Przedklinicznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Pod koniec czerwca 2018 roku w niektórych lekach z grupy antagonistów receptora AT_1 dla angiotensyny II (sartanów) stosowanych w nadciśnieniu tętniczym wykryto niewielkie ilości silnie rakotwórczego zanieczyszczenia N-nitrozodimetyloaminą (NDMA) z grupy N-nitrozoamin. Do lipca 2019 roku zidentyfikowano łącznie cztery N-nitrozoaminy stanowiące zanieczyszczenia sartanów – NDMA, N-nitrozodietiloaminę, N-nitrozodiiizopropiloaminę oraz kwas N-nitrozo-N-metylo-4-aminomasłowy, a także siedmiu wytwórców trzech skażonych substancji czynnych (walsartanu, losartanu, irbesartanu) pochodzących z Chin, Indii oraz Meksyku. Związki te przedostawały się do produktów leczniczych prawdopodobnie wskutek nieprzemyślanych modyfikacji syntezy. Liczbę osób, którym przepisano sam skażony walsartan, w skali światowej szacuje się na około 20 milionów.

W pracy omówiono miejsce sartanów w leczeniu w kontekście fizjologicznego znaczenia układu renina–angiotensyna–aldosteron oraz rolę ugrupowania tetrazolowego w mechanizmie ich działania receptorowego. Scharakteryzowano syntezę ugrupowania tetrazolowego oraz jej modyfikacje jako możliwe przyczyny pojawienia się zanieczyszczeń nitrozoaminowych w sartanach. Pokróćce przedstawiono także toksykologiczne właściwości nitrozoamin. Fakt, że związki te przedostawały się do leków przez co najmniej 5 lat niewykryte i bez wiedzy organów odpowiedzialnych za bezpieczeństwo leków, obnażył rażąco niedostosowanie do rzeczywistości systemu mającego gwarantować bezpieczeństwo produktów leczniczych. Dlatego „afery walsartanowa” wymusiła zmiany niektórych regulacji dotyczących leków, zwłaszcza wymagania dotyczące procedur analitycznych.

Słowa kluczowe: sartany, zanieczyszczenia substancji czynnych leków, nitrozoaminy, chemizm pochodnych tetrazolu

Folia Cardiologica 2019; 14, 6: 556–563

Wstęp

W lipcu 2018 roku opinię publiczną na całym świecie poruszył fakt wykrycia w niektórych lekach z grupy sartanów, stosowanych w nadciśnieniu tętniczym, czyli antagonistach receptora AT_1 dla angiotensyny II (ARB, *angiotensin II receptor AT_1 blockers*), niewielkich ilości potencjalnie silnie rakotwórczych zanieczyszczeń substancjami z grupy N-nitrozoamin. Związki te przedostawały się do produktów

leczniczych przez co najmniej 5 lat bez wiedzy organów i instytucji odpowiedzialnych za bezpieczeństwo leków, a liczbę osób, którym przepisano sam skażony walsartan, w skali światowej w styczniu 2019 roku szacowano na około 20 milionów [1]. U podstaw problemu pozostawała nieprzemyślana modyfikacja procesu syntezy tak zwanego pierścienia tetrazolowego, elementu cząsteczki większości sartanów, który tworzy się na jednym z ostatnich etapów syntezy. W następstwie w kilkudziesięciu krajach wiele serii

sartanów wycofano z rynku, a w firmach wytwarzających zarówno leki, jak i ich substancje czynne zarządzano kontrole. Skutki tych zdarzeń trwają do tej pory, zarówno w formie analiz służących ocenie rzeczywistych rozmiarów samego zjawiska oraz liczby potencjalnie poszkodowanych osób, jak i prób ustalenia przyczyn zaistnienia wspomnianych faktów [2–5].

W niniejszym artykule omówiono prawdopodobne chemiczne mechanizmy powstawania zanieczyszczeń N-nitrozoaminami, ich aspekt toksykologiczny oraz analityczny, a także przedstawiono niezbędne dla rozumienia tła sprawy podstawy farmakologiczne i fizjologiczne.

Wykryte N-nitrozoaminy, zanieczyszczone substancje czynne i ich wytwórcy

W czerwcu 2018 roku do amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) wpłynęła informacja, że firma *Prinston Pharmaceuticals Inc., dba Solco Healthcare LLC*. (Stany Zjednoczone) przerwała wytwarzanie leków zawierających walsartan, ponieważ w substancji czynnej kupowanej od jednego z jej producentów – *Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd.* (ZHP, Chiny) – wykryto śladowe ilości N-nitrozodimetyloaminy (NDMA, *N-nitrosodimethylamine*). 17 lipca 2018 roku *Prinston* dobrowolnie wycofała wszystkie swoje preparaty walsartanu z rynku [6, 7]. W tym samym miesiącu także władze Unii Europejskiej (UE) poinformowano, że ZHP wykrył obecność uprzednio niewykrywanego zanieczyszczenia technologicznego NDMA w farmaceutycznej substancji czynnej (API, *active pharmaceutical ingredient*) – walsartanie wytwarzanym w fabryce w Chuannan (Chiny) [8]. Wykrycie NDMA w walsartanie zapoczątkowało tak zwaną aferę walsartanową i spowodowało, że przeprowadzane w wielu państwach kontrole objęły stopniowo nie tylko kolejne partie tego leku (z których ogromne ilości – także preparatów skojarzonych – wycofano w kilkudziesięciu państwach [3]), ale także obecne na rynku preparaty innych sartanów oraz samych dostawców API, ponieważ odpowiednie władze uznały za konieczną dokładną kontrolę wszystkich substancji powstających w trakcie syntezy. W następstwie w dość krótkim czasie w kilku innych sartanach wykryto związki z grupy nitrozoamin – poza wymienioną NDMA także N-nitrozodietylaminę (NDEA, *N-nitrosodiethylamine*), N-nitrozodiiizopropylaminę (NDIPA, *N-nitrosodiisopropylamine*) oraz kwas N-nitrozo-N-metylo-4-aminomasłowy (NMBA, *N-nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid*). Fala wycofań narosła, a lista wytwórców skażonych API rozszerzyła się do siedmiu pochodzących z trzech państw. Umieszczenie i źródła zanieczyszczeń API przedstawiono w tabeli 1.

Znaczenie sartanów w leczeniu domaga się przedstawienia fizjologicznych i farmakologicznych podstaw ich działania.

Fizjologiczne znaczenie układu renina–angiotensyna–aldosteron oraz oddziaływanie sartanów na ten układ

Jednym z ważniejszych układów ustroju kontrolujących napięcie mięśni gładkich naczyń oraz gospodarkę wodno-elektrolitową organizmu (a więc m.in. ciśnienie tętnicze) jest układ hormonalno-enzymatyczny renina–angiotensyna–aldosteron (RAAS, *renin–angiotensin–aldosterone system*) aktywowany przez hormon nerkowy – reninę. Nasiloną aktywność RAAS powoduje zwiększenie napięcia mięśni gładkich naczyń tętniczych oraz zmniejszenie wydalania jonu sodowego (Na^+) i wody z moczem, z równoczesnym zwiększeniem wydalania jonu potasowego (K^+); oba te zjawiska wywołują podwyższenie ciśnienia tętniczego [9, 10].

Kluczowym elementem RAAS podwyższającym ciśnienie tętnicze jest oktapeptyd angiotensyna II (Ang II), która wywiera to działanie głównie poprzez stymulację swoistych receptorów angiotensynowych typu 1 (w skrócie AT_1R [*angiotensin II type 1 receptor*]). Zrozumienie roli Ang II w regulacji czynności układu sercowo-naczyniowego (CVS, *cardiovascular system*) doprowadziło do poszukiwania syntetycznych związków wiążących się silnie z AT_1R o znaczącym stopniu podobieństwa strukturalnego do Ang II, jednak pozbawionych działania agonistycznego. Wobec niepowodzenia początkowych prób opracowania leków o strukturze peptydowej wysiłki badaczy skupiły się na związkach zawierających kilka połączonych w różny sposób pierścieni, których struktura w płynach ustrojowych w wystarczającym stopniu odzwierciedlała układ przestrzenny aminokwasów Ang II. W następstwie doszło do wynalezienia losartanu (na rynku od 1994 r.), a potem innych stosowanych klinicznie niepeptydowych antagonistów AT_1R (potocznie zwanych sartanami). Obecnie znanych jest przynajmniej kilkanaście sartanów, w tym dostępne także w Polsce/UE azilsartan, eprosartan, irbesartan, kandesartan, losartan, olmesartan, telmisartan i walsartan. Związki te mają kilka zastosowań klinicznych – wszystkie stosuje się do obniżania ciśnienia tętniczego w nadciśnieniu tętniczym (AH, *artery hypertension*), natomiast niektóre z nich zostały dopuszczone także na przykład w leczeniu niewydolności serca (HF, *heart failure*)/zaburzonej czynności skurczowej lewej komory, leczeniu współistniejącej choroby nerek u chorych na AH i cukrzycę typu 2, a także zapobieganiu udarom mózgu u dorosłych z AH. Będący głównym przedmiotem niniejszego artykułu walsartan stosuje się w Polsce w leczeniu samoistnego AH, niektórych przypadków objawowej HF u dorosłych oraz bezobjawowej niewydolności skurczowej lewej komory po niedawno przeżytym zawale serca. Obecnie istnieje znaczący trend do rozszerzania listy wskazań do podawania sartanów także poza choroby CVS [11].

Tabela 1. Wykaz zanieczyszczonych sartanów z uwzględnieniem producentów leków zanieczyszczonych farmaceutyczną substancją czynną (API, *active pharmaceutical ingredient*) oraz czasu ujawniania kolejnych zanieczyszczeń

Sartan (lub jego prep. skojarzony)	Zanieczyszczenie	Nazwa i kraj wytwórcy skażonej API	Instytucja raportująca problem	Data* raportowania zanieczyszczenia, źródła*** piśm.
Walsartan	NDMA	ZHP, Chiny	US FDA	Czerwiec 2018 [6, 7]
			EMA za ZHP	Czerwiec 2018 [8]
		ZTP, Chiny	EMA, EDQM**	10.08.2018 [a]–28.08.2018 [b]
		ZChP, Chiny	EDQM**	28.08.2018 [b]
		Hetero Labs, Indie	EDQM**	28.08.2018 [b]
Walsartan	NDEA	ZHP, Chiny	US FDA	20.12.2018 [c]
			EMA, US FDA	13.09.2018 [d, e]
		Mylan, Indie	EMA, EDQM**	19.11.2018 [f, g]
		Aurobindo, Indie	EDQM**	Przed 24.12.2018 [i]
			US FDA	2.01.2019 [j]
Walsartan	NDIPA	Signa S.A., Meksyk	TGA, EDQM**	18.12.2018 TGA [i, k]
Irbesartan	NDEA	Aurobindo, Indie	EDQM**	Przed 8.10.2018 [l]
			EMA, US FDA	15.10.2018 [m]–30.10.2018 [n]
Losartan (sól potasowa)	NDEA	ZHP, Chiny	EDQM**, FDA	18.01.2019 [o, p]
			US FDA	9.11.2018 [r]
		Hetero Labs, Indie	EDQM**	18.01.2019 [o]
			EMA, US FDA	Przed 17.10.2018 [l] Przed 21.09.2018 [s] 25.02.2019 [t]
Losartan K ⁺	NMBA	Hetero Labs, Indie	EDQM**, FDA	4.02.2019 [u]–28.02.2019 [w]

*Pierwsze ujawnienie przez agencję lekową danego zanieczyszczenia w ogóle albo pierwsze ujawnienie zanieczyszczenia od danego dostawcy API. Ze względu na rozbieżności danych z piśmiennictwa podane daty należy traktować jako przybliżone; **w przypadkach monitorowanych przez Europejską Dyрекcyję Jakości Leków i Opieki Zdrowotnej (EDQM, *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare*) organizacja ta bezwzględnie zawieszła producentom tzw. świadectwa zgodności (z wymogami Farmakopei Europejskiej [CEP, *certificate of suitability*]); do połowy maja 2019 r. zawieszono w ten sposób 11 CEP; ***ze względu na znaczną objętość pochodzących z Internetu cytowań materiałów amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (US FDA, *Food and Drug Administration*), Europejskiej Agencji Leków (EMA, *European Medicines Agency*), EDQM itp. agencji, te z nich, które występują tylko w tabeli 1, wyodrębniono w osobny plik uzupełniający (dostępny *on-line*). Odesłania do tych cytowań piśmiennictwa w celu odróżnienia oznaczono powyżej kolejnymi literami alfabetu w nawiasach kwadratowych w kolejności występowania w tabeli; Aurobindo – *Aurobindo Pharma Limited* (Indie); Hetero Labs – *Hetero Labs Limited* (Indie); K⁺ – jon potasowy; Mylan – *Mylan Laboratories Ltd.* (Indie); NDEA (*N-nitrosodietylamina*) – N-nitrozodietylamina; NDIPA (*N-nitrosodiosopropylamina*) – N-nitrozodiosopropylamina; NDMA (*N-nitrosodimetylamina*) – N-nitrozodimetylamina; NMBA (*N-nitroso-N-metyl-4-aminobutyryc acid*) – kwas N-nitroso-N-metylo-4-aminomasłowy; Signa S.A. – *Signa S.A. de C.V.* (Toluca, Meksyk, członek *Apotex Pharmachem Group*); TGA (*The Therapeutic Goods Administration*) – Urząd ds. Artykułów Terapeutycznych (Australia); US (*United States*) – Stany Zjednoczone; ZChP – *Zhejiang Changming Pharmaceutical Co., Ltd.* (Chiny); ZHP – *Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd.* (Chiny); ZTP – *Zhejiang Tianyu Pharmaceutical Co., Ltd.* (Chiny)

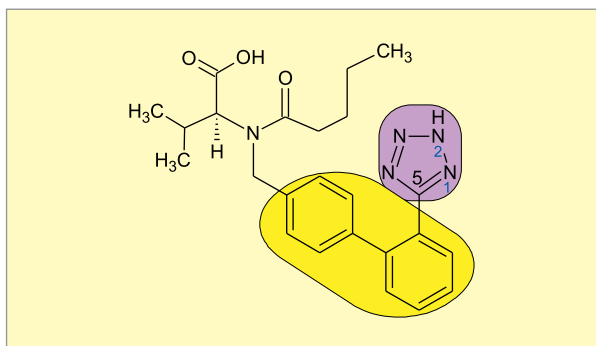
Elementy strukturalne sartanów a ich wiązanie z receptorem

W celu zapewnienia działania ARB na poziomie cząsteczkowym, tj. łączenia się z AT₁R oraz jego blokowania, do cząsteczek większości wykorzystywanych w leczeniu sartanów wprowadzono kilka podstawowych grup funkcyjnych, z których najważniejsze znaczenie mają trzy: stanowiące oś cząsteczki ugrupowanie bifenylo-metylowe (z wymienionej ósemki nie ma go jedynie eprosartan), pierścień imidazolowy (brak go jedynie w cząsteczce walsartanu) oraz podstawione w pozycji 5 aromatyczne ugrupowanie 1H-tetrazolowe lub 2H-tetrazolowe [12]. Wymienione trzy ugrupowania wiążą się z różnymi domenami AT₁R [13]. Kluczowe znaczenie wydaje się mieć ugrupowanie tetrazolowe,

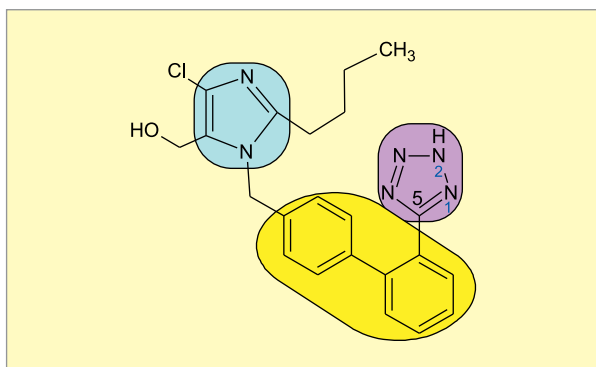
ponieważ jego obecność jest szczególnie istotna dla wywierania przez sartany działania antagonistycznego wobec receptora AT₁ [13]. Ugrupowanie tetrazolowe występuje w pięciu (irbesartan, kandesartan, losartan, olmesartan, walsartan) z ośmiu powszechnie dystrybuowanych na światowym rynku sartanów [12].

Budowa ugrupowania tetrazolowego i jego lokalizacja w strukturze sartanów

Omówione wyżej grupy funkcyjne zapewniające działanie sartanów na poziomie molekularnym zaznaczono na rycinie 1 przedstawiającej budowę cząsteczki walsartanu oraz na rycinie 2 przedstawiającej wzór strukturalny pierwszego chronologicznie sartanu, czyli losartanu.



Rycina 1. Wzór strukturalny walsartanu, czyli N-(1-oksopentyl)-N-[[2'-(2H-tetrazol-5-yl)[1,1'-bifeno]-4-yl]metylo]-L-waliny (nazwa wg *International Union of Pure and Applied Chemistry* [IUPAC]: kwas (S)-3-metylo-2-(N-[[2'-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)bifeno]-4-yl]metylo]pentanamido)butanowy). Grupy funkcyjne zapewniające działanie antagonisty receptora AT_1 dla angiotensyny II (ARB, *angiotensin II receptor AT_1 blocker*) na poziomie cząsteczkowym umieszczono na kolorowych tłach; ugrupowanie bifeno-4-metylowe – na ciemnożółtym tle, podstawione w pozycji 5 aromatyczne ugrupowanie 2H-tetrazolowe – na tle ciemnoniebieskim. Podano numerację atomów tylko najbardziej istotnych z punktu widzenia zagadnień omawianych w tekście



Rycina 2. Wzór strukturalny losartanu, czyli (2-butyl-4-chloro-1-[[2'-(2H-tetrazol-5-yl)bifeno]-4-yl]metylo]-1H-imidazol-5-yl)metanolu (nazwa wg *International Union of Pure and Applied Chemistry* [IUPAC]). Grupy funkcyjne zapewniające działanie antagonisty receptora AT_1 dla angiotensyny II (ARB, *angiotensin II receptor AT_1 blocker*) na poziomie cząsteczkowym umieszczono na kolorowych tłach; ugrupowanie bifeno-4-metylowe – na ciemnożółtym tle, pierścień imidazolowy – na jasnoniebieskim tle, podstawione w pozycji 5 aromatyczne ugrupowanie 2H-tetrazolowe – na tle ciemnoniebieskim. Podano numerację atomów tylko najbardziej istotnych z punktu widzenia zagadnień omawianych w tekście

W cząsteczce walsartanu pierścień imidazolowy został zastąpiony acylovaną cząsteczką waliny.

Synteza ugrupowania tetrazolowego

Istnieje wiele dróg syntezy sartanów [14–16], zaś przyjęta metoda rzutuje na możliwość powstania niebezpiecznych

produktów ubocznych. Dla zrozumienia procesu powstawania zanieczyszczeń N-nitrozoaminowych w sartanach kluczowe znaczenie ma przedstawienie syntezy pierścienia tetrazolowego, gdyż to ona stanowi etap, na którym może dojść do generowania N-nitrozoamin. Przy syntezie pierścienia tetrazolowego obecnego w cząsteczkach sartanów korzysta się z ogólnej zasady, zgodnie z którą nityle ($R-CN$, czyli organiczne pochodne cyjanowodoru [HCN]) przy wykorzystaniu różnych metod mogą reagować z niektórymi azydkami (pochodne azydku wodoru, inaczej azotowodoru, HN_3) organicznymi lub nieorganicznymi z wytworzeniem pochodnych tetrazolu.

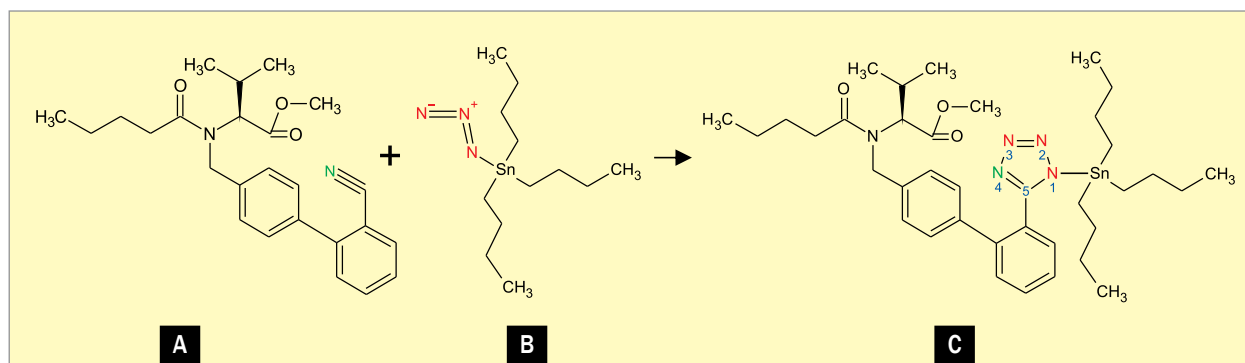
Jedną z najczęściej stosowanych w syntezie sartanów (w tym walsartanu) reakcji syntezy pierścienia tetrazolowego jest reakcja wykorzystująca jeden z azydków organicznych tj. azydo(n-tributylo)stannan albo azydek tri(n-butylo) cyny (potocznie zwany azydkiem tributylocyny) [17]. Polega ona na przyłączeniu azydku tributylocyny (ryc. 3B) do produktu przejściowego syntezy walsartanu, czyli związku nitylowego (ryc. 3A) z wytworzeniem związku stannylotetrazolowego (ryc. 3C) [18].

Po przeprowadzeniu powyższej reakcji pozostaje już tylko hydroliza wytworzonego związku stannylotetrazolowego (ryc. 3C) i otrzymanie właściwej substancji leczniczej – walsartanu.

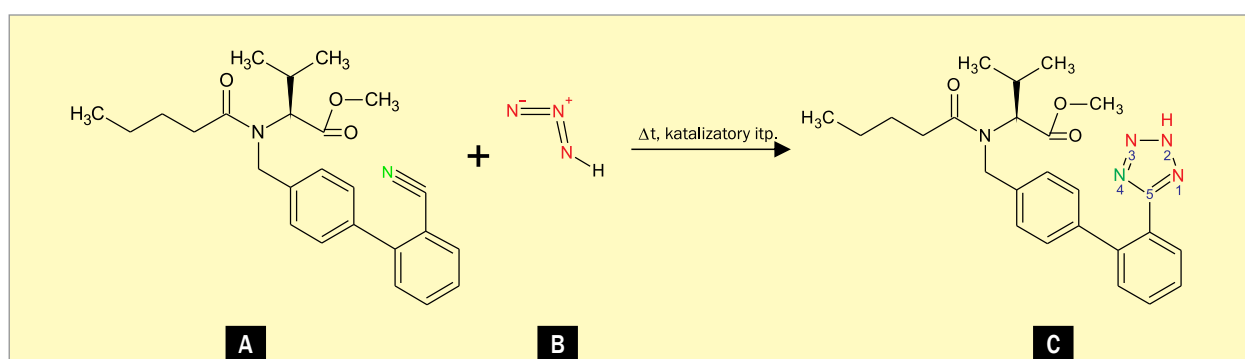
Możliwe przyczyny pojawienia się zanieczyszczeń N-nitrozoaminowych w sartanach

Oprócz opisanej wyżej syntezy sartanów istnieją inne metody syntezy pierścienia tetrazolowego, w tym także wykorzystujące wyżej opisane reakcje nityli z organicznymi bądź nieorganicznymi azydkami [19, 20]. Wielość możliwych dróg otrzymywania jednego produktu docelowego stwarza z kolei możliwość licznych i nietrudnych do przeprowadzenia z technologicznego punktu widzenia modyfikacji procesu syntezy sartanów, w tym walsartanu, nawet w obrębie rozwiązania chronionego jednym patentem (patrz np. patenty Pat.CN104045602A [20], Pat.WO2012001484A2 [21]). W opisach patentowych często zresztą dopuszcza się zamienne użycie na przykład niektórych reagentów czy rozpuszczalników. Jednak w przypadku gdy nie zostaną przewidziane wszystkie potencjalne reakcje uboczne, modyfikacje takie mogą także prowadzić do błędów, co właśnie najprawdopodobniej doprowadziło do pojawienia się w sartanach zanieczyszczeń N-nitrozoaminami.

Zakrojone na szeroką skalę przeszukanie zawartości wielu patentów przeprowadzone przez niemieckich autorów Buschmann i Holzgrabe [18] już po wykryciu nitrozoamin w walsartanie wskazuje z dużym prawdopodobieństwem, że to właśnie proces z wykorzystaniem azydku tributylocyny poddał modyfikacji prowadzącej do tworzenia N-nitrozoamin chiński producent substancji czynnej, wytwórnia *Zhejiang*



Rycina 3. Reakcja syntezy 5–podstawionego pierścienia tetrazolowego w przebiegu klasycznej syntezy walsartanu. Atomy azotu budujące pierścień tetrazolowy zaznaczono kolorami; **A.** Związek nitrylowy; **B.** Azydek tributylowy; **C.** Związek stannylotetrazolowy



Rycina 4. Uproszczony schemat powstawania w przebiegu syntezy walsartanu pochodnej tetrazolu z odpowiedniego nitrylu i azydku wodoru uwolnionego z azydku sodu. Atomy azotu budujące pierścień tetrazolowy oznaczono kolorami; **A.** Związek nitrylowy; **B.** Azydek wodoru; **C.** Pochodna 5–podstawionego tetrazolu (w tym wariantcie ester metylowy walsartanu)

Huahai Pharmaceutical Co., Ltd. W modyfikacji tej (ryc. 4) zamiast azydku tributylowy (ryc. 3B) do reakcji z nitrylem wprowadzono znacznie tańszy azydek sodowy (NaN_3). Można to było wywnioskować między innymi na podstawie faktu, że w 2014 roku ZHP opublikował patent oznaczony jako CN104045602A (tytuł w tłumaczeniu: „Ulepszona metoda wytworzenia układu tetrazolowego walsartanu”), w którym zgłoszono ulepszenie syntezy z jednoczesnym pominięciem stosowania związku cyanoorganicznego [20, 22]; wskazuje to także na ekonomiczne tło zmiany. Dla uproszczenia na schemacie tej reakcji podanym na rycinie 4 zamiast azydku sodu umieszczono od razu azydek wodoru (HN_3) uwolniony z dodawanego do środowiska reakcyjnego azydku sodowego w środowisku kwaśnym. Po przeprowadzeniu powyższej reakcji, tak jak w opisanym wcześniej procesie, przeprowadza się hydrolizę wytworzonej pochodnej tetrazolu (ryc. 4C) w celu otrzymania właściwej substancji leczniczej – walsartanu.

Użyty w opisanej modyfikacji syntezy azydek sodu jest solą, dlatego słabo rozpuszcza się w stosowanych zwykle do reakcji syntezy układu tetrazolowego rozpuszczalnikach organicznych w rodzaju dimetyloformamidu

(DMF, *dimethylformamide*) [19]; prawdopodobnie także z tego względu azydek sodu dodano do środowiska reakcyjnego w pewnym nadmiarze, co z kolei pociągnęło za sobą konieczność późniejszego usunięcia nieprzereagowanej jego części przez dodanie azotanu (III) sodowego (NaNO_2 , inaczej azotynu sodu; wnioski te wyciągnięto na podstawie jednego z patentów [20, 22]), w którym także dodaje się NaNO_2 w nadmiarze ze względu na toksyczność azydku sodowego. Azotan (III) sodu jest dobrze rozpuszczalną w wodzie solą, a jednocześnie znanym od dziesięcioleci reagentem, przy którego udziale mogą powstawać N–nitrozoaminy, szczególnie w obecności amin drugorzędowych [23].

Dalsza analiza danych wydaje się wskazywać, że drugim niezbędnym czynnikiem przyczyniającym się do powstania N–nitrozoamin w walsartanie było zastosowanie jako rozpuszczalnika DMF, z którego do środowiska reakcyjnego dostawała się amina drugorzędowa (głównie dimetyloamina [DMA, *dimethylamine*]) – albo obecna w nim jako zanieczyszczenie, albo/i jako produkt rozkładu spowodowanego warunkami reakcji.

W opisany sposób w środowisku reakcyjnym znalazły się jednocześnie dwie substancje dość łatwo reagujące ze sobą z wytworzeniem N-nitrozoamin. To właśnie pozostała po reakcji zniszczenia azydku część azotanu (III) sodowego może wchodzić w reakcje wtórne/niepożądane, w tym reakcje N-nitrozylacji z aminami organicznymi, prowadząc do powstania N-nitrozoamin [24, 25]. Na tej zasadzie NDMA powstaje w reakcji NaNO_2 z DMA [18], NDEA – z jonów azotanowych (III) i trietyloaminy ([TEA, *triethylamine*] używana w niektórych syntezach sartanów), zaś warunkiem powstania NDIPA – nitrozoaminy stwierdzonej dotąd w walsartanie firmy *Signa S.A. de C.V.* – jest reakcja azotanów (III) z diizopropylaminą ([DIPA, *diisopropylamine*], także stosowana przy syntezach niektórych sartanów) [8, 26]. Z kolei wykryty w wytwarzanej przez *Hetero Labs* soli potasowej losartanu NMBA powstaje w reakcji jonów azotanowych (III) z wykorzystywaną jako rozpuszczalnik cykliczną aminą trzeciorzędową, N-metylo-2-pirolidonem (NMP, *N-methyl-2-pyrrolidone*) [8].

Z powyższego wynika, że wprowadzenie przez niektórych wytwórców substancji czynnej modyfikacji polegającej na zastąpieniu azydku sodowego w miejsce azydku tributylocyny – wraz z nieszczęśliwie dobranymi rozpuszczalnikami/reagentami – jest najprawdopodobniej podstawowym czynnikiem odpowiedzialnym za powstawanie toksycznych N-nitrozoamin.

Toksyczność nitrozoamin

N-nitrozoaminy wykazują właściwości mutagenne oraz teratogenne/embriotoksyczne, a także genotoksyczne. Dodatkowo należą one do związków o bardzo silnym działaniu rakotwórczym, a także mogą uszkadzać wątrobę [23]. Od wykrycia w 1956 roku rakotwórczych właściwości NDMA (powodowanie guzów wątroby) przez Barnes i Magee przebadano ponad 300 nitrozoamin i około 90% z nich (rzędu 300) uznano za rakotwórcze u wielu gatunków zwierząt [27, 28]. N-nitrozoaminy występują powszechnie w środowisku człowieka, na przykład w wędlinach, wędzonym mięsie, dymie tytoniowym, w oczyszczonej wodzie pitnej, w gumie, niektórych tworzywach sztucznych i innych [27, 29].

N-nitrozoaminy są prekancerogenami, metabolizowanymi w ustroju do właściwych kancerogenów (zwłaszcza kationów karbeniowych), wykazujących silne właściwości alkilujące w stosunku do zasad purynowych i pirymidynowych obecnych w białkach oraz kwasach nukleinowych (DNA, RNA) [24, 27]. Uzasadnia to działanie mutagenne i rakotwórcze większości N-nitrozoamin i ich szkodliwość przy bardzo niskich stężeniach, nawet rzędu jednego mikrograma ($1 \mu\text{g}$) na litr [24].

Pocieszający jest fakt, że porównując najniższe stężenia wymagane do wywołania raka przez NDMA w eksperymentach na zwierzętach ze średnią ekspozycją u ludzi, stwierdzono, że przeciętne dzienne (pokarm, woda pitna) narażenie

u ludzi w świecie zachodnim jest wielokrotnie niższe niż tak zwany poziom NOEL (*no observed effect level* – stężenie, przy którym już nie zaobserwowano efektu, np. nowotworzenia) u zwierząt; zwraca się jednak uwagę na ograniczoną liczbę zwierząt w przywoływanych eksperymentach [27].

Można założyć, że mieszkaniec Europy Zachodniej dziennie spożywa z pokarmem 0,2–0,3 μg tak zwanych lotnych nitrozoamin [27]. Jeszcze latem 2018 roku w niewielkiej liczbie próbek walsartanu wykryto NDMA w stężeniach 3,4 ppm ([*parts per million*], części na milion) do 120 ppm (średnia 66,5 ppm) [27]. Obliczono, że gdy na przykład substancja czynna jest zanieczyszczona 120 ppm nitrozoaminy (= 120 $\mu\text{g/g}$), a dziennie przyjmuje się przeciwnadciśnieniowy sartan w dawce 160 mg, to w jednej tabletkie jest przyjmowane aż 19 μg NDMA. W zestawieniu z dobową dawką przyjmowaną w pokarmach oznacza to, że przyjęcie tylko jednej tabletki zawierającej zanieczyszczony walsartan powoduje, że standardowa dawka N-nitrozoamin zawartych zwykle w pokarmie zostaje wielokrotnie przekraczana [27]. W zestawieniu z tym fakt, że N-nitrozoaminy są toksyczne już w dawkach liczonych w ppm, spowodował, że wiele procesów syntezy sartanów musi przejść/przechodzić surową weryfikację.

Aspekt analityczny

Istnieje wiele metod umożliwiających wykrywanie bardzo niewielkich stężeń N-nitrozoamin. Co więcej, w związku z wykryciem tych związków w sartanach podjęto wiele nowych działań. Oficjalne Laboratoria Kontroli Środków Leczniczych (OMCL, *Official Medicines Control Laboratory*) zrzeszone w Ogólnoeuropejskiej Sieci OMCL (GEON, *General European OMCL Network*) szybko zorganizowały opracowanie różnych metod oznaczania śladów NDMA i NDEA w walsartanie i innych sartanach. W projekcie uczestniczyło irlandzkie *Public Analyst's Laboratory* w Galway (PALG), francuski OMCL w ANSM (*Montpellier Agence National de Sécurité de Medicament et de Produits de Sante*) oraz Biuro Dochodzeń Chemicznych i Weterynaryjnych (CVUA, *Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt*) w Karlsruhe; krótkie podsumowanie wdrożonych metod zawiera praca Buschmann i Holzgrave [26]. W odniesieniu do przyszłości podstawowe znaczenie ma wszechstronna kontrola procesu wytwarzania leku metodami analitycznymi uwzględniająca wszystkie znane oraz możliwe (w tym mogące wystąpić tylko teoretycznie) zanieczyszczenia podczas każdego etapu wytwarzania substancji czynnej [26].

Podsumowanie i wnioski

Nieprzemysłana modyfikacja procesu syntezy walsartanu przez niektórych producentów substancji czynnych rozpętała „afere walsartanową” związaną z wykryciem śladowych ilości rakotwórczych N-nitrozoamin. Pociągnęło

to za sobą kontrole w firmach wytwarzających zarówno leki, jak i substancje czynne. Z jednej strony sytuacja ta doprowadziła do zwrócenia uwagi na sposoby syntezy tych związków oraz do wycofania zanieczyszczonych produktów leczniczych, z drugiej wywołała strach przed stosowaniem sartanów jako takich, także tych zsyntetyzowanych metodami, w przypadku których nie dochodzi do ubocznego tworzenia się toksycznych N-nitrozoamin. Dostępne obecnie na rynku sartany pozostają pod ścisłą kontrolą organów odpowiedzialnych za bezpieczeństwo stosowania tych leków, a wynikająca z tego szczegółowa analiza toksykologiczna potencjalnych zanieczyszczeń (zarówno już stwierdzonych, jak i możliwych teoretycznie) umożliwia ustalenie zaktualizowanych wymagań w odniesieniu do składu produktu. Przykładem wyciągnięcia wniosków tego rodzaju w następstwie „afery walsartanowej” są

opublikowane 1 lipca 2019 roku (data obowiązywania: 1.01.2020 r.) nowe monografie sartanów zawierających pierścień tetrazolowy zamieszczone w 10. wydaniu Farmakopei Europejskiej [30, 31]; zawierają one między innymi określone na okres przejściowy dopuszczalne zawartości N-nitrozoamin. Po upływie tego okresu (od kwietnia 2021 r.) sartany te nie będą mogły zawierać oznaczalnych stężeń NDMA ani NDEA, co odpowiada zawartości mniejszej niż 0,03 ppm ($\mu\text{g/g}$) [32]. Zwraca się także uwagę na konieczność poddania analizie procesów wytwarzania niektórych leków innych niż sartany, przy których syntezie także mogą powstać N-nitrozoaminy.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Abstract

At the end of June 2018 small amounts of highly carcinogenic N-nitrosamine – N-nitrosodimethylamine (NDMA) contaminations were found in some of the angiotensin II receptor AT_1 antagonists (sartans) used to treat arterial hypertension. By July 2019, four N-nitrosamine impurities had been identified in sartans: NDMA, N-nitrosodiethylamine, N-nitrosodiisopropylamine and N-nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid. Seven manufacturers of three contaminated active substances (valsartan, losartan and irbesartan) from China, India and Mexico had also been identified. These compounds had infiltrated the active pharmaceutical ingredients probably as a consequence of ill-considered synthesis modifications. The number of people who have been prescribed contaminated valsartan alone is estimated at around 20 million worldwide.

This paper discusses the role of sartans in medicine in the context of the physiological significance of the renin-angiotensin-aldosterone system as well as the role of tetrazole moiety in the mechanism of sartans receptor activity. The synthesis of tetrazole moiety and its modifications have been characterized as possible causes of the appearance of nitrosamine impurities in sartans. The toxicological properties of nitrosamines are also briefly outlined. The fact that nitrosamines had been entering medicines for at least five years without the knowledge of the authorities responsible for the safety of medicines has exposed a gross malfunctioning of the system intended to guarantee the safety of medicinal products. The valsartan scandal has forced changes to some drug regulations, in particular the requirements for analytical procedures.

Keywords: sartans, active pharmaceutical ingredient contamination, nitrosamines, tetrazoles chemistry

Folia Cardiologica 2019; 14, 6: 556–563

Piśmiennictwo

1. Sörgel F, Kinzig M, Abdel-Tawab M, et al. The contamination of valsartan and other sartans, part 1: new findings. *J Pharm Biomed Anal.* 2019; 172: 395–405, doi: [10.1016/j.jpba.2019.05.022](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.022), indexed in Pubmed: [31122801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31122801/).
2. Charoo NA, Ali AA, Buha SK, et al. Lesson learnt from recall of valsartan and other angiotensin II receptor blocker drugs containing NDMA and NDEA impurities. *AAPS PharmSciTech.* 2019; 20(5): 166, doi: [10.1208/s12249-019-1376-1](https://doi.org/10.1208/s12249-019-1376-1), indexed in Pubmed: [30989447](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30989447/).
3. Farrukh MJ, Tariq MH, Malik O, et al. Valsartan recall: global regulatory overview and future challenges. *Ther Adv Drug Saf.* 2019; 10: 2042098618823458, doi: [10.1177/2042098618823458](https://doi.org/10.1177/2042098618823458), indexed in Pubmed: [30728946](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30728946/).
4. Moll D. Valsartan. Schweigen – im Einklang mit den Rechtsvorschriften. (Teil I, II i III). *DAZ.online (Dtsch. Apoth. Ztg online)*, Stuttgart, 31.10.2018. [https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2018/10/30/schweigen-im-einklang-mit-den-rechtsvorschriften/chapter:1 oraz j.w./chapter:2 oraz j.w./chapter:3](https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2018/10/30/schweigen-im-einklang-mit-den-rechtsvorschriften/chapter:1%20oraz%20j.w./chapter:2%20oraz%20j.w./chapter:3) (18.07.2019).
5. Shanley A. Sartan recalls beg the question: is compendial impurity testing enough? *Pharm Tech Eur.* 2018; 30(10): 38.
6. Bonner L. More trouble for valsartan with discovery of fourth carcinogen. <https://www.pharmacist.com/article/more-trouble-valsartan-discovery-fourth-carcinogen> (11.07.2019).
7. FDA.ca.2018.07.17: Princeton Pharmaceutical Inc Issues Voluntary Nationwide Recall of Valsartan and Valsartan HCTZ Tablets Due to Detection

- of a Trace Amount of Unexpected Impurity, N-Nitrosodimethylamine (NDMA) in The Products. Company announcement. <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/princeton-pharmaceutical-inc-issues-voluntary-nationwide-recall-valsartan-and-valsartan-hctz-tablets> (29.07.2019).
8. EMA.ar.2019.02.14: Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), dokument EMA/217823/2019, 14 February 2019. Assessment report, Referral under Article 31 of Directive 2001/83/EC angiotensin-II-receptor antagonists (sartans) containing a tetrazole group. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/sartans-article-31-referral-chmp-assessment-report_en.pdf (18.07.2019).
 9. Chaszczewska-Markowska M, Sagan M, Bogunia-Kubik K. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) – physiology and molecular mechanisms of functioning. *Post Hig Med Dosw.* 2016; 70: 917–927, doi: [10.5604/17322693.1218180](https://doi.org/10.5604/17322693.1218180).
 10. Gumułka SW. Neuroprzeznaczni peptydowe i lipidowe. In: Maśliński S, Ryżewski J. *Patofizjologia: podręcznik dla studentów medycyny*, Tom 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 4th ed., Warszawa 2009: 215–242.
 11. Dézsi CA. The different therapeutic choices with ARBs. Which one to give? When? Why? *Am J Cardiovasc Drugs.* 2016; 16(4): 255–266, doi: [10.1007/s40256-016-0165-4](https://doi.org/10.1007/s40256-016-0165-4), indexed in Pubmed: [26940560](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26940560/).
 12. Michel MC, Foster C, Brunner HR, et al. A systematic comparison of the properties of clinically used angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 2013; 65(2): 809–848, doi: [10.1124/pr.112.007278](https://doi.org/10.1124/pr.112.007278), indexed in Pubmed: [23487168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23487168/).
 13. Takezako T, Unal H, Karnik SS, et al. Current topics in angiotensin II type 1 receptor research: focus on inverse agonism, receptor dimerization and biased agonism. *Pharmacol Res.* 2017; 123: 40–50, doi: [10.1016/j.phrs.2017.06.013](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.06.013), indexed in Pubmed: [28648738](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28648738/).
 14. Mavromoustakos T, Agelis G, Durdagi S. AT1 antagonists: a patent review (2008–2012). *Expert Opin Ther Pat.* 2013; 23(11): 1483–1494, doi: [10.1517/13543776.2013.830104](https://doi.org/10.1517/13543776.2013.830104), indexed in Pubmed: [23968548](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23968548/).
 15. Pandarus V, Desplandier-Giscard D, Gingras G, et al. Greening the valsartan synthesis: Scale-up of Key Suzuki-Miyaura Coupling over SiliaCat DPP-Pd. *Org Process Res Dev.* 2013; 17(12): 1492–1497, doi: [10.1021/op400118f](https://doi.org/10.1021/op400118f).
 16. Wang Gx, Sun Bp, Peng Ch. An improved synthesis of valsartan. *Org Process Res Dev.* 2011; 15(5): 986–988, doi: [10.1021/op200032b](https://doi.org/10.1021/op200032b).
 17. Baumann M, Baxendale IR, Ley SV, et al. An overview of the key routes to the best selling 5-membered ring heterocyclic pharmaceuticals. *Beilstein J Org Chem.* 2011; 7: 442–495, doi: [10.3762/bjoc.7.57](https://doi.org/10.3762/bjoc.7.57), indexed in Pubmed: [21647262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21647262/).
 18. Buschmann H, Holzgrabe U. NDMA in valsartan. Eine Spurensuche. *Dtsch Apoth Ztg [DAZ].* 2018; 158(29): 22–26.
 19. Lawson EC, Shook BC, Lanter JC. Tetrazole-based angiotensin II type 1 (AT1) antagonists for the treatment of heart failure and congestive hypertension. In: Dinges J, Lamberth C. ed. *Bioactive heterocyclic compound classes: pharmaceuticals*. First ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2012: 153–167.
 20. Pat.CN104045602A[en] (2014): Improved method for preparing tetrazole for valsartan. Inventors: 朱晓仁, 陕年平, 张文灵, 王鹏 (Zhu Xiaoren, Shan Nianping, Zhang Wenling, Wang Peng). Application filed by 浙江华海药业股份有限公司 (Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd.). <https://patents.google.com/patent/CN104045602A/en> (30.06.2019).
 21. Pat.WO2012001484A2 (2012): An improved process for the preparation of valsartan. Inventors: Chinta R.R., Nangi G.B.S., Nayini M.R. et al. Application filed by Aurobindo Pharma Limited. <https://patents.google.com/patent/WO2012001484A2> (30.06.2019).
 22. Pat.CN104045602A[zh] (2014): 种缬沙坦成四氮唑的改进方法 („Ulepszona metoda wytworzenia układu tetrazolowego walsartanu”). Wynalazcy: 朱晓仁, 陕年平, 张文灵, 王鹏 (Zhu Xiaoren, Shan Nianping, Zhang Wenling, Wang Peng). Wniosek patentowy złożony przez 浙江华海药业股份有限公司 (Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 s. <https://patentimages.storage.googleapis.com/b3/9e/6a/36cc241161e4d3/CN104045602A.pdf> (w jęz. chińskim z rycinami) oraz <https://patents.google.com/patent/CN104045602A/zh> (30.06.2019).
 23. IARC 1978: International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some N-nitroso compounds. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man* 1978; 17: 1–349. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono17.pdf> (8.07.2019).
 24. Hamon M. [Can nitrates lead to indirect toxicity?] [Article in French]. *Ann Pharm Fr.* 2007; 65(5): 347–355, doi: [10.1016/s0003-4509\(07\)92598-5](https://doi.org/10.1016/s0003-4509(07)92598-5).
 25. Rostkowska K, Zwierz K, Różański A, et al. Formation and metabolism of N-nitrosamines. *Pol J Environ Stud.* 1998; 7(6): 321.
 26. Buschmann H, Holzgrabe U. Noch mehr Nitrosamine. NDMA, NDEA, NDIPA – wie kommen die Verunreinigungen in die Sartane? *Dtsch Apoth Ztg [DAZ].* 2019; 159(1–2): 50–54.
 27. Stahlmann R. Wie gefährlich ist NDMA in Valsartan? Eine bewertung aus Toxikologischer Sicht. *Dtsch Apoth Ztg [DAZ].* 2018; 158(30): 30.
 28. Hecht SS. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997; 216(2): 181–191, doi: [10.3181/00379727-216-44168](https://doi.org/10.3181/00379727-216-44168), indexed in Pubmed: [9349687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9349687/).
 29. Gushgari AJ, Halden RU. Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines. *Chemosphere.* 2018; 210: 1124–1136, doi: [10.1016/j.chemosphere.2018.07.098](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.098), indexed in Pubmed: [30208538](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30208538/).
 30. EDQM: Control of nitrosamine impurities in sartans: revision of five Ph. Eur. Monographs. News. 13 June 2019, Strasbourg, France. <https://www.edqm.eu/en/news/control-nitrosamine-impurities-sartans-revision-five-ph-eur-monographs> (01.08.2019).
 31. EDQM: Pharmeuropa Useful information, July 2019. Comments concerning revised texts published in the 10th edition (10.0). Strasbourg, France. https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/PhEur/comments_concerning_revised_texts_published_in_the_10th_edition_10.0.pdf (01.08.2019).
 32. EDQM: Update on the EDQM review of CEP applications for sartans and next steps (June 2019). 18 June 2019, Strasbourg, France. <https://www.edqm.eu/en/news/update-edqm-review-cep-applications-sartans-and-next-steps-june-2019> (01.08.2019).