

IMPLEMENTACIJA SMERNICE ICH M7 IN VREDNOTENJE GENOTOKSIČNIH NEČISTOT

IMPLEMENTATION OF THE ICH M7 GUIDELINE AND EVALUATION OF GENOTOXIC IMPURITIES

AVTOR / AUTHOR:

asist. dr. Jan Schmidt, mag. farm.¹

izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.²

¹ Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta,
Taborska 8, 2000 Maribor

¹ Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko
tehnologijo, Smetanova 17, 2000 Maribor,

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
jan.schmidt@um.si

POVZETEK

Prisotnost genotoksičnih nečistot v zdravilnih učinkovinah in končnih farmacevtskih izdelkih predstavlja potencialno tveganje za končne uporabnike, predvsem zaradi toksičnih učinkov na genetski material posameznika. Direktno genotoksične spojine zaradi svoje reaktivnosti povzročajo poškodbe DNA in so potencialno mutagene, medtem ko indirektno genotoksične spojine prek posrednih mehanizmov rušijo integriteto DNA. Področje nečistot ureja več različnih smernic na nivoju mednarodne konference o harmonizaciji (ICH), pred kratkim pa je v veljavo vstopila nova smernica ICH M7, ki natančneje opredeljuje postopke presoje in nadzora genotoksičnih nečistot v farmacevtskih izdelkih. Glavna novost smernice je predpisana uporaba dveh različnih računalniških pristopov napovedovanja toksičnosti v osrednjih procesih razvrščanja genotoksičnih nečistot v razrede z namenom zmanjšati število eksperimentalnih študij *in vitro* (npr. Amesov test). V preglednem članku predstavljamo novosti, ki jih prinaša smernica ICH M7, predvsem z vidika različnih razredov genotoksičnih nečistot, načina njihovega vrednotenja ter metod *in silico*, *in vitro* ter *in vivo* za določanje mutagenosti.

KLJUČNE BESEDE:

genotoksične nečistote, (Q)SAR metode, mutagenost, ICH M7, Amesov test

ABSTRACT

The presence of genotoxic impurities in drug substances and pharmaceutical drug products represents a potential threat for users, especially due to the toxic effects on the genetic material of individuals. Direct genotoxic compounds due to their reactivity, cause DNA damage and are potentially mutagenic. Indirect genotoxic compounds disrupt the DNA integrity through indirect mechanisms not comprising reactions with the DNA. Impurities are regulated by several guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH). A new ICH M7 guideline, recently entered into force, precisely defines the assessment and control of genotoxic impurities in pharmaceuticals. The main new feature of this guideline is implementation of two different computational approaches for the prediction

of genotoxicity as a main part of decision-making process for classification of genotoxic impurities in order to reduce the number of experimental *in vitro* studies (e.g. Ames assay). This review represents the new ICH M7 guideline, especially regarding different classes of genotoxic impurities, the approaches to their evaluation, and *in silico*, *in vitro* and *in vivo* methods for the detection of mutagens.

KEY WORDS:

genotoxic impurities, (Q)SAR methods, mutagenicity, ICH M7, Ames assay

1 UVOD

Sintezne učinkovine in posledično tudi končna zdravila predstavljajo določeno tveganje zaradi vsebnosti različnih nečistot. Področje nečistot urejajo smernice, ki so usklajene na nivoju mednarodne konference o harmonizaciji (ICH). Smernica ICH Q3A(R2): *Impurities in New Drug Substances* opredeljuje navedbo, identifikacijo in kvalifikacijo organskih nečistot v novih zdravilnih učinkovinah, pridobljenih s kemično sintezo, smernica ICH Q3B(R2): *Impurities in New Drug Products* opredeljuje razpadne ali reakcijske produkte učinkovin v novih končnih zdravilih, smernica ICH Q3C(R5) predpisuje mejne vrednosti *ostankov topil* v farmacevtskih izdelkih ter podaja zahteve za njihovo vrednotenje v učinkovinah, pomožnih snoveh in farmacevtskih izdelkih (1, 2, 3). Smernica ICH Q3D uvaja mednarodna pravila za *kvantitativno in kvalitativno kontrolo nad kovinskimi nečistotami* (4).

Vsem smernicam je skupna paradigma, da je potrebno vsakršno tveganje zmanjšati na najnižji možen nivo. V skladu z navedenimi smernicami ICH lahko nečistote razdelimo na: *organske* (izhodne spojine, reaktantni, stranski produkti sinteze), *anorganske* (ostanki kovin, ki so večinoma posledica uporabe katalizatorjev) ter *ostanke topil*. Vedno večjo pozornost namenjamo določanju in kontroli **genotoksičnih nečistot**, saj lahko predstavljajo tveganje za povečan razvoj rakavih bolezni. Za nadzor nad genotoksičnimi nečistotami je potrebno poskrbeti že v zgodnjih fazah razvoja novega zdravila, npr. že v začetku načrtovanja sintezne poti, izbiri spojin vodnic itd.

2 OSNOVNA RAZDELITEV MEHANIZMOV DELOVANJA GENOTOKSIČNIH SPOJIN

Med genotoksične spojine uvrščamo reaktivne ali potencialno reaktivne kemijske spojine, ki lahko same ali šele po metabolični bioaktivaciji zaradi svoje reaktivnosti povzročijo poškodbe DNA. Zaradi alkiliranja nukleinskih baz v strukturi DNA lahko prihaja do nastanka spremenjenih nukleinskih baz ali pa celo nastanka apurinskih in apirimidinskih mest, kar vodi v nastanek napačnih baznih parov, prihaja pa lahko tudi do replikacijskih oz. transkripcijskih blokad v primeru večjih alkinih substituentov. Bifunkcionalni alkilanti povzročajo tudi prečna premreženja DNA. Nekatere spojine se lahko zaradi planarnosti vrinejo med bazne pare v strukturi DNA in z interkalacijo povzročijo spremembe v strukturi DNA. V naštetih primerih govorimo o t. i. **direktnih genotoksičnih spojinah**. Med **indirektne genotoksične spojine** uvrščamo kolhicin, ki zavira nastanek delitvenega vretena, zaviralce encimov topoizomeraz ter različne reaktivne kisikove in dušikove zvrsti, ki delujejo indirektno na integriteto DNA (5). Na podoben način lahko razdelimo mehanizem delovanja genotoksičnih nečistot.

Že v uvodu naj opozorimo, da pojma genotoksičnost in mutagenost mnogokrat uporabljamo kot sinonima, čeprav med njima obstaja bistvena razlika. Končni učinek genotoksičnega delovanja namreč ni nujno mutacija oz. mutageno delovanje (5). Za lažje razumevanje smernic in predpisov naj dodamo še pojasnilo, da indirektno genotoksične spojine, ki niso mutagene, praviloma imajo *prag delovanja* in kot takšne večinoma ne predstavljajo tveganja za rakave bolezni pri ljudeh, saj so kot nečistote prisotne v dovolj majhnih količinah (5, 6).

V članku bomo izpostavili temeljne principe ter novosti regulative genotoksičnih nečistot, ki jih vpeljuje nova smernica – **ICH M7 z naslovom »Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk«** ter dodatek k navedeni smernici – ICH M7(R1) (*Addendum to ICH M7*) (7, 8). ICH M7 dopolnjuje že obstoječe smernice ICH Q3A(R2), Q3B(R2) in ICH M3(R2) ter natančno opredeljuje določanje in nadzor nad DNA reaktivnimi (mutagenimi) nečistotami v novih zdravilih z namenom zmanjšati potencialno tveganje za rakave bolezni (6). **Smernica ICH M7 obravnava predvsem direktne genotoksične nečistote** oz. DNA reaktivne spojine, ki lahko povzročijo ne-



posredne poškodbe DNA v zelo majhnih koncentracijah. Govorimo o mutagenih spojinah, ki potencialno povzročajo rakave bolezni. Detektiramo jih s pomočjo bakterijskega testa reverzних mutacij (t. i. Amesov test).

3 REGULATORNI VIDIK

Pred izidom ICH M7 so neposredno področje genotoksičnih nečistot urejali različne smernice in priporočila Evropske agencije za zdravila (EMA) ter Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA) (9, 10, 11). Smernica ICH M7 dejansko prvič predstavlja enoten dokument, ki formalno ureja področje genotoksičnih nečistot v farmacevtskih izdelkih. Opisuje proces, pri katerem so dejanske in potencialne nečistote ali razgradni produkti v učinkovini in končnem zdravilu identificirani, ter ponazarja način izvedbe ocene tveganja. Ključna pridobitev smernice ICH M7 je implementacija dveh različnih računalniških (*in silico*) metod za napovedovanje toksičnosti v celovit sistem regulatornega odločanja. V regulatornem smislu odločanja so posledično *in vitro* metode v novi smernici pravzaprav enakovredne računalniškemu modelom (kvantitativnega) odnosa med strukturo in delovanjem ((Q)SAR). To je vsekakor pomemben mejnik sprejetja modelov QSAR v regulatorno ter industrijsko prakso.

Skladno z obstoječimi smernicami ICH Q3A(R2), Q3B(R2), Q3C(R5) ter Q3D so lahko potencialni viri nečistot izhodne spojine, stranski produkti, intermedijati, razgradni produkti, reagenti, ligandi, katalizatorji, topila ter drugi materiali, ki

na kakršen koli način prihajajo v stik z učinkovino ali farmacevtsko obliko.

3.1 NEČISTOTE V NOVIH UČINKOVINAH IN SMERNICA ICH Q3A

Smernica ICH Q3A(R2) navaja, da morajo proizvajalci narediti povzetek dejanskih in potencialnih nečistot, ki nastajajo med sintezo, čiščenjem in shranjevanjem učinkovin (1). Kot je razvidno iz spodnje preglednice, so za nove učinkovine vpeljane tri različne vrste pragov, ki zahtevajo **navedbo, identifikacijo in kvalifikacijo organskih nečistot**. Pragovi so odvisni od dnevnega odmerka učinkovine. Zaužitje večjega odmerka pomeni tudi večji vnos količine nečistot in s tem posledično večje tveganje za bolnika (preglednica 1) (1, 2, 3).

3.2 RAZGRADNI PRODUKTI V NOVIH ZDRAVILIH IN SMERNICA ICH Q3B

Komplementarna z vidika vsebine je smernica ICH Q3B(R2), saj opredeljuje le nečistote v novih zdravilih, ki so opredeljene kot razgradni produkti učinkovine ali reakcijski produkti učinkovine s pomožnimi snovmi in/ali stično ovojino (smernica za navedeno uporablja izraz razgradni produkti) (2). V to skupino ne uvršča nečistot, katerih vir so pomožne snovi ali ki so posledica sproščanja iz vsebnika. Pomembno je poudariti tudi tiste skupine zdravil (različni kriteriji), ki jih smernica ne vključuje: zdravila v razvoju (npr. klinične študije), biološka zdravila, peptidi, oligonukleotidi, radiofarmacevtiki, produkti fermentacije in polsintezni derivati iz rastlinskih virov ter surovi produkti živalskega ali rastlinskega izvora. S farmacevtsko-tehnološkega vidika ni obravnave polimorfnih oblik učinkovin in enantiomernih nečistot (7, 8). Količine dnevno zaužitega

Preglednica 1. Pragovi navedbe, identifikacije in kvalifikacije organskih nečistot v novih zdravilnih učinkovinah (1, 3).

Table 1. Reporting, identification and qualification thresholds for impurities in new drug substances (1, 3).

Največji dnevni odmerek zdravilne učinkovine ^a	Prag navedbe ^{b,c}	Prag identifikacije ^c	Prag kvalifikacije ^c
≤ 2 g/dan	0,05 %	0,10 % ali dnevni vnos 1,0 mg (glede na to, kateri je manjši)	0,15 % ali dnevni vnos 1,0 mg (glede na to, kateri je manjši)
> 2 g/dan	0,03 %	0,05 %	0,05 %

^a Količina dnevno zaužite zdravilne učinkovine.

^b Višji pragovi poročanja morajo biti znanstveno utemeljeni.

^c Ustrezne so lahko tudi manjše vrednosti pragov v primeru, da gre za nečistote z neobičajno visoko toksičnostjo (izraz vključuje genotoksične nečistote).

Preglednica 2. Pragovi navedbe, identifikacije in kvalifikacije za razgradne produkte v novih zdravilih (2, 3).
Table 2. Reporting, identification and qualification thresholds for degradation products in new drug products (2, 3).

Največji dnevni odmerek zdravilne učinkovine ^a	Prag navedbe ^{b,c}	Prag identifikacije ^{b,c}	Prag kvalifikacije ^{b,c}
≤ 1 g	0,1 %		
> 1 g	0,05 %		
≤ 1 mg		1,0 % ali 5 µg TDI (glede na to, kateri je manjši)	
1–10 mg		0,5 % ali 20 µg TDI (glede na to, kateri je manjši)	
> 10 mg–2 g		0,2 % ali 2 mg TDI (glede na to, kateri je manjši)	
> 2 g		0,10 %	0,15 %
≤ 10 mg			1,0 % ali 50 µg TDI (glede na to, kateri je manjši)
10–100 mg			0,5 % ali 200 µg TDI (glede na to, kateri je manjši)
> 100 mg–2 g			0,2 % ali 3 mg TDI (glede na to, kateri je manjši)

^a Količina dnevno zaužite zdravilne učinkovine.

^b Višji pragovi poročanja morajo biti znanstveno utemeljeni.

^c Pragovi za razgradne produkte so izraženi kot odstotek zdravilne učinkovine ali kot celotni dnevni vnos (TDI, *total daily intake*) razgradnega produkta. Ustrezne so lahko tudi manjše vrednosti pragov, če gre za razgradni produkt z neobičajno visoko toksičnostjo.

zdravila so veliko bolj razčlenjene kot dnevni odmerki za učinkovino (preglednica 2). Vpeljane so tri različne vrste pragov, ki zahtevajo **navedbo, identifikacijo in kvalifikacijo razgradnih produktov**.

4 GENOTOKSIČNE NEČISTOTE V NOVIH UČINKOVINAH

Skladno s smernico ICH Q3A je potrebno dejanske nečistote identificirati, kadar so vrednosti pragov prekoračene (1). V tem delu obstajajo določene izjeme, pri katerih je potrebna identifikacija, tudi kadar identifikacijski prag ni presežen. Smernica namreč določa, da je v primeru nečistot, za katere predvidevamo neobičajno močan, toksičen

ali signifikanten farmakološki učinek pri količinah pod pragom identifikacije, potrebno razviti analizne metode za njihovo identifikacijo (5). Naj na tem mestu še enkrat izpostavimo, da definicija med drugim vključuje tudi genotoksične nečistote. Iz smernice ICH Q3A izhaja tudi dejstvo, da so za nečistote v učinkovinah, ki presegajo prag kvalifikacije 0,15 %, potrebna genotoksična testiranja (točkovne mutacije, test kromosomskih aberacij) in po potrebi tudi splošna toksikološka testiranja na živalih (1).

Potencialne nečistote v novi učinkovini so lahko predvsem izhodne spojine, reagenti, stranski produkti in intermedijati, ki jih uporabljajo v celotnem postopku kemične sinteze zdravilne učinkovine. Potrebna je tudi analiza tveganja prenosa teh nečistot v končno učinkovino (npr. izhodne spojine, ki jih uvajamo v poznih sinteznih stopnjah, predstavljajo višjo stopnjo tveganja). **Vse dejanske nečistote in potencialne ne-**



čistote, katerih strukturo poznamo, morajo biti ustrezno ovrednotene z vidika mutagenega potenciala (1, 7).

Vedno pomembnejšo vlogo z vidika testiranja nečistot v novih učinkovinah predstavlja **strategija načrtovanja sintezne poti**. Temelj predstavlja predvsem tveganje ter segment vstopa genotoksične nečistote v sintezno pot glede na bližino končne sintezne stopnje nove učinkovine. Vpeljava genotoksičnih nečistot v zgodnjih stopnjah sinteze predstavlja manjše tveganje za njihovo prisotnost v končni učinkovini, medtem ko njihova vpeljava v poznejših stopnjah s toksikološkega vidika predstavlja kritičen indikator, ki zahteva natančnejšo proučitev tveganja (12, 13, 14).

4.1 IZBRANI PRIMER UVEDBE GENOTOKSIČNE NEČISTOTE V ZADNJO SINTEZNO STOPNJO UČINKOVINE

Za genotoksično nečistoto, ki se uvede v zadnjo stopnjo sinteze, je v večini primerov potrebna specifikacija na osnovi toksikološke presoje. Za primer prikažimo učinkovino, ki jo izoliramo v obliki soli z metansulfonsko kislino. Kadar končna stopnja sinteze vključuje uporabo alkohola, obstaja velika verjetnost tvorbe genotoksičnih estrov z metansulfonsko kislino (npr. nastanek metil mezilata pri uporabi metanola). V takih primerih moramo dokazati, da med sinteznim procesom v primeru tvorbe takšnega estra le-tega ustrezno odstranimo (skladno s postopkom Evropske farmakopeje za soli sulfonskih kislin) (12). Na ta način se izognemo rutinskemu testiranju.

Iz prakse je poznan primer, ki sega v pomlad 2007. Na trg so lansirali zdravilo z učinkovino nelfinavirjev mezilat, kontaminirano z genotoksično nečistoto, estrom etil metansulfonatom. Pacienti so poročali o neprijetnem vonju tablet, pojavili so se tudi prvi primeri slabosti in bruhanja pri pacientih iz Španije. Junija 2007 je sledil odpoklic zdravila na globalni ravni, saj so regulatorne agencije odkrile do 1000-krat prekoračene količine etil metansulfonata od dovoljenih toksikoloških specifikacij (12, 15, 16).

5 PODROČJE UPORABE SMERNICE ICH M7

Področje uporabe obsega nove učinkovine in nova zdravila med procesi kliničnega razvoja in pridobivanja dovoljenja

za promet z novim zdravilom (originatorska zdravila). Zajema tudi del regulatornih procesov po pridobitvi dovoljenja za promet z novim zdravilom (spremembe že obstoječega dovoljenja za promet), pa tudi pridobitev novih dovoljenj za promet z zdravili, ki vsebujejo učinkovine, prisotne v predhodno že registriranih zdravilih (generiki) (7). V obravnavo ICH M7 niso vključena biološka/biotehnološka zdravila, peptidi, oligonukleotidi, radiofarmaceutiki, produkti fermentacije, zdravila rastlinskega izvora ter surovi produkti živalskega ali rastlinskega izvora. Smernica tudi ne zajema učinkovin in zdravil za zdravljenje napredovalih oblik raka ter učinkovin za druga indikacijska področja, ki so genotoksične pri terapevtskih koncentracijah in za katere lahko pričakujemo, da so povezana s povečanim tveganjem za pojav raka. V tem primeru namreč mutagene nečistote ne bi imele znatnega vpliva na tveganje za pojav raka. Smernica tudi ne predvideva ocene nevarnosti za pomožne snovi, arome, barvila itd. Izjemoma lahko principe ocene nevarnosti, ki jih opisuje smernica, uporabljamo za nečistote v pomožnih snoveh, ki se uporabljajo prvič v določenem zdravilu in so pridobljene s kemično sintezo (7, 8).

6 OCENA NEVARNOSTI (HAZARD ASSESSMENT) GENOTOKSIČNIH NEČISTOT

Smernica ICH M7 podaja priporočila glede genotoksičnih nečistot v novih učinkovinah in končnih zdravilih med njihovim kliničnim testiranjem in med procesom registracije novega zdravila ter sprememb dovoljenja za promet z zdravili, ki so že na trgu (7). Ocena mutagenega potenciala je namreč potrebna pri spremembah sintezne poti učinkovin (nove nečistote ali zvišanje kriterijev sprejemljivosti za obstoječe nečistote), spremembah v formulaciji zdravila, sestavi ali proizvodnem procesu (novi razgradni produkti ali zvišani kriteriji sprejemljivosti za obstoječe razgradne produkte) ter spremembah v indikaciji ali režimu odmerjanja, ki znatno vplivajo na sprejemljivo raven tveganja za pojav raka. Smernica se osredotoča na DNA reaktivne spojine, ki lahko reagirajo z DNA v majhnih koncentracijah, kar vodi v mutacije in tveganje za razvoj karcinomov (7, 8). Podaja načine identifikacije, kategorizacije, kvalifikacije in kontrole genotoksičnih nečistot in na ta način zapolnjuje regulatorno vrzel na tem področju, sočasno pa dopolnjuje smernici ICH Q3A in ICH Q3B (1, 2).

Ocena nevarnosti vključuje začetno analizo dejanskih in potencialnih nečistot s pomočjo pregleda podatkovnih

zbirk in literature v zvezi s podatki o njihovi karcinogenosti in bakterijski mutagenosti. Na podlagi tega sledi klasifikacija v enega izmed razredov 1, 2 ali 5. Če teh podatkov ni na voljo, je potrebno določiti odnos med strukturo in delovanjem (SAR), ki se osredotoča predvsem na napovedovanje bakterijske mutagenosti. Slednje nam omogoča razvrstitev nečistot v razrede 3, 4 ali 5 (7, 8).

V skladu s smernico ICH M7 lahko nečistote glede na mutageni in karcinogeni potencial razvrstimo v pet razredov:

Razred 1: nečistote z znanim mutagenim in karcinogenim delovanjem;

Razred 2: nečistote z dokazanim mutagenim delovanjem, vendar z neznanim karcinogenim potencialom. To pomeni pozitiven bakterijski test mutagenosti ali pa so na voljo kateri koli drugi relevantni podatki o mutagenosti, ki nakazujejo reaktivnost z DNA ali učinke, kot je sprožanje genskih mutacij (npr. pozitivni izsledki *in vivo* študij genskih mutacij); brez podatkov o karcinogenosti na glodalcih;

Razred 3: nečistote s tvegano kemijsko strukturo (*alerting structure*), ki ni strukturno podobna zdravilni učinkovini; podatkov o mutagenem delovanju ni;

Razred 4: nečistote s tvegano kemijsko strukturo (*alerting structure*), ki je enaka tvegani strukturi v zdravilni učinkovini ali spojinah, ki so strukturno sorodne zdravilni učinkovini (npr. intermediati), vendar z negativnim izidom testiranja v bakterijskem testu mutagenosti;

Razred 5: nečistote brez tvegane kemijske strukture ali s tvegano kemijsko strukturo z ustrežno količino podatkov, ki potrjujejo odsotnost mutagenih ali karcinogenih učinkov (7, 8).

Skladno z ICH M7 ocena nevarnosti dejanskih in potencialnih nečistot v prvi fazi zajema predvsem preverjanje informacij o karcinogenosti in mutagenosti v odprtih, komercialnih ali lastniških podatkovnih bazah ter drugi literaturi z namenom razvrstitve v enega izmed razredov 1, 2 ali 5. Dodatek ICH M7(R1) pomembno dopolnjuje smernico predvsem v smislu karakterizacije tveganja in upoštevanja mejnih vrednosti za posamezne razrede nečistot (8).

7 KARAKTERIZACIJA TVEGANJA

Smernica ICH M7 v poglavju Karakterizacija tveganja (*risk characterization*) predvideva izračun sprejemljive izpostavljenosti (*acceptable intakes*) za nečistote razredov 1, 2 in 3.

7.1 SPREJEMLJIVA IZPOSTAVLJENOST NA OSNOVI ZA SPOJINO SPECIFIČNE OCENE TVEGANJA (COMPOUND-SPECIFIC RISK ASSESSMENT)

7.1.1 Vrednotenje mutagenih nečistot z dokazanim karcinogenim delovanjem (razred 1)

Za znane mutagene karcinogene, ki so brez praga delovanja (npr. dimetil karbamoil klorid, hidrazin), se predvideva izračun za *spojino specifične sprejemljive izpostavljenosti (AI, ang. compound-specific acceptable intake)*. AI izračunamo na osnovi karcinogenosti posamezne nečistote in linearne ekstrapolacije, obstajajo pa tudi drugi pristopi npr. z uporabo *odmerka, ki povzroči nastanek tumorja pri polovici preskusnih živali (TD₅₀, tumorigenic dose rate 50)*, pridobljenega iz študij karcinogenosti na glodalcih. Smernica ICH M7 navaja kot primer izračun AI za etilen oksid.

7.1.2 Mutagene nečistote z dokazanim pragom delovanja

Pri tovrstnih nečistotah obstaja mehanizem delovanja, ki vodi do nelinearnega odziva v odvisnosti od odmerka z dejanskim pragom. V zadnjem času ugotavljamo za vse večje število spojin, ki so DNA reaktivne, prag delovanja. Njihov direkten toksičen učinek na DNA je namreč največkrat odvisen od hitrih fizioloških detoksifikacijskih procesov in/ali od popravljalnih mehanizmov DNA. Primer DNA reaktivne nečistote s pragom delovanja je etil metan sulfonat (*in vitro* ter *in vivo* mutagen), kjer izračunamo *dovoljeno dnevno izpostavljenost (PDE, permissible daily exposure)* na podlagi *odmerka, pri katerem ni učinka (NOEL, no observed effects level)*, in z upoštevanjem varnostnih faktorjev (7, 8). Dodatek ICH M7(R) vsebuje tudi preglednico z različnimi spojinami, za katere so že podane mejne vrednosti (AI ali PDE) (8).

Izračune AI lahko tudi prilagajamo za krajša obdobja uporabe nekega zdravila (tj. krajša uporaba od celotne življenjske dobe), kjer odčitamo vrednosti (preglednica 4), ki so izpeljane za različne dolžine trajanja zdravljenja z zdravilom, ali pa izberemo 0,5 % dnevnega odmerka (glede na to, katera vrednost je manjša) (7).

7.2 VREDNOTENJE NEČISTOT RAZREDOV 2 IN 3

Pri nečistotah razredov 2 in 3 upoštevamo mejne vrednosti *praga toksikološkega tveganja (TTC, threshold of toxic-*



Preglednica 4. Sprejemljiva izpostavljenost za posamezno nečistoto (7).

Table 4. Acceptable intakes for an individual impurity (7).

Trajanje zdravljenja	≤ 1 mesec	> 1–12 mesecev	> 1–10 let	> 10 let – doživljenjsko
Dnevni vnos (µg/dan)	120	20	10	1,5

logical concern). Koncept TTC opredeljuje odmerek 1,5 mg nečistote/dan kot sprejemljivi vnos mutagenih nečistot pri človeku. Navedeni dnevni vnos predstavlja namreč zanemarljivo tveganje za razvoj raka pri posamezniku (manjše od 1 proti 100.000) pri doživljenjski izpostavljenosti. Ta pristop uporabljamo v primeru mutagenih nečistot v farmacevtskih izdelkih za dolgotrajno zdravljenje (> 10 let) in kjer ni na voljo podatkov o karcinogenosti. Izjemo predstavljajo mutageni karcinogeni z visoko jakostjo aktivnosti (*cohort of concern*), kot so aflatoksinom podobne spojine ter spojine z N-nitroso skupino in alkil-azoksi fragmenti, saj lahko teoretično pomenijo tveganje za razvoj raka tudi pri vrednostih, ki so manjše od TTC, zato so v tem primeru dovoljeni vnosi pod vrednostjo TTC (7). V določenih okoliščinah prihaja do izraza tudi izpostavljenost nečistoti, ki je *krajša od celotnega življenjskega obdobja (LTL, less-than-lifetime)* ali pa poteka režim odmerjanja zdravila v daljših večdnevnikih intervalih (npr. enkrat tedensko). V teh primerih so za krajše izpostavitve sprejemljivi večji odmerki (princip LTL), zato nas zanima celotno število odmernih dnevov, kar odčitamo s pomočjo preglednice 4 (7). ICH M7 predvideva ločeno preglednico v primerih, kadar obstajajo vsaj tri vrste nečistot razreda 2 oz. 3 ali večje število, saj v teh primerih ugotovljamo celotno število mutagenih nečistot (7).

7.3 VREDNOTENJE NEČISTOT RAZREDOV 4 IN 5

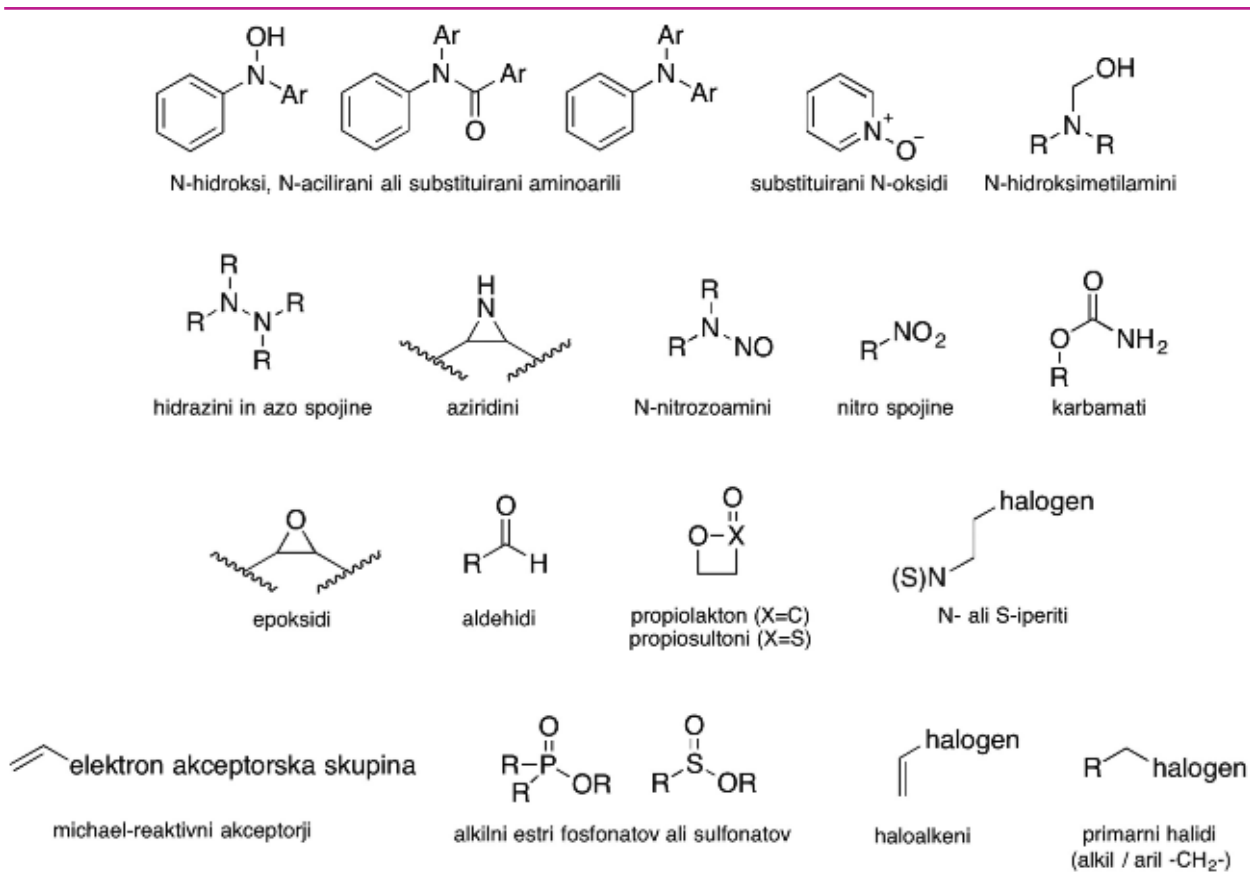
Smernica ICH M7 obravnava nečistote razredov 4 in 5 kot nemutagene nečistote, vendar s pomembno razliko. V razred 5 namreč uvršča nečistote brez tvegane kemijske strukture ali pa le-te vsebujejo tvegano strukturo, kjer pa je na podlagi vseh razpoložljivih podatkov dokazana odsotnost mutagenega ali karcinogenega delovanja (7). Nečistote razreda 4 vsebujejo tvegan strukturni fragment, ki je že zastopan v zdravilni učinkovini ali strukturno sorodnih spojinah (npr. v procesnih intermediatih), vendar so rezultati testov mutagenosti teh struktur dokazano negativni. V tej skupini nečistot tvegan strukturni fragment največkrat pomeni potencialno genotoksično strukturo v enakem položaju in kemijskem okolju glede na že potrjeno nemutageno delovanje zdravilne učinkovine ali sorodne spojine z enakim strukturnim fragmentom. Pri tem gre v praksi običajno za

različne serije spojin, ki imajo največkrat različne substituentne, vezane na centralno ogrodje s tvegano kemijsko strukturo (npr. serija različno substituiranih kinon-iminov), ki pa je nemutagena, ali pa gre za analoge, kjer je tvegana kemijska struktura (npr. aromatska amino skupina) vezana na položaj, ki deaktivira njeno mutageno delovanje (npr. trifluorometilne skupine v meta položaju glede na amin). Nečistote razredov 4 in 5 običajno vrednotimo in nadziramo pri mejnih vrednostih, ki so skladne s smernicama ICH Q3A in ICH Q3B (1, 2).

8 UPORABA RAČUNALNIŠKIH (Q)SAR METOD PRI KLASIFIKACIJI GENOTOKSIČNIH NEČISTOT

Če za določeno nečistoto podatkov za mutagenost in/ali karcinogenost ni na razpolago, smernica ICH Q7 priporoča izvedbo analize (Q)SAR s pomočjo ustreznega modela za napovedovanje bakterijske mutagenosti z namenom razvrstitve v enega izmed razredov 3, 4 ali 5. Smernica predlaga izvedbo z vsaj dvema komplementarnima metodama: (1) metodo z uporabo ekspertnih podatkovnih baz (npr. programska oprema Nexus DEREK), kjer vrednotimo podstrukture, za katere je dokazano, da interagirajo z DNA, ter (2) statistično metodo, ki temelji na eksperimentalnih zbirkah podatkov (npr. programska oprema CASE Ultra, uporaba Ames *Salmonella* modula) (5). Pogoji je tudi, da so računalniški programi z obema metodologijama ustrezno validirani v skladu s kriteriji Organizacije za ekonomsko sodelovanje in razvoj (OECD). Nekateri tvegani strukturni fragmenti oz. toksikoformne skupine, ki so vpletene v reakcije z DNA in so zastopane tudi v različnih programih za napovedovanje toksičnosti (tj. mutagenosti), prikazuje slika 1 (17, 18, 19, 20).

Trenutno obstoječi pristopi (Q)SAR imajo tudi številne slabosti. Rezultati napovedovanj toksičnosti v določenih primerih ne dajejo enoznačnih sklepov (npr. pozitiven/negativen rezultat napovedovanja mutagenosti), ampak dajejo



Slika 1. Nekateri primeri tveganih strukturnih fragmentov (18).
Figure 1. Some examples of alerting substructures (18).

nevtralne oz. nedoločne rezultate. Razlogov je lahko več, npr. sistem ne vsebuje ustreznega testnega nabora struktur, zato primerjava s poljubno nečistoto ni možna. Včasih je za potrditev pozitivnega ali negativnega rezultata na voljo premalo dokazov ali pa so ti neustrezni. Za določene vrste spojin pa napovedi niso možne (npr. koordinacijske spojine) (21). Številni strokovnjaki iz farmacevtske industrije izpostavljajo problematiko velikega števila napačno pozitivnih rezultatov pri uporabi metod (Q)SAR (21, 22). Eden od takšnih primerov so napačno pozitivni rezultati za monoalkil sulfatne estre v modelih(Q)SAR, ki uporabljajo statistično metodo. Navedene spojine imajo pri fiziološkem pH negativen naboj in so veliko manj elektrofilne kot njihovi alkilirajoči analogi: alkilsulfonatni estri in dialkil sulfati. V Amesovem testu imajo monoalkil sulfatni estri prav tako negativen naboj in ne spadajo med alkilirajoče spojine z izjemo znanih mutagenov, kot so sulfati poliaromatskih ogljikovodikov (nastanek benzilnega karbokationa) (21, 22). Potrditev odsotnosti tveganih strukturnih fragmentov s pomočjo obeh

metod zadošča za sklep, da je nečistota brez mutagenega delovanja (razvrstitev v razred 5), v tem primeru tudi nadaljnja *in vitro* testiranja niso več potrebna. Kadar so v nečistoti prisotna strukturna tveganja, nečistoto razvrstimo v razred 3 (7, 8, 21, 22).

9 KLASIFIKACIJA NEČISTOT S POMOČJO PREISKAV *IN VITRO* TER *IN VIVO*

Sledijo lahko ustrezni kontrolni ukrepi ali pa izvedba *in vitro* bakterijskega testa mutagenosti (Amesov test) na posamezni nečistoti. Izvedba Amesovega testa s strani proizvajalca kot tudi način preverbe podatkov o mutagenosti v podatkovnih zbirkah in literaturi morata biti ustrezna. Podatkovne zbirke morajo omogočiti vpogled v informacije in okoliščine izvedbe tega testa, saj lahko v razred 5 ali razred

2 uvrstimo samo tiste nečistote, kjer je ustrezno izveden *in vitro* Amesov test pokazal negativen oziroma pozitiven rezultat. Za Amesov test je namreč predpisana skladnost s farmacevtsko regulativo, tj. smernico ICH S2(R1), postopki OECD 471 ter pogoji dobre laboratorijske prakse (DLP) (23, 24, 25). Nekateri izmed pogojev so npr. izvedba na vsaj petih različnih sevih bakterij, od tega na štirih sevih *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA1537/TA97a/TA97, TA98 in TA100) kot tudi sevi *Escherichia coli* WP ali *Salmonella typhimurium* TA102 (21, 22, 26, 27). Tudi sam Amesov test ima nekaj pomanjkljivosti, kot so npr. napačni pozitivni rezultati pri določenih kombinacijah kislinskih ali sulfonil halogenidov, prisotnih v testnih materialih in topilu DMSO (21, 22). Vsa odstopanja od predpisane izvedbe so dovoljena le v izjemnih primerih in morajo biti ustrezno utemeljena.

Vsak negativen rezultat *in vitro* testa preglasuje kakršno koli prisotno strukturno tveganje, zato v nadaljevanju niso potrebna dodatna testiranja. Takšno nečistoto zato razvrstimo v razred 5. Prav tako v primeru negativnega rezultata ustrezno izvedene študije karcinogenosti na glodalcih nečistoto razvrstimo v razred 5 oz. v razred 1, kadar je rezultat takšne študije pozitiven. Opozoriti velja na določene izjeme, kjer je spojina pozitivna v študiji karcinogenosti na glodalcih, medtem ko je negativna v Amesovem testu. Gre predvsem za karcinogene z indirektnim genotoksičnim učinkom, ki delujejo kot proliferatorji (21). V primeru pozitivnega izida Amesovega testa (potrditev *in vitro* mutagena) se zahteva nadaljnje vrednotenje in/ali kontrola (28). Kadar nečistote ni mogoče zmanjšati pod spodnjo mejo, je priporočljivo testiranje nečistote s pomočjo *in vivo* testov genetskih mutacij, katerih izbira mora biti znanstveno utemeljena, predvsem pa mora izhajati iz poznavanja mehanizma delovanja nečistote in tarčnega tkiva (7). Če rezultati *in vivo* ne dokažejo mutagenenega delovanja, je ta izid prevladujoč glede na *in vitro* izsledke, zato nečistoto uvrstimo med nemutagene (7).

Seznam testov *in vivo*, ki jih omenja ICH M7 in s katerimi v nadaljevanju proučujemo *in vitro* mutagene, prikazuje preglednica 5 (7). S pomočjo rezultatov, ki jih dobimo na podlagi *in vivo* testov lahko, če je to smiselno, podpremo tudi postavitev novih mejnih vrednosti za prisotne nečistote. Npr. če za določen genotoksin dokažemo delovanje s pragom v sklopu *in vivo* testiranj (npr. mikronukleusni test na podganah), zanj v nadaljevanju izračunamo novo vrednost – PDE. Nečistoto, ki vsebuje tvegan strukturni fragment, ki je enak tvegani strukturi v zdravilni učinkovini ali strukturno

sorodnih spojinah, za katere je dokazano nemutageno delovanje (tj. negativni izid testiranja mutagenosti), obravnavamo kot nemutageno in jo uvrstimo v razred 4 (7, 8, 26, 27).

10 DRUGA POGlavJA V SMERNICI ICH M7

Smernica poleg že obravnavanih področij zajema poglavje *Izjem in fleksibilnostnih pristopov*, kjer so opisane ustrezne utemeljitve zvečanja AI v primerih izpostavitve nečistotam iz drugih virov, kot je npr. hrana, v primerih hudih bolezni in zmanjšane pričakovane življenjske dobe ter pri nečistotah z visoko jakostjo aktivnosti. Sledita še poglavje *Kontrola*, ki zahteva ustrezno kontrolno strategijo nad materiali, opremo, prostori, proizvodnimi procesi itd. Poglavje *Dokumentacija* pa pojasnjuje primere uporabe vsebin smernice pri oddaji vlog za klinična testiranja ter vlog za pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom v obliki **skupnega tehničnega dokumenta (CTD, common technical document)** (7, 8).

11 SKLEP

Določitev in kontrola genotoksičnih nečistot v razvoju učinkovin sta zelo zahtevni nalogi, predvsem zaradi množice različnih sinteznih postopkov, možnih stopenj vstopa genotoksičnih nečistot v proces in množice novih spojin ter posledično nečistot, ki pri tem nastajajo. Zaradi naraščajočega števila novih spojin je pomen smernice ICH M7 za področje nadzora genotoksičnih nečistot še toliko bolj pomemben. Predpisana uporaba dveh komplementarnih metod za napovedovanje toksičnosti v regulatorno odločanje je novost, ki jo bodo morali implementirati tako farmacevtska industrija kot regulatorne agencije. Predvsem je v ospredju želja po natančnem, a hitrejšem računalniško podprtem odkrivanju množic kemijskih struktur z genotoksičnim potencialom. Odsotnost genotoksičnih nečistot in/ali njihova prisotnost pod mejnimi vrednostmi v farmacevtskih izdelkih zmanjšuje tveganje za paciente, predvsem pa zagotavlja varno uporabo zdravil. V prihodnosti pričakujemo še večje zaostritve pri postavitvi dovoljenih mejnih vrednosti za genotoksične nečistote, predvsem pa vzporeden razvoj popolnejših metod za napovedovanje toksičnosti.

Preglednica 5. Vrste testiranj *in vivo*, s katerimi potrdimo mutagene *in vitro*, ter posamezne značilnosti (7, 26, 27).

Table 5. Types of *in vivo* assays to confirm the *in vitro* mutagens and their characteristics (7, 26, 27).

Vrsta <i>in vivo</i> testa	Utemeljitev uporabe
<p>Transgenski mutacijski testi Nekatere znane izvedbe na glodalcih: <i>Muta mouse</i>, <i>Big Blue</i>, <i>LacZ plasmid mouse</i>, <i>gpt delta rodents</i> (26).</p>	Za vse vrste mutagenov.
<p>Pig-a mutacijski test <i>in vivo</i> Princip: gen <i>pig-a</i> je edini gen, ki je vključen v sintezo glikofosfatidil inozitolnega (GPI) sidra na kromosomu X. Test izvedemo na podganah, ki jih izpostavimo določenemu mutagenu, ter nato v njihovi krvi merimo frekvenco mutacij s pomočjo specifičnih protiteles (27).</p>	Za mutagene, ki ne potrebujejo predhodne metabolične bioaktivacije (pozitivni Amesov test brez frakcije S9). V primeru indirektno delujočih mutagenov (potrebujejo metabolično bioaktivacijo) je potrebno prikazati ustrezno izpostavitvev metabolitom.
<p>Mikronukleusni test (mikrojedrni test) <i>in vivo</i> (OECD 474) Princip: živali izpostavimo mutagenu, odvzamemo vzorec kostnega mozga ali krvi ter iščemo nastanek mikrojedrer (lomi kromosomov) (29).</p>	Za mutagene, ki ne potrebujejo predhodne metabolične bioaktivacije (pozitivni Amesov test brez frakcije S9), ter spojine, ki so klastogene. V primeru indirektno delujočih mutagenov (potrebujejo metabolično bioaktivacijo) je potrebno prikazati ustrezno izpostavitvev metabolitom.
<p>Test nenačrtne sinteze DNA (UDS test, <i>unscheduled DNA synthesis test</i>), izveden na podganjih jetrih (OECD 486) Princip: gre za indikatorski test, kjer merimo sintezo DNA na mestu genotoksične poškodbe, ki je spodbujena s strani DNA popravljajnih encimov – detekcija s tritijem označenega timidina (³H-TdR), ki se vgrajuje v DNA (26, 30).</p>	Predviden za mutagene, ki potrebujejo predhodno metabolično bioaktivacijo. Ostali kriteriji: aktivni jetrni metabolit je znan. Dodatni pogoj: metabolit mora nastati v testirani živalski vrsti, večja občutljivost za popravljajne mehanizme NER (<i>nucleotide excision repair</i>) – predvsem posledica DNA aduktov.
<p>Kometni test Princip: gre za gelsko elektroforezo posamezne celice, kjer detektiramo eno- in dvovertižne prelome DNA ter na alkalije labilna mesta (posledice neposrednih poškodb DNA ali vmesna stopnja popravljajnih mehanizmov).</p>	Za izvedbo je potrebna dodatna utemeljitev, predvsem v smislu od kemikalije odvisnega načina delovanja. Potrebna je tudi utemeljitev izbire tkiva/organa.
Ostali	Z ustrezno utemeljitvijo.

12 LITERATURA

1. ICH Q3A(R2), 2006. *Impurities in New Drug Substances*.
2. ICH Q3B(R2), 2006. *Impurities in New Drug Products*.
3. ICH Q3C(R5), 2011. *Impurities: Guideline for residual solvents*.
4. ICH Q3D, 2014. *Guideline for Elemental Impurities*.
5. Lee H. *Pharmaceutical Industry Practices on Genotoxic Impurities*. CRC Press, 2014: 1-505.

6. Jacobson-Kram D, McGovern T. *Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products*. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(1): 38-42.
7. ICH M7, 2015a. *ICH M7 – assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk*.
8. ICH M7, 2015b. *Addendum to ICH M7: assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk: application of the principles of the ICH M7 guideline to calculation of compound-specific acceptable intakes M7 (R1)*.
9. EMA, 2006. *Guideline on the limits of genotoxic impurities*. CPMP/SWP/5199/02. EMEA/CHMP/QWP/251344/2006.

10. EMA, 2010. Question & Answers on the »Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities«. CHMP/SWP/431994/2007.
11. FDA, 2008. Draft guidance for industry e genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products: recommended approaches.
12. Pierson DA, Olsen BA, Robbins DK et al. Approaches to Assessment, Testing Decisions, and Analytical Determination of Genotoxic Impurities in Drug Substances. *Org Process Res Dev* 2009; 13(2): 285–291.
13. 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): 662-667.
14. Bercu JP, Dobo KL, Gocke E et al. Overview of genotoxic impurities in pharmaceutical development. *Int J Toxicol* 2009; 28(6): 468-478.
15. Müller L, Gocke E, Lavé T et al. Ethyl methanesulfonate toxicity in Viracept--a comprehensive human risk assessment based on threshold data for genotoxicity. *Toxicol Lett* 2009; 190(3): 317-329.
16. Walker VE, Casciano DA, Tweats DJ. The Viracept-EMS case: impact and outlook. *Toxicol Lett* 2009; 190(3): 333-339.
17. Looker AR, Ryan MP, Neubert-Langille BJ et al. Risk assessment of potentially genotoxic impurities within the framework of quality by design. *Org Process Res Dev* 2010; 14(4): 1032–1036.
18. Robinson DI. Control of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients: A Review and Perspective. *Org Process Res Dev* 2010, 14(4): 946–959.
19. Elder DP, Harvey JS. Is there a Real Case for Cumulative Control of Structurally Related Genotoxic Impurities? *Org Process Res Dev* 2010, 14(4): 1037–1045.
20. Snodin DJ. Genotoxic Impurities: From Structural Alerts to Qualification. *Org Process Res Dev* 2010, 14(4): 960–976.
21. Amberg A, Beilke L, Bercu J et al. Principles and procedures for implementation of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regul Toxicol Pharmacol* 2016; 77: 13-24.
22. Barber C, Amberg A, Custer L et al. Establishing best practise in the application of expert review of mutagenicity under ICH M7. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015; 73(1): 367-377.
23. OECD, 1997. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test OECD Guideline for Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
24. ICH S2(R1), 2011. Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use.
25. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdserieson-principlesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>. Dostop: 04-07-2016
26. Lambert IB, Singer TM, Boucher SE et al. Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutat Res* 2005; 590(1-3): 1-280.
27. Dobrovolsky VN, Miura D, Heflich RH et al. The in vivo Pig-a gene mutation assay, a potential tool for regulatory safety assessment. *Environ Mol Mutagen* 2010; 51(8-9): 825-835.
28. Araya S, Lovsin-Barle E, Glowienke S. Mutagenicity assessment strategy for pharmaceutical intermediates to aid limit setting for occupational exposure. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015; 73(2): 515-20.
29. OECD, 2014. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
30. OECD, 1997. Test No. 486: Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells in vivo, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.