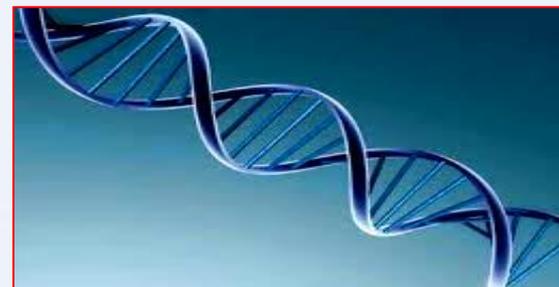


Genotoxicity, mutagenic and carcinogenic risk related to impurities

*Relatore: dott. Antonio Conto
ERT[®] (European Registered Toxicologist)*



Workshop
Regulatory Expectations on impurities in drug substances, Authority and Industry Perspective

Pavia, October 2nd 2015

CONTENUTI

La genotossicità: definizioni ed approcci

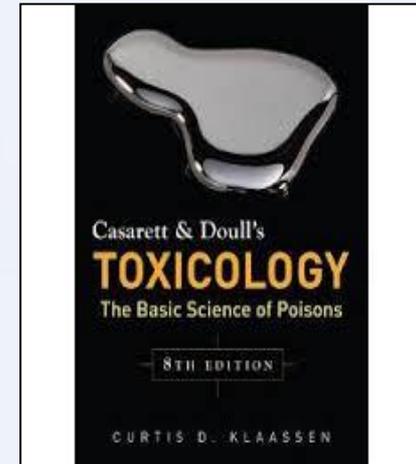
I riferimenti normativi

Gli studi regolatori per lo studio del potenziale genotossico

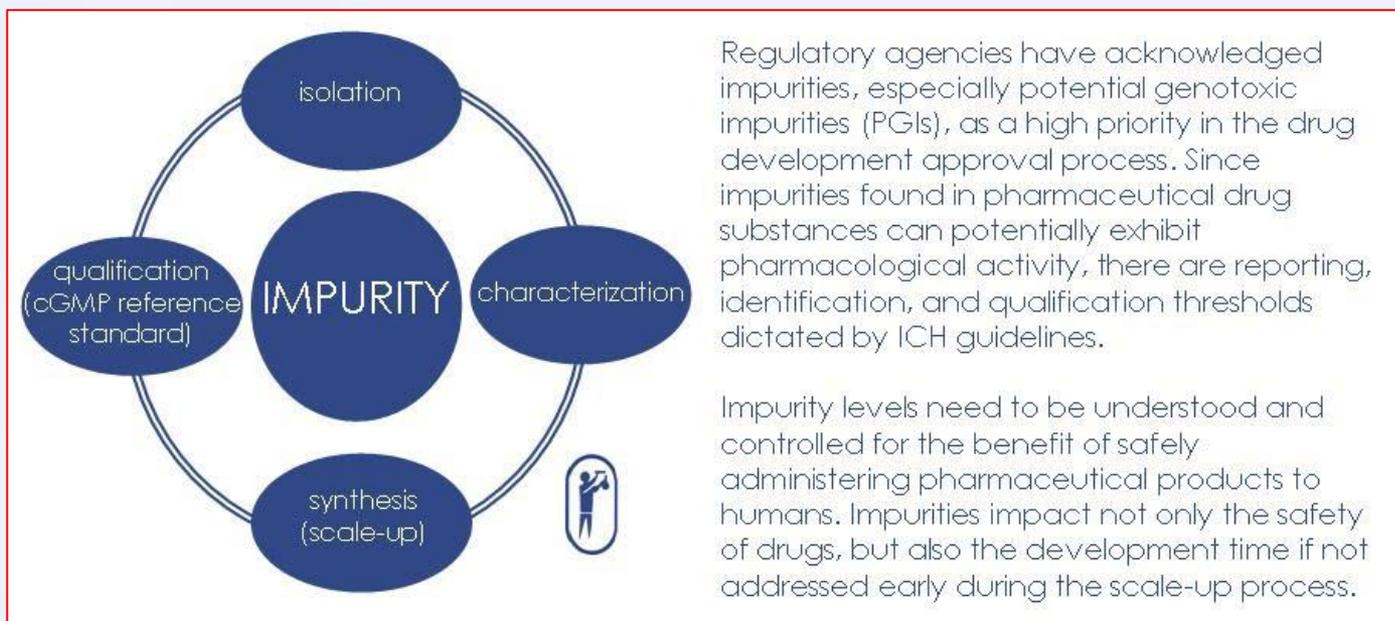
Threshold and non threshold mechanism of action

L'approccio TTC (Threshold of Toxicological Concern)

I nuovi approcci di predizione (QSAR): metodi, vantaggi e limiti



Regulatory Agencies worldwide and genotoxic impurities



Regulatory agencies have acknowledged impurities, especially potential genotoxic impurities (PGIs), as a high priority in the drug development approval process. Since impurities found in pharmaceutical drug substances can potentially exhibit pharmacological activity, there are reporting, identification, and qualification thresholds dictated by ICH guidelines.

Impurity levels need to be understood and controlled for the benefit of safely administering pharmaceutical products to humans. Impurities impact not only the safety of drugs, but also the development time if not addressed early during the scale-up process.

La ricerca tossicologica

TOSSICOLOGIA

La tossicologia è la branca della farmacologia, il cui interesse si estende anche alla chimica, che studia sintomi, meccanismi e trattamenti degli avvelenamenti di persone e animali ad opera di sostanze chimiche o farmaci

*Il principale parametro per determinare la tossicità di una sostanza è la **dose**. Quasi tutte le sostanze, in certe dosi o in determinate circostanze possono essere tossiche.*

Quest'ultimo concetto è ben riassunto dalla frase attribuibile a Paracelso:

"OMNIA VENENUM SUNT NEC SINE VENENO QUICQUAM EXISTIT. DOSIS SOLA FACIT UT VENENUM NON FIT"

"ogni cosa è veleno, non esiste cosa che non lo sia. Solo la dose fa sì che una sostanza non divenga veleno"

E' sempre più comune!!

*The safety evaluation, in general, should be the results of
A **structured scientific evaluation** of **all** available
pharmacological and toxicological data including both
non clinical and clinical data.*

Substance- based toxicological evaluation

Metodi alternativi



“Three Rs” Principle to reduce animals in the testing.

- **Refinement** reduce the suffering of animals
- **Reduction** reduce the number of animals keeping the same level of information (ex. LLNA)
- **Replacement** in order to eliminate the animals as entire body and replace with other systems (ex. cells, tissue) the same level of information (problem!!)

Up to date:

- *Cytotoxicity (for cosmetics)*
- *Irritation studies (validated and used for screening)*
- *Ocular irritation (BCOP = Bovine Corneal opacity)*

Under development:

- Various Cells culture with different tissues to replace the acute oral toxicity
- Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) skin for sensitization
- Metodi “in silico” : **QSAR** (Quantitative Structure-Activity Relationship)
- Family approach and Read across

TOSSICOLOGIA GENETICA (Genotossicità)

studi *“in vitro”* ed *“in vivo”* per stabilire il possibile danno al materiale genetico (DNA) che si esplica con :

- errori di riparo
 - mutazioni geniche e citogenetiche
 - morte cellulare
- batteria di test che vengono eseguiti con un ***approccio step by step*** per confermare il risultato osservato nel test precedente

Mutagenesi e cancro

- danno al DNA riconosciuto e riparato
 - danno al DNA riconosciuto e non riparato progredisce al tumore
 - danno al DNA non riconosciuto progredisce al tumore
- quindi non sempre vi è una stretta relazione tra mutagenesi e sviluppo canceroso*

LA GENOTOSSICITA'

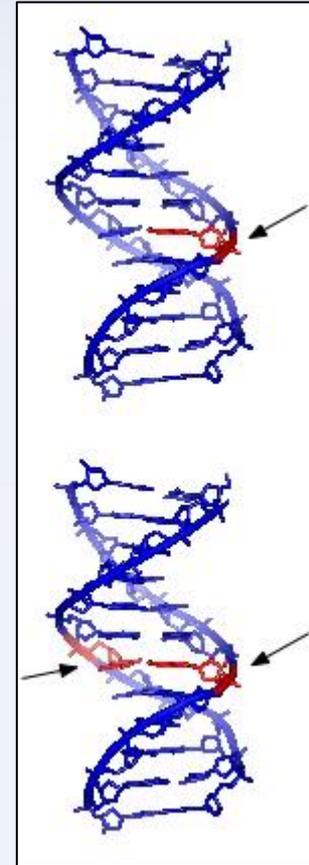
DEFINIZIONE

La **genotossicità** è la capacità di una sostanza di indurre modificazioni all'interno della sequenza nucleotidica e della struttura del DNA di un organismo.

In genetics, genotoxicity describes the property of chemical agents that **damages** the genetic information within a cell causing, in some cases, **mutations** which may lead to cancer.

Genotoxicity is often confused with mutagenicity!

All mutagens are genotoxic however, not all genotoxic substances are mutagenic.

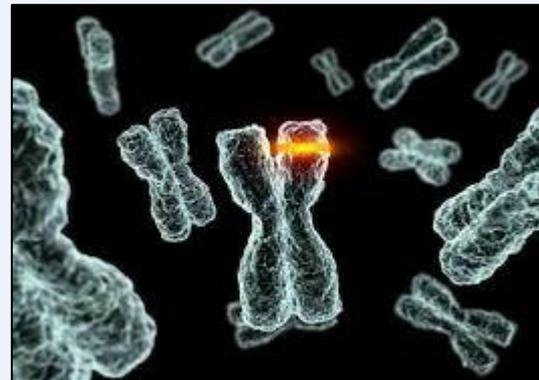
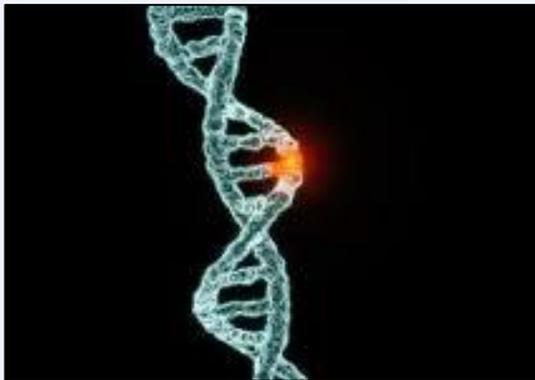


GENOTOXIC

The genotoxic substances induce **damage** to the genetic material in the cells through interactions with the **DNA sequence** and **structure**.

MUTAZIONE (Processo di mutagenesi)

Processo attraverso il quale possono avvenire variazioni all'interno del materiale genetico di un determinato organismo.



Le mutazioni possono avvenire a livello di:

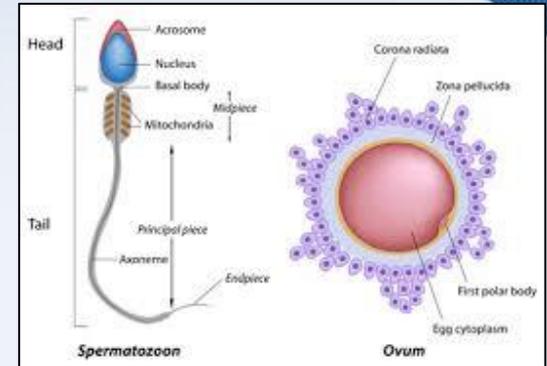
Cellule germinali (*cellula uovo o spermatozoo*)

intervengono quindi su materiale genetico.

Trasmissibilità alla linea discendente con probabilità che la mutazione venga trasmessa alla prole (discendenza), **Mutazioni della linea germinale**

Cellule somatiche cioè cellule che vanno a formare i tessuti che costituiscono gli organi e/o apparati di organismo complessi. **Mutazioni somatica**

Possibilità di sviluppo di neoplasie (tumori)



PROCESSI DI MUTAGENESI

Il materiale genetico (DNA) delle cellule è soggetto a possibili mutazioni che possono dividersi in:

Mutazioni endogene (mutazioni spontanee) avvengono naturalmente negli organismo cellulari a seguito di :

- Errori di duplicazione del DNA durante la meiosi o la mitosi
- Cambiamenti chimici spontanei del DNA

In genere non sono dannose, a volte sono vantaggiose (Darwin)

Mutazioni esogene sono conseguenza dell'azione di un agente esterno che può essere essenzialmente di origine:

Chimica (sostanza estranea all'organismo)

Fisica (radiazioni ad alta energia, micro-onde, radiazioni nucleari)

PROCESSI DI MUTAGENESI

Le mutazioni in base all'ampiezza del cambiamento possono essere:

geniche: uno o più nucleotidi

cromosomiche: uno o più cromosomi

genomiche: intero genoma.

Nota

Le mutazioni sono gli elementi di base grazie ai quali possono svolgersi i **processi evolutivi**. Esse determinano infatti la cosiddetta **variabilità genetica**, ovvero la condizione per cui gli organismi differiscono tra loro per uno o più caratteri. Su questa variabilità, tramite la ricombinazione genetica, opera la **selezione naturale**, la quale promuove le mutazioni favorevoli a scapito di quelle sfavorevoli o addirittura letali. Essendo una parte delle mutazioni non favorevoli, gli organismi hanno sviluppato diversi meccanismi per la **riparazione del DNA** dai vari danni che può subire, riducendo in questo modo il tasso di mutazione.



LE MUTAZIONI GENICHE

Sono le mutazioni che alterano un singolo gene e dunque le più "piccole" che si conoscono.

Mutazioni puntiformi: alterano una singola coppia di basi azotate del DNA:

- **sostituzioni:** una copia di basi è sostituita da un'altra coppia
- **Inserzioni:** acquisizione di una o più coppie di basi
- **Delezioni:** perdita di una o più coppie di basi

Meccanismi

Analoghi di basi: sostanze simili alle basi azotate che si inseriscono

Agenti che modificano chimicamente le basi azotate:

- *deaminanti*
- *idrossilanti, aggiunta di OH*
- *alchilanti produzione di addotti*

Agenti intercalanti: si inseriscono tra due basi azotate o tra due eliche del DNA

RIPARO DEL DNA

E' un meccanismo altamente sofisticato ed efficiente.

Essenziale alla sopravvivenza in quanto protegge il genoma da danni e mutazioni nocive

Dopo aver subito una mutazione una cellula può:

- Riparare il danno e ricostruire la molecola del DNA come se la mutazione non fosse avvenuta
- Riparare il danno ma non nella forma originale, possono quindi verificarsi errori



CANCRO

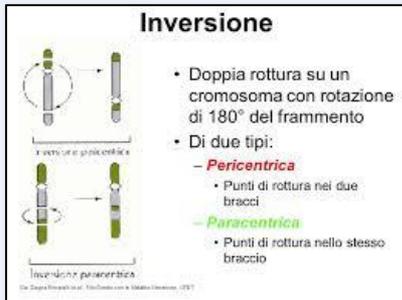
- Morire prima che avvenga la riparazione, la mutazione viene eliminata



APOPTOSI

LE MUTAZIONI CROMOSOMICHE (Citogenetiche)

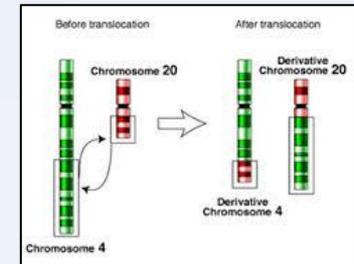
Dette anche **anomalie cromosomiche** quando è la struttura di uno o più cromosomi ad essere alterata. Possono essere di sei tipi.



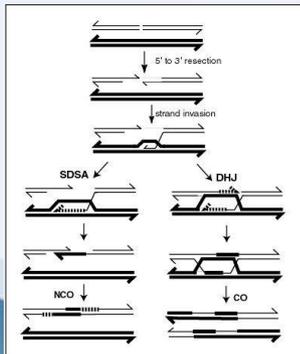
Delezioni o duplicazioni

Inversioni

Traslocazioni



Conversioni geniche



Trasposizioni



Ad anello



LE MUTAZIONI GENOMICHE (intero DNA)

Dette anche *mutazioni cromosomiche numeriche*

Consiste nella variazione del numero di cromosomi e si divide in :

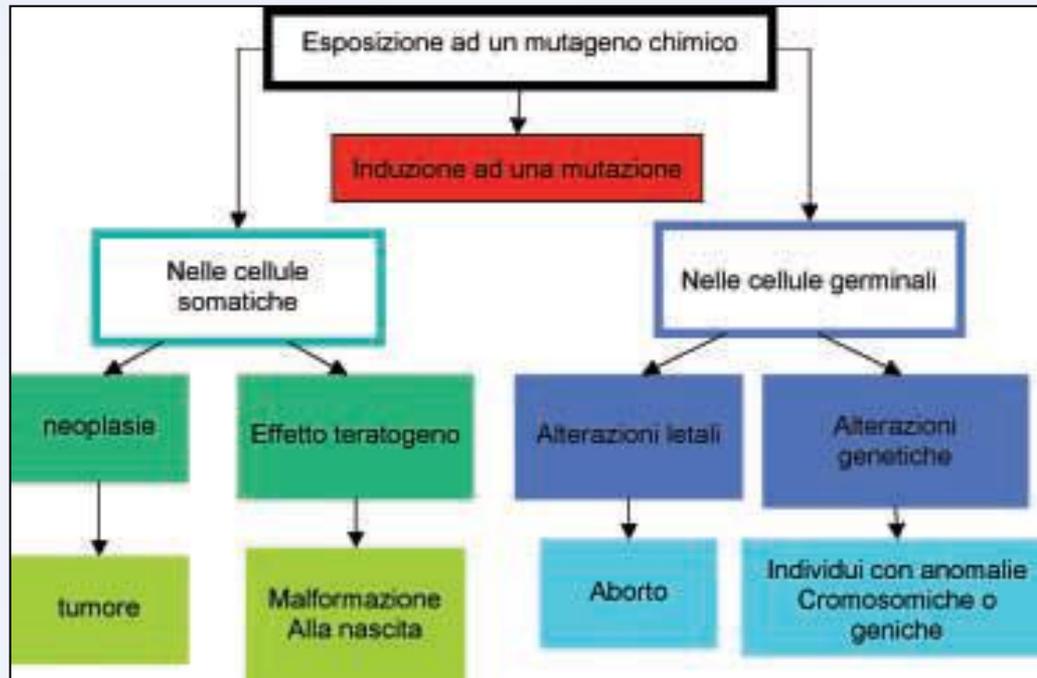
ANEUPLODIA: la perdita o l'aggiunta di uno o più cromosomi rispetto all'assetto cromosomico normale (2N)

- la nullisomia che implica la perdita di una coppia di cromosomi omologhi;
- la monosomia che implica la perdita di un singolo cromosoma;
- la trisomia che consiste nell'aggiunta di un cromosoma ad una coppia di omologhi (es. Sindrome di Down, non letale)
- la tetrasomia che consiste nell'aggiunta di una coppia cromosomica al normale assetto.

MONOPLOIDIA: presenza di un solo assetto cromosomico (1N)

POLIPLOIDIA: presenza di più assetti cromosomici, es. 3N, 4N (in genere letale)

LA MUTAGENESI CHIMICA e le conseguenze



MUTAGENESI E CANCRO

Un agente cancerogeno agisce sul DNA per azione:

Diretta  agente genotossico

Indiretta  agente epigenetico

CANCEROGENI GENOTOSSICI sono composti DNA reattivi (es. mutageni)

CANCEROGENI EPIGENETICI l'effetto cancerogeno è dovuto ad altri fenomeni (es. citotossicità, danno ai tessuti, sbilanciamenti ormonali, effetti immunologici) che provocano danni **indiretti** al DNA

- *sintesi poco accurata*
- *aberrazioni cromosomiche*

Quindi equazione mutagenesi = cancerogenesi non sempre valida

(vedi anche processi di riparo)

QUADRO NORMATIVO

A) Per testing su pharma e valutazione dei risultati

ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use

Sostituisce le vecchie:

ICH S2A: *Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity test for pharmaceuticals*

ICH S2B: *A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceutical*

Adottata da EMA on June 2012 [**EMA/CHMP/ICH/126642/2008**](#)

B) Su impurezze genotossiche

ICH M7 – Assessment and control of DNA Reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk

A) Genotoxic standard testing battery on pharma products

Approccio graduale (tiered)

test “in vitro”, in vivo” “ex vivo”

- Studio di mutagenesi batterica “in vitro” **AMES**, OECD 471
- Studio di aberrazioni cromosomiche “in vitro” **CA**, OECD 473
- Studio di aberrazioni cromosomiche “in vivo” **CA** OECD 475
- Studio di mutazione genica “in vitro” **MLA**, OECD 476
- Studio del micronucleo “in vitro”, **MNO** OECD 487
- Studio del micronucleo “in vivo” **MNO**, OECD 474
- Studio della sintesi non programmata di DNA, **UDS** “ex vivo”, OECD 482
- In vivo mammalian alkaline **Comet Assay**, “ex vivo”, OECD 489

Studio di mutagenesi batterica “*in vitro*” **AMES**, OECD 471

- test system (batteri) :

- 5 ceppi di Salmonella Typhimurium (EU)

TA100, TA1535, TA102, TA98, TA 1537

- 4 ceppi di Salmonella T. + 1 ceppo di E. Coli (Japan)

- con e senza attivatore metabolico (microsomi)

- in duplicato

- endpoint : verifica della mutazione delle cellule nell’adattarsi ad un substrato nutritivo specifico (revertants)

Limiti : il risultato non è predittivo per il possibile effetto nell’uomo; le cellule utilizzate sono batteri.

Ottimo per screening

Studio di mutagenesi batterica “in vitro” **AMES**, OECD 471

Conduzione del Test

*Il test viene effettuato piastrando i batteri su un terreno solido di agar contenente una minima quantità di **istidina**, e ponendo al centro della piastra un disco contenente la sostanza in esame, che può in questo modo **diffondersi** nel terreno di coltura.*

*La presenza delle tracce di amminoacido nel terreno permette di individuare mutazioni che richiedano più cicli di duplicazione cellulare per manifestarsi **fenotipicamente**, come nel caso di mutazioni puntiformi su una singola elica di DNA.*

*La frequenza delle mutazioni ottenute viene valutata in base alla distanza dal disco dopo **48 ore** di crescita, in rapporto ad una piastra di controllo in cui i batteri sono stati fatti crescere sullo stesso terreno, ma in assenza del sospetto mutageno; il raffronto delle due piastre consente di eliminare dal risultato del test l'effetto dovuto alla presenza di **revertanti spontanei**.*

*Il test per una sostanza viene sempre condotto in parallelo su differenti ceppi di Salmonella, in cui **l'auxotrofia** (capacità di sintetizzare in proprio un determinato nutriente) è dovuta a differenti tipi di mutazioni (mutazioni puntiformi di diverso tipo, o mutazioni di frameshift come inserzioni o delezioni) per individuare il tipo di effetto causato al DNA.*

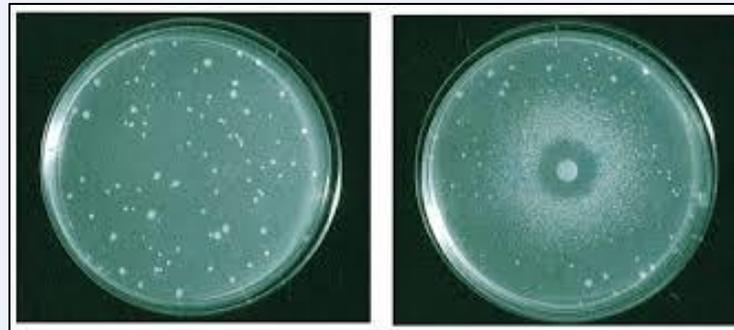
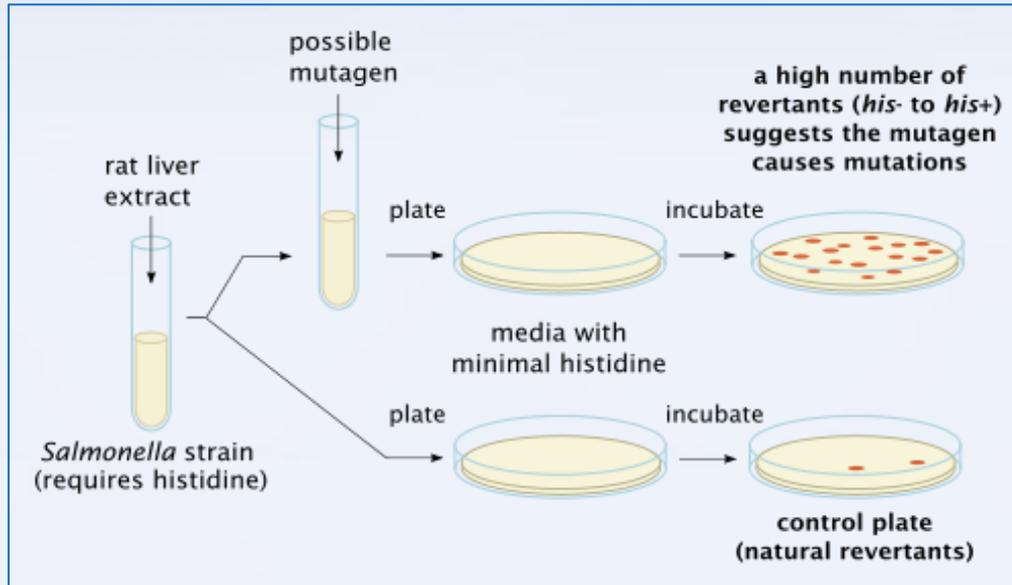
Studio di mutagenesi batterica “*in vitro*” **AMES**, OECD 471

Promutageni

Il limite principale del primo test di Ames era l'impossibilità di valutare l'effetto genotossico dei **promutageni**, ovvero sostanze che non presentano un proprio effetto mutageno, ma diventano tossiche a seguito del metabolismo subito negli organismi superiori; esempi di queste sostanze sono gli idrocarburi aromatici o le ammine aromatiche.

Per superare questo problema, si utilizza un protocollo differente che prevede la presenza nel terreno di coltura dell'estratto di fegato di ratto, in cui sono presenti gli **enzimi** coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici (principalmente isoforme del citocromo P450), che possono attivare l'effetto genotossico del promutageno. In questo caso la sostanza da esaminare viene aggiunta direttamente al terreno di coltura.

Studio di mutagenesi batterica “*in vitro*” **AMES**, OECD 471



Studio di mutagenesi batterica “*in vitro*” **AMES**, OECD 471

Limiti

Predittività nell'uomo

Essendo condotto in cellule batteriche, il test di Ames non consente di valutare la capacità dei mutageni di alterare il DNA **umano**, per cui non può **da solo** costituire un elemento sufficiente di valutazione del rischio genotossico, ma va eseguito insieme a test su cellule eucariote (test dei micronuclei, test della cometa, quantificazione degli addotti al DNA) e con studi in vivo.

Vi è comunque una **certa correlazione** fra l'effetto mutageno riscontrato nel test di Ames e la cancerogenicità della sostanza negli organismi superiori.

Essa va comunque presa con cautela!!

A) Testing su pharma e valutazione dei risultati

ICH guideline S2 (R1) EMA/CHMP/ICH/126642/2008

Due opzioni:

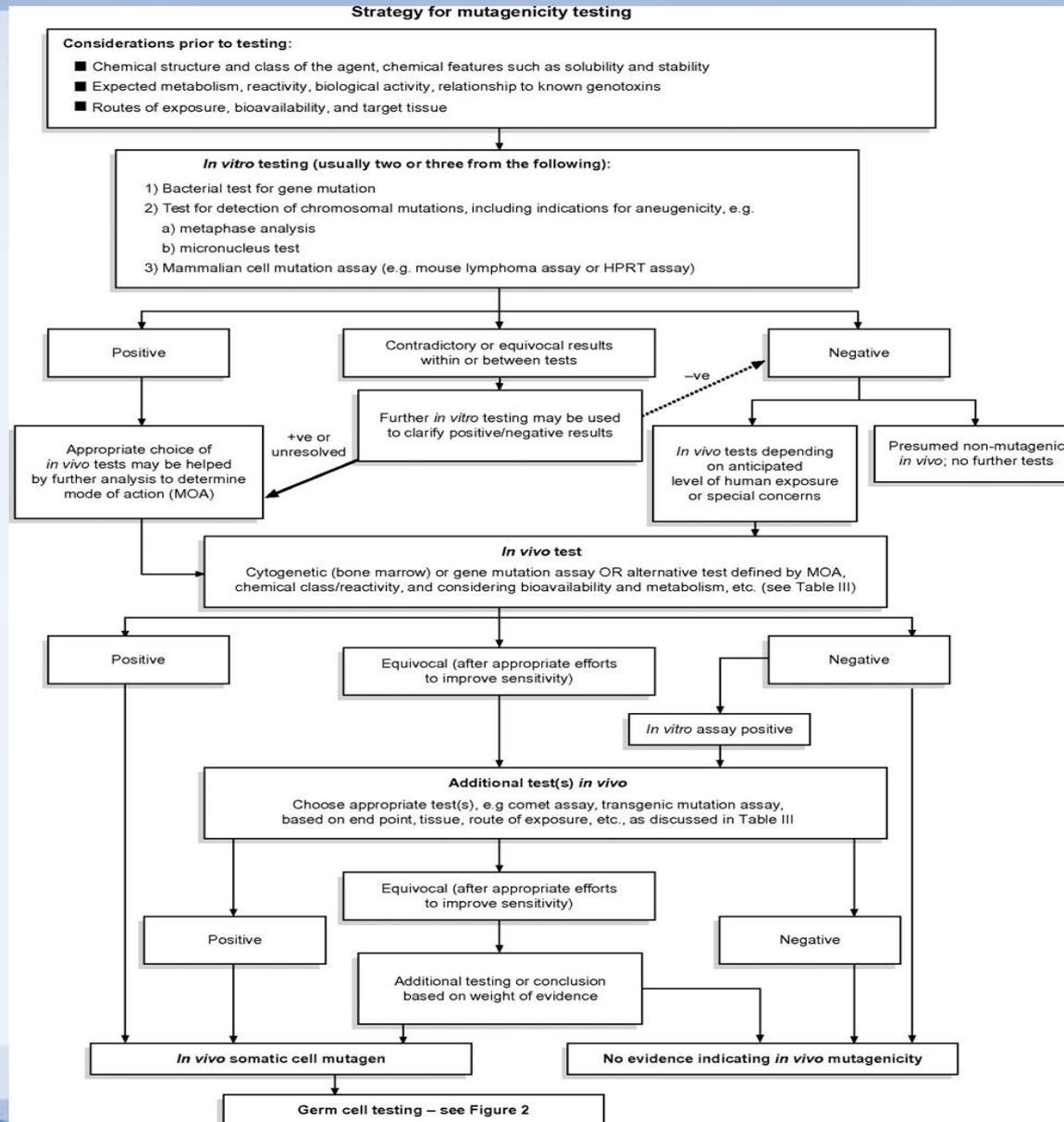
Opzione 1 (2 test “in vitro” + 1 test “in vivo”)

- Un test “in vitro” per la mutazione genica nei batteri, **Ames Test**, OECD 471
- Un test “in vitro” di citogenetica per il danno cromosomiale (**aberrazione cromosomica** in metafase, OECD 473 o test del **micronucleo** in vitro, OECD 487) o un test del **Mouse Lymphoma** Tk gene mutation (mutagenesi e citogenetica), OECD 476
- Un test “in vivo” per le genotossicità per il danno cromosomico con cellule ematopoietiche (**micronucleo** o **aberrazione cromosomica**)

Opzione 2 (1 test “in vitro” + 2 test “in vivo” su due tessuti)

- Un test “in vitro” per la mutazione genica nei batteri, **Ames Test**, OECD 471
- Un test “in vivo” per il danno cromosomico usando cellule ematopoietiche di roditore, **Test del micronucleo** (OECD 474)
- Un secondo test “in vivo” con un secondo tessuto. Tipicamente un Test della **sintesi del DNA** su cellule di fegato di roditore. Unscheduled DNA synthesis on liver cells, OECD 482.

Valutazione dei risultati



**3 test "in vitro"
di partenza**

ICH Guideline M7 by MoA

Assessment and Control of DNA Reactive (*mutagenic*) Impurities in Pharmaceuticals to limit Potential Carcinogenic Risk, 2013

Foreword and scope

The synthesis of drug substances involves the use of reactive chemicals, reagents, solvents, catalysts and other processing aids. As a results of chemical synthesis or subsequent degradation impurities reside in all drug substances and associated drug products.

This guideline emphasizes considerations of both safety and quality risk management in establishing levels of mutagenic impurities that are expected to pose negligible carcinogenic risk.

Substances not covered by the guideline:

- *Biological/biotechnological*
- *Peptide*
- *Oligonucleotide*
- *Radiopharmaceuticals*
- *Fermentation products*
- *Herbal products*
- *Crude products of animals or plant origin*
- *Products intended for advanced cancer indications (themselves mutagenic)*

CLASSES OF IMPURITIES

Two general classes of genotoxic impurities

Genotoxic compounds *with* sufficient (experimental) evidence for a **threshold** related mechanism

5.1 Genotoxic Compounds With Sufficient Evidence for a Threshold-Related Mechanism

Examples of mechanisms of genotoxicity that may be demonstrated to lead to non-linear or thresholded dose-response relationships include interaction with the spindle apparatus of cell division leading to aneuploidy, topoisomerase inhibition, inhibition of DNA synthesis, overloading of defence mechanisms, metabolic overload and physiological perturbations (e.g. induction of erythropoiesis, hyper- or hypothermia).

For (classes of) compounds with clear evidence for a thresholded genotoxicity, exposure levels which are without appreciable risk of genotoxicity can be established according to the procedure as outlined for class 2 solvents in the Q3C Note for Guidance on Impurities: Residual Solvents. This approach calculates a "Permitted Daily Exposure" (PDE), which is derived from the NOEL, or the lowest-observed effect level (LOEL) in the most relevant (animal) study using "uncertainty factors" (UF).

Genotoxic compounds *without* sufficient (experimental) evidence for a **threshold** related mechanism

5.2 Genotoxic Compounds Without Sufficient Evidence for a Threshold-Related Mechanism

The assessment of acceptability of genotoxic impurities for which no threshold mechanisms are identified should include both pharmaceutical and toxicological evaluations. In general, pharmaceutical measurements should be guided by a policy of controlling levels to "as low as reasonably practicable" (ALARP principle), where avoiding is not possible. Levels considered being consistent with the ALARP principle following pharmaceutical assessment should be assessed for acceptability from a toxicological point of view (see decision tree & following sections).

CLASSES OF IMPURITIES

Genotoxic compounds *with* sufficient (experimental) evidence for a **threshold** related mechanism

Generalmente non mutageni

Non pongono problemi di rischio di cancerogenesi nei livelli presenti come impurezze

Calcolo del **PDE** introducendo **fattori di incertezza**.

Genotoxic compounds *without* sufficient (experimental) evidence for a **threshold** related mechanism

Possono essere mutageni

Applicare l'approccio **TTC**

TTC (Threshold of Toxicological Concern)

E' un valore soglia concepito per determinare un valore di riferimento (acceptable intake) di un determinato chemical (non studiato sperimentalmente) che non pone rischi di cancerogenesi o altri effetti tossici per l'intera vita

Valore = 1.5 µg/die

corrispondente ad un teorico 10⁻⁵ rischio di cancro per l'intera vita (1 caso su 100.000 individui). E' considerato molto conservativo, proviene da estrapolazioni statistiche di tumori indotti con potenti cancerogeni.

Nota

Eccedere il TTC può essere ammesso se la sostanza è nota non essere un cancerogeno in studi su animali anche se classificato come mutageno (effettuare un risk assessment)

Concentrazione dell'impurezza

Può quindi essere calcolata con la formula.

$$\text{Limite di concentrazione impurezza (ppm)} = \frac{\text{TTC } (\mu\text{g/die})}{\text{dose (g/die)}}$$

HAZARD ASSESSMENT – Type of impurities

Class	Definition	Proposed action for controls
1	Known mutagenic carcinogens	Control at or below compound-specific acceptable limits
2	Known mutagens with unknown carcinogenic potential (bacterial mutagenicity positive or other , no rodent carcinogenic data)	Control at or below acceptable limits (generic or adjusted TTC)
3	Alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance, no mutagenicity data	Control at or below acceptable limits (generic or adjusted TTC) or do bacterial mutagenicity Assay: If not mutagenic = class 5 If mutagenic = class 2
4	Alerting structure, same alert in the drug substance which has been tested and it's not mutagenic	Treat as non mutagenic impurities
5	No structural alerts or alerting structure with sufficient data to demonstrate lack of mutagenicity	Treat as non mutagenic impurities

HAZARD approach

Per incasellare l'impurezza studiata nella tabella precedente bisogna:

Verificare proprietà cancerogene e mutagene ricercando dati in letteratura



Classi 1,2 e 5

Applicare approcci di allerta strutturale (**SAR: Structure Activity Relationship**)



Classi 3, 4 e 5

CLASSI DI IMPUREZZE GENOTOSSICHE

Riferimenti bibliografici

L. Mueller et al.

A rationale for determining, testing and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity

Regul. Toxicol. Phar. 44 (3) pp 198-211 (2006)

D. Snodin

EU Guideline on genotoxic impurities needs updating

R.A. J. Pharma, 19(9), 2008 p. 253

D. Snodin

EU Guideline on genotoxic impurities needs updating, Part II

R.A. J. Pharma, 19(10), 2008 p. 663

CLASSI DI IMPUREZZE GENOTOSSICHE

CLASSE 1

Impurities known to be genotoxic and carcinogenic.

Sono note essere cancerogene in studi animali con dati certi per meccanismi di mutagenesi e anche note per essere cancerogene nell'uomo

Obiettivo : eliminazione dal prodotto finale

Se non possibile:

a) effettuare un compound-specific risk assessment al fine di derivare livelli accettabili di esposizione (PDE) sulla base di dati di cancerogenesi nell'animale. Non si usa l'approccio TTC.

b) Usare dei valori di acceptable intakes già pubblicati da autorità regolatorie.

CLASSI DI IMPUREZZE GENOTOSSICHE

CLASSE 2

Known mutagens with unknown carcinogenic potential.

Mostrano un positività al test di mutazione genica batterica (Ames) o altri test ma non hanno dati di cancerogenesi nell'animale roditore

Obiettivo: conoscere il livello safe

a) *effettuare un compound-specific risk assessment al fine di derivare livelli accettabili di esposizione (PDE) sulla base di dati di cancerogenesi nell'animale. Non si usa l'approccio TTC.*

b) *Usare dei valori di acceptable intakes già pubblicati da autorità regolatorie.*

c) *Se non si ha meccanismo di azione threshold, applicare TTC*

CLASSI DI IMPUREZZE GENOTOSSICHE

CLASSE 3

Alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance, no mutagenicity data.

La loro possibile potenzialità genotossica è legata a considerazioni sulla struttura (gruppi funzionali etc.) ma non sono state testate.

Obiettivo: conoscere il livello safe

a) Usare l'approccio TTC (generico e aggiustato)

b) Effettuare test di mutagenesi batterica (Ames) e, in base ai risultati, riassegnare le classi 2 o 5)

CLASSI DI IMPUREZZE GENOTOSSICHE

CLASSE 4

Alerting structure, same alert in the drug substance which has been tested and not mutagenic

Sono impurezze che contengono un gruppo funzionale di allerta condiviso con l'API ma che testato non viene considerato mutagenico

Obiettivo: conoscere il livello safe

a) Usare gli studi effettuati su API e, in base ai risultati, riassegnare in classe 5

CLASSI DI IMPUREZZE GENOTOSSICHE

CLASSE 5

No structural alerts or alerting structure with sufficient data to demonstrate lack of mutagenicity

Sono impurezze che NON contengono un gruppi funzionali di allerta e posseggono dati sufficienti che dimostrano assenza di mutagenesi.

Obiettivo: trattarle come impurezze ordinarie (ICH Q3, A, B and C)

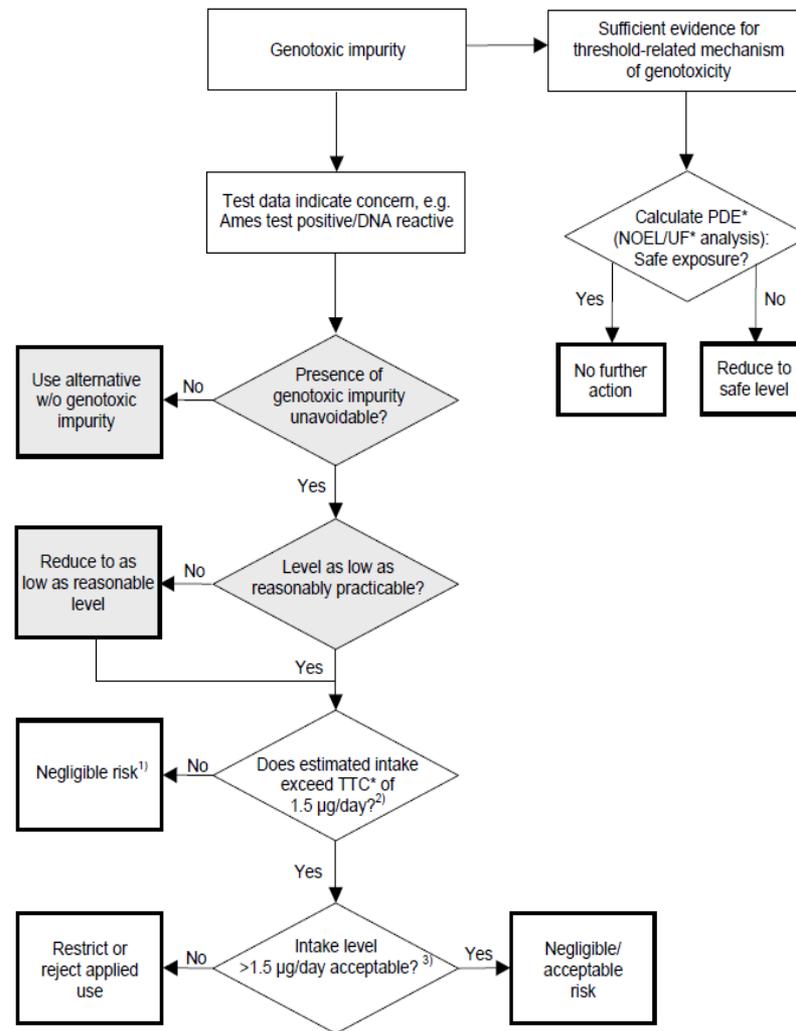
Decision Tree for Assessment of Acceptability of Genotoxic impurities

Caselle in **grassetto**: valutazione tecnica farmaceutica

Caselle normali: valutazione tossicologica

Guidance on the limits of genotoxic impurities

London 28 June 2006
 EMEA/CHMP/QWP/251344/2006



- 1) Impurities with structural relationship to high potency carcinogens (see text) are to be excluded from the TTC approach
- 2) If carcinogenicity data available: Does intake exceed calculated 10^{-5} cancer lifetime risk?
- 3) Case-by-case assessment should include duration of treatment, indication, patient population etc (see text)

*) Abbreviations: NOEL/UF – No Observed Effect Level/Uncertainty Factor,
 PDE – Permitted Daily Exposure, TTC – Threshold of Toxicological Concern

IMPUREZZE (Reporting, Identification, qualification)

**ICH Q3A Impurities in a
new *drug substance*
revision 2
2008**

Maximum Daily Dose ¹	Reporting Threshold ^{2,3}	Identification Threshold ³	Qualification Threshold ³
≤ 2g/day	0.05%	0.10% or 1.0 mg per day intake (whichever is lower)	0.15% or 1.0 mg per day intake (whichever is lower)
> 2g/day	0.03%	0.05%	0.05%

¹ The amount of drug substance administered per day

² Higher reporting thresholds should be scientifically justified

³ Lower thresholds can be appropriate if the impurity is unusually toxic

SAR: Structure Activity Relationship

Si tratta di sistemi computazionali che permettono di predire effetti avversi in base alla struttura chimica della impurezza. Modelli matematici che si applicano per mezzo di software

Q(SAR): Quantitative Structure Activity Relationship

Si applicano alla mutagenicità batterica (**Ames test**)

Devono essere applicati almeno due metodi che si complementano:

- Sistemi esperti (rule-based expert)
- Sistemi statistici (statistical-based)

La valutazione deve essere munita di valutazione dell'affidabilità del modello (reliability) e validazione del modello in base ai principi dell'OECD.

Organisation for Economic Co-operation and Development. Report on the Regulatory Uses and Applications in OECD Member Countries of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models in the Assessment of New and Existing Chemicals. ENV/JM/MONO(2006)25, OECD, Paris, France 2007. Available from: <http://www.oecd.org/>.

L'approccio del **consenso** è normalmente applicato.

L'assenza di alert in entrambi i sistemi porta alla conclusione che l'impurezza non è "of concern", classe 5, nessun altro studio è necessario.

SAR: Structure Activity Relationship

Sistemi esperti (rule-based expert)

The QSAR expert rule-based method relies on rules derived from **toxicological knowledge**, which are likely to have strong **mechanistic basis**; it is also known as **knowledge-based system**. In the expert rule-based systems, human experts identify structural **fragments**, which can be related to the effect. The examination of a series of chemicals sharing the same fragment is used to detect the toxic effect (genotoxic or not, for instance); the chemical information is simply the fragment and the algorithm is, in this case, the rule.

The expert rule-based systems have several advantages, i.e. they are mechanistically connected to the predicted activity and therefore they provide reasoning for the predictions and in many cases support the prediction with literature references or expert knowledge. However, they also have some disadvantages: their applicability domain is often restricted and/or ill-defined; usually they cannot explain differences of the activity within a chemical class and usually they have lower accuracy of the prediction than statistical models.

SAR: Structure Activity Relationship

Sistemi statistici (statistical-based)

The statistical-based QSAR method is a **quantitative** (mathematical) relationship between **a numerical representation of chemical structure and a biological effect/activity**. It often takes the form of regression equation, and can make predictions of effects/activities that are either on a continuous scale or on a categorical scale. Thus, in the term “QSAR”, the qualifier “quantitative” refers to the nature of the relationship, not the nature of the effect/activity being predicted. Statistical-based QSARs are models based on the data, which extract the knowledge directly through a process of data mining and knowledge engineering. Statistical-based QSARs have several advantages, i.e. they can incorporate information which has not yet been codified by human experts, and therefore they can be employed for preliminary research when the mechanism of action is unknown and they provide highly accurate predictions. On the other hand, they have some disadvantages: their predictions can be difficult to be interpreted, especially when they are based on complex algorithm and molecular descriptors; they do not provide mechanistically reasoning of their predictions and they might be non-transparent to the end-user. The predictions gained by the QSAR statistical-based method were evaluated in terms of their **reliability**, as required by OECD principles for the validation, for regulatory purposes, of QSARs. The assessment of the reliability of a QSAR prediction is critical and is therefore a main requirement for the prediction to be accepted by regulatory authorities and initiatives. Therefore, each prediction was provided together with the information on the applicability domain of the model used to derive it. If the impurity was outside the applicability domain of the applied model, the prediction was considered not reliable.

LE PREDIZIONI “in silico”

Q(SAR): Quantitative Structure Activity Relationship
Genotoxicity

<i>End-point</i>	<i>Predittore</i>
<i>Microbial in vitro salmonella</i>	ACD percepta/Toxtree, Leadscope, Vega
<i>Microbial in vitro E. Coli</i>	ACD percepta, Leadscope
<i>Mammalian in vitro Mouse Lymphoma</i>	ACD percepta, Leadscope
<i>Mammalian in vitro CHO V79 hgprt</i>	ACD percepta/Toxtree
<i>Mammalian in vivo rodent mutation</i>	Leadscope
<i>Chromosome aberrations in vitro composite</i>	ACD percepta, Leadscope
<i>Chromosome aberration in vitro CHO</i>	Leadscope
<i>Chromosome aberrations in vitro HL</i>	Leadscope
<i>Chromosome aberration in vitro other rodents</i>	Leadscope
<i>Chromosome aberration in vivo rat</i>	Leadscope
<i>Chromosome aberration in vivo composite</i>	ACD percepta, Leadscope
<i>Micronucleus in vivo mouse</i>	Leadscope
<i>Micronucleus in vivo rodent</i>	Leadscope, Toxtree, ACD Percepta

LE PREDIZIONI “in silico”

Q(SAR): Quantitative Structure Activity Relationship

Local effects

<i>End-point</i>	<i>Predittore</i>
<i>Skin irritation</i>	ACD percepta/Toxtree
<i>Skin corrosion</i>	Toxtree
<i>Eye irritation</i>	ACD percepta/Toxtree
<i>Eye corrosion</i>	Toxtree
<i>Skin sensitisation, LLNA</i>	Toxtree, Vega

LE PREDIZIONI “in silico”

Q(SAR): Quantitative Structure Activity Relationship
Carcinogenicity

<i>End-point</i>	<i>Predittore</i>
<i>Carcinogenicity rodent (composite)</i>	ACD Percepta, Leadscope
<i>Carcinogenicity mouse (composite)</i>	ACD Percepta, Leadscope
<i>Carcinogenicity mouse male</i>	ACD Percepta, Leadscope
<i>Carcinogenicity mouse female</i>	ACD Percepta, Leadscope
<i>Carcinogenicity rat (composite)</i>	ACD Percepta, Leadscope
<i>Carcinogenicity rat male</i>	ACD Percepta, Leadscope
<i>Carcinogenicity rat female</i>	ACD Percepta, Leadscope
<i>Carcinogenicity</i>	Toxtree, Vega, OECD QSAR Tollbox

LE PREDIZIONI “in silico”

Q(SAR): Quantitative Structure Activity Relationship

Acute effects

<i>End-point</i>	<i>Predittore</i>
<i>Acute toxicity mouse oral</i>	ACD Percepta
<i>Acute toxicity rat oral</i>	ACD Percepta

LE PREDIZIONI “in silico”

Q(SAR): Quantitative Structure Activity Relationship

Reproductive toxicity 1

<i>End-point</i>	<i>Predittore</i>
<i>Reproductive toxicity mouse female</i>	Leadscope
<i>Reproductive toxicity mouse male</i>	Leadscope
<i>Reproductive toxicity rat female</i>	Leadscope
<i>Reproductive toxicity rat male</i>	Leadscope
<i>Reproductive toxicity rodent female</i>	Leadscope
<i>Reproductive toxicity rodent male</i>	Leadscope
<i>Developmental toxicity binary FDA class.</i>	Leadscope
<i>Structural dysmorphogenesis rabbit</i>	Leadscope
<i>Structural dysmorphogenesis rat</i>	Leadscope
<i>Structural dysmorphogenesis rodent</i>	Leadscope
<i>Structural dysmorphogenesis mouse</i>	Leadscope

LE PREDIZIONI “in silico”

Q(SAR): Quantitative Structure Activity Relationship

Reproductive toxicity 2

<i>End-point</i>	<i>Predittore</i>
<i>Fetal death mouse</i>	Leadscope
<i>Fetal death rabbit</i>	Leadscope
<i>Fetal death rat</i>	Leadscope
<i>Fetal death rodent</i>	Leadscope
<i>Post implantation loss mouse</i>	Leadscope
<i>Post implantation loss rabbit</i>	Leadscope
<i>Post implantation loss rat</i>	Leadscope
<i>Post implantation loss rodent</i>	Leadscope
<i>Pre implantation loss mouse</i>	Leadscope
<i>Pre implantation loss rabbit</i>	Leadscope
<i>Pre implantation loss rat</i>	Leadscope
<i>Pre implantation loss rodent</i>	Leadscope

CONCLUSIONI

Le impurezze genotossiche devono essere **conosciute** e **qualificate**.



Conoscere la **struttura** dell'impurezza è fondamentale non solo per le azioni di reporting ed identificazione ma altresì per l'impostazione di indagini *"in silico"*

In caso di qualifica:

- a)** Impostare protocolli di studio *"in silico"* per gli end-points ricercati (es. mutagenesi batterica, citogenetica)
- b)** Valutare attentamente i risultati adottando un approccio *"step by step"*
- c)** Attivare test *"in vitro"* solo se necessario a seguito di alert strutturale da approccio *"in silico"*
 - *necessità di certe quantità di impurezza (almeno 1 g)*
 - *costi medio alti per studi di citogenetica e "in vivo" (attenzione al budget!!)*
- d)** Attivare altri approcci *"in silico"* (es. tossicità acuta orale, cancerogenesi, mutagenesi, sensibilizzazione)
- e)** Attivare studi sperimentali *"in vivo"* ad hoc a seguito di eventuali alert strutturali da punto d)
- f)** Preparare un Expert Report.



Grazie per la vostra attenzione

Thanks for your attention

Gracias por su atención

Merci de votre attention

Danke für ihre aufmerksamkeit

Chemsafe Srl

Via Ribes 5

10010 Colleretto Giacosa (TO), ITALY

e-mail: a.conto@chemsafe-consulting.com