

Sledování a regulace nitrosaminů (NAMs) v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Michal Douša, Jakub Jireš, Petr Gibala, Zentiva k.s.



Konference Vitatox 2023, Dvůr Králové nad Labem

Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

O čem si budeme povídat

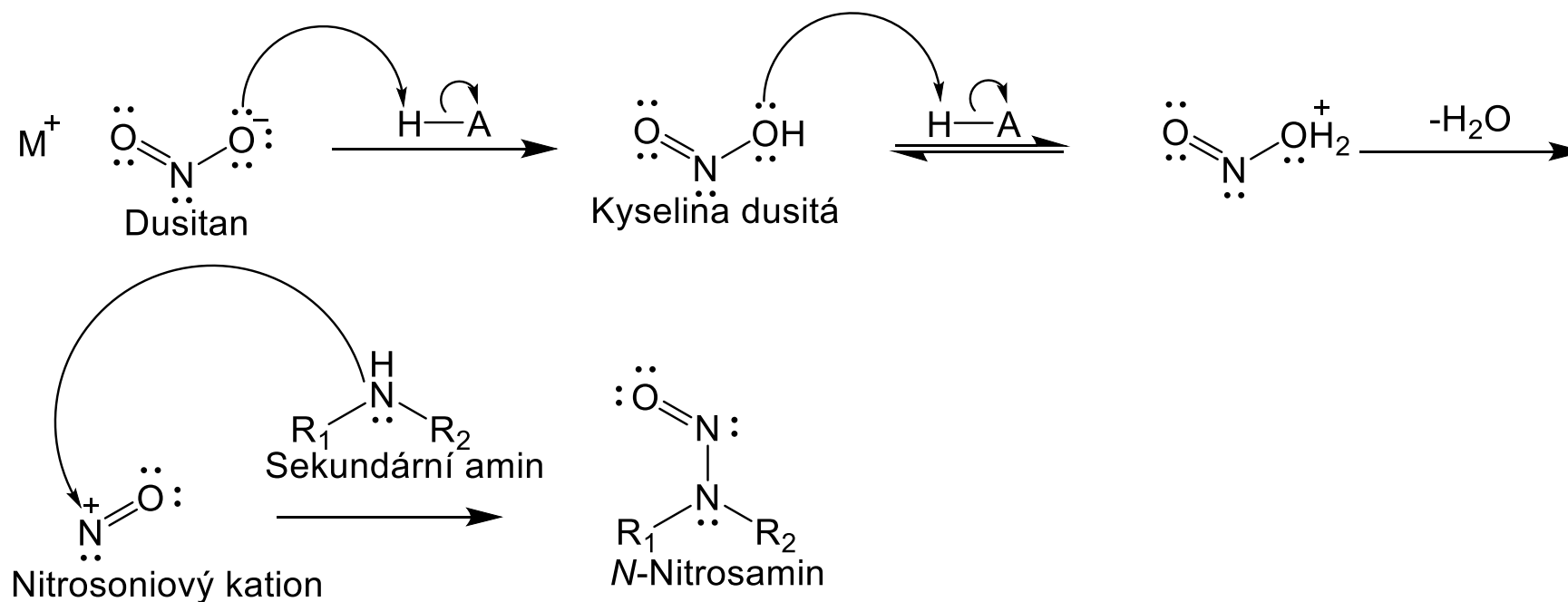
- historie a účinek nitrosaminů
- zdroj nitrosaminů
- legislativa ve farmacii
- analytické stanovení genotoxických látek
- eliminace obsahu NAMs v léčivech
- co s tím?



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Historie a účinek

První doklad o syntéze nitrosaminů (NAMs) pochází z roku 1874. Německý chemik **Otto Nicolaus Witt** (1853-1915) je vytvořil reakcí kyseliny dusité (HNO_2) se sekundárními a terciálními aminy. N-nitrosaminy obecně vznikají v kyselém prostředí ze dvou prekurzorů – dusitanů a sekundárních aminů dle schématu



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Historie a účinek

Nitrosaminy obecně v lidském organismu podstupují metabolickou přeměnu katalyzovanou jaterními enzymy (zejména Cytochrom P450 2E1) a uvolňují reaktivní částice (karbeniový CH_3^+ či alkylkarbeniový R-CH_2^+ ion, formaldehyd HCHO apod.) schopné se vázat na dusíkaté báze v DNA.

Genotoxicita je schopnost chemických látek interagovat s genetickou informací buňky [1]. Tato interakce obvykle vyústí v poškození genetického materiálu buňky, kterému se snaží předejít opravné procesy buňky [2].

V roce 1957 bylo na kožešinových farmách v Norsku u norků krmených rybí moučkou hlášeno nové zhoubné onemocnění jater. Později, na počátku 70. let 20. století, byly hlášeny další propuknutí onemocnění jater a rakoviny u norských hospodářských zvířat. Při zkoumání bylo zjištěno, že dusitanem ošetřená rybí moučka obsahuje až 100 ppm NDMA. V době incidentu byl dusitan sodný používán v Norsku jako konzervační látka rybí moučky.



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Zdroj nitrosaminů

Expozice:

- kouření
- konzumace uzenin a uzených sýrů (setiny až desetiny ppm)
- pitím vody znečištěné dusíkatými látkami
- pivo [3,4,5]
- v ústních vodách obsahujících chlorhexidin [6]

N-nitrosaminy mohou vznikat v potravinách během výroby, skladování a dalšího zpracování (tepelná úprava uzenin, nakládání atd.).

Při požití prekurzorů (dusitany, sekundární aminy) mohou také vznikat i v lidském žaludku, kde je jejich vznik ještě podpořen kyselým pH.



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Zdroj nitrosaminů

Farmaceutický průmysl:

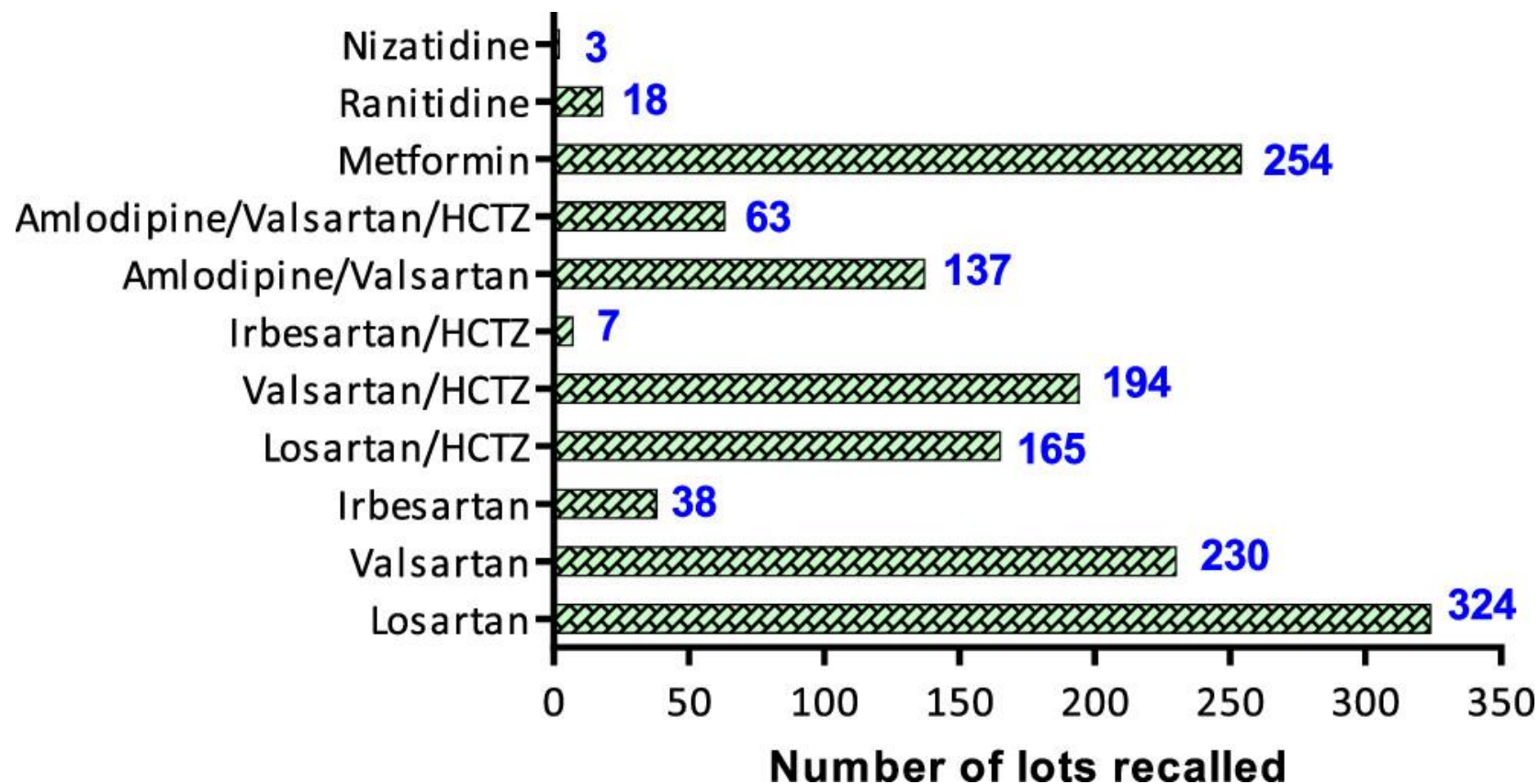
- první náznaky problému – červen 2018 !!
- 2. 4. 2019: sartany (candesartan, irbesartan, losartan, olmesartan, valsartan) – NDMA, NDEA, EIPNA, DIPNA, NMBA.
- duben 2019: pioglitazon – NDMA
- září 2019: ranitidine – NDMA
- prosinec 2019: metformin

Vznik NAMs ve farmacii:

- výroba léčivé látky (technologie)
- vznik v lékové formě reakcí léčivé látky nebo jiného prekursoru (sek. amin) s dusitany (excipienty)



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?



<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.0c02120>



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Legislativa ve farmacii

Limit obsahu genotoxické látky v příslušném léčivu je možné spočítat z ADI (Acceptable Daily Intake) a maximální denní dávky účinné látky MDD (Maximum Daily Dose).

ADI = an estimate of the amount of a substance in food or drinking water that can be consumed daily over a lifetime without presenting an appreciable risk to health.

Postup výpočtu: (ICH) směrnice M7(R1) => střední toxická dávka (TD_{50}) léku nebo toxinu dávka, při které se toxicita vyskytuje v 50 % případů. ADI je možné spočítat z TD_{50} dle následujícího vzorce [7–10]:

$$ADI \text{ (mg/kg/den)} = TD_{50} \text{ (mg/kg/den)} / (0,5 * 100000)$$

Dle ICH je akceptovatelné riziko rakoviny způsobené přítomností všech genotoxických látek v léčivu 1:100 000 při celoživotním užívání.



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Legislativa ve farmacii

Pro výpočet limitu obsahu genotoxické látky v léčivém produktu se nejprve spočítá ADI pro člověka vážícího 50 kg tzv. ADI_{50kg} (v ng/den) podle vzorce:

$$ADI_{50kg} = ADI * 50$$

a poté se podělí ADI_{50kg} maximální denní dávkou účinné látky deklarované v léčivu (MDD, v mg/den):

$$\text{limit } (\mu\text{g/g, tj. ppm}) = ADI_{50kg} / MDD$$

Příklad: výpočet limitu pro NDMA v metforminu HCl.

TD_{50} pro NDMA je 0,096 mg/kg/den.

$$ADI = 0,096 / (0,5 * 100000) = 0,00000192 \text{ mg/kg/den } (= 1,92 \text{ ng/kg/den}).$$

$$ADI_{50kg} = 1,92 * 50 = 96 \text{ ng/den.}$$

MDD metforminu HCl = 3000 mg denně.

$$\text{Limit} = (96 \text{ ng/den}) / (3000 \text{ mg/den}) = 0,032 \mu\text{g/g (ppm)} = 32 \text{ ppb.}$$



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Legislativa ve farmacii

Pokud nejsou toxikologická data k dispozici pak je limit $ADI_{50kg} = 18 \text{ ng/den !}$

Příklady:

Articaine (nitroso-API) – 36 ppb (jednorázové anestetikum)

Ciprofloxacin (nitroso-API) – 12 ppb (fluorochinolonové antibiotikum)

Furosemide (nitroso-API) – 9 ppb (diuretikum)

Formoterol (nitroso-API) – 375 ppm (bronchodilatátor při léčbě astmatu a chronické obstrukční plicní nemoci)



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Legislativa ve farmacii

Příklady limitů pro sartany [11]

Interim limits for NDMA, NDEA, and NMBA in Sartans

Drug	Maximum daily dose (mg/day)	Acceptable intake NDMA (ng/day) ^a	Acceptable intake NDMA (ppm) ^b	Acceptable intake NDEA (ng/day) ^a	Acceptable intake NDEA (ppm) ^b	Acceptable intake NMBA (ng/day) ^a	Acceptable intake NMBA (ppm) ^b
Valsartan	320	96	0.3	26.5	0.083	96	0.3
Losartan	100	96	0.96	26.5	0.27	96	0.96
Irbesartan	300	96	0.32	26.5	0.088	96	0.32
Azilsartan	80	96	1.2	26.5	0.33	96	1.2
Olmesartan	40	96	2.4	26.5	0.66	96	2.4
Eprosartan	800	96	0.12	26.5	0.033	96	0.12
Candesartan	32	96	3.0	26.5	0.83	96	3.0
Telmisartan	80	96	1.2	26.5	0.33	96	1.2



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Legislativa ve farmacii

Doporučení podle článku 5(3) nařízení 726/2004/ES:

Preventivní opatření - přezkoumat výrobu svých léčivých přípravků a identifikovat riziko přítomnosti NAMs, a pokud takové riziko zjistí, přijmout opatření ke snížení rizika výskytu těchto nečistot.

Krok 1 – vyhodnocení rizika (do **26. 3. 2020**), týká se všech registrovaných, i neobchodovaných LP

Krok 2 – potvrzující testování (do **26. 9. 2022**) u LP s identifikovaným rizikem

Krok 3 – **změny registrace** (**změna** výrobního procesu léčivé látky nebo přípravku, **změna** specifikace léčivé látky nebo přípravku a **změna** kontrolních metod léčivé látky nebo přípravku)



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Analytické stanovení genotoxických látek

Klíčovým parametrem analytických technik: **nízká mez stanovitelnosti**.

V praxi je proto pro stanovení genotoxických látek de facto jedinou používanou technikou hmotnostně spektrometrická (MS) detekce spřažená s technikou U(H)PLC nebo GC. V případě stanovení N-nitrosaminů je dokonce MS detekce přímo **vyžadována** lékovými autoritami.

Selektivity LC-MS je dosaženo v několika dimenzích:

- první dimenze selektivity je separace příslušného analytu na analytické koloně,
- druhá dimenze se dosáhne v MS detektoru (SIM - „Selected ion monitoring“),
- další dimenze selektivity je možné dosáhnout na instrumentech typu trojitého kvadrupólu v módu multiple reaction monitoring (MRM), kdy dochází k selektivnímu filtrování m/z prekursoru na prvním kvadrupólu, specifické reakci s molekulou kolizního plynu v kolizní cele a poté filtrování m/z produktu na třetím kvadrupólu.



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

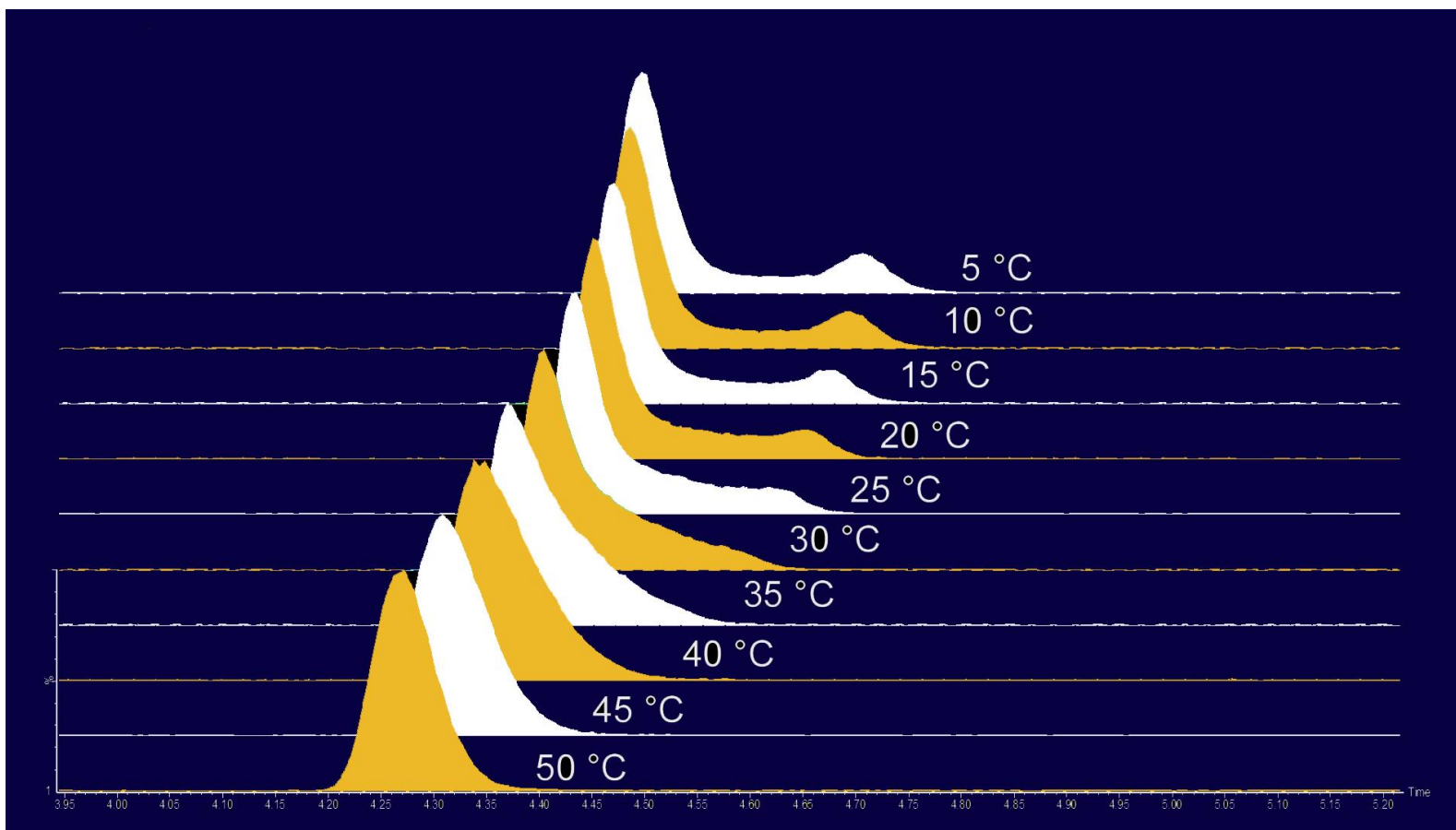
Analytické stanovení genotoxických látek

Problematika MS detekce:

- izobarické interference i v případě použití MRM (např. NDMA (m/z 75) a dimetylformamid m/z 74 a isotopický iont m/z 75 poskytuje stejné fragmenty) => HRMS
- matricové efekty a jejich kompenzace: (a) snížení množství vzorku nastříkovaného na kolonu, (b) naředění vzorku, (c) separace části matrice před analýzou pomocí vhodné SPE kolonky (d) vhodná úprava vzorku (e) úprava chromatografických podmínek (f) použití vnitřního standardu (g) použití metody přidavku standardu
- N-nitrosoaminy (nesymetrické) se vyskytují jako rotamery – separace rotamerů a tudíž obtížná kvantifikace.



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?



Vliv teploty na separaci NTTP (sitagliptin).

Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Analytické stanovení genotoxických látek

V uběhlém roce byly v MS laboratoři společnosti Zentiva analyzovány na obsah N-nitrosaminů lékové produkty, které byly staženy z evropského trhu (nepublikovaná data). Cíleně se jednalo o vzorky (celkově **1042** vzorků) s různým terapeutickým účinkem (celkově **25** různých účinných látek) od různých výrobců. Většina těchto léčiv (cca 80 %) vykazovala nadlimitní obsah N-nitrosaminů.



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Eliminace obsahu NAMs v léčivech

- odstranění nebo snížení prekursoru – dusitanů v excipientech (low-nitrite excipients) – < 0.02 ppm (běžně 0.1 – 10 ppm)
- odstranění sekundárního aminu – prekursoru (DMA, sekundární aminy jako nečistoty API)
- Přidání vhodného „scavenger“ – redukce NO₂ nebo vznikajícího NAMs
- Modifikace N-nitrosační kinetiky – zvýšení velikosti částic (redukce povrchu) [13-14].



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Závěr – co s tím?

- a) Autority stanovily velmi přísný limit na obsah NAMs. Pro látky s neznámými toxikologickými daty 18 ng/den. Objevují se i případy, že přestože existují známá data TDI_{50} a limity vycházejí daleko vyšší, tyto limity z neznámého důvodu neakceptuje a trvá na limitu 18 ng/den (nitrosopiperazine, N,N-dinitrosopiperazine).
- b) Limity pro NAMs jsou stejné pro léky s **jednorázovým** použitím (articaïne – lokální anestetikum, adrenalin – injekčně akutní podání) i pro léky dlouhodobě používané (metformin, beta-blokátory).
- c) Autority mají dostatečné množství dat k retrospektivní analýze. Z analýzy dat provedené EMA vyplývá, že na každých **100 000** pacientů léčených maximálními terapeutickými dávkami valsartanu s nejvyšší zaznamenanou mírou kontaminace NDMA po dobu **šesti** let připadne oproti přirozenému pozadí navíc **22** případů rakoviny. Otázka: přirozené pozadí – pacienti léčení valsartanem bez NDMA? nebo běžná populace? Kauzalita mezi nárůstem onemocnění a NDMA?



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Závěr – co s tím?

- d) Jiná studie sledovala dopad léčby Valsartanu s NDMA a bez NDMA na výskyt rakoviny. Pokud se to vztáhne na 100,000 lidí, výskyt rakoviny u NDMA-exponovaných pacientů byl 1309, u neexponovaných 1293, což je statisticky nevýznamné [12].
- e) U pacientů s diabetem II typu, kteří užívají metformin bylo zjištěno nižší riziko vzniku zhoubných nádorů než u pacientů, kteří dané léčivo neužívají. Pokud by snaha redukovat množství N-nitrosaminů v dané farmakologicky účinné látce vedlo k její nedostupnosti, mohlo by se paradoxně riziko vzniku nádorů u těchto pacientů zvýšit.
- f) Dobře míněná snaha o odstranění téměř zanedbatelných koncentrací genotoxických látek mohla vyústit v globální nedostatek léčiv, protože mnozí z výrobců nebudou schopni léčiva poskytnout v požadované kvalitě a včas.



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Literatura

- [1] Maurici, D.; Aardema, M.; Corvi, R.; Kleber, M.; Krul, C.; Laurent, C.; Loprieno, N.; Pasanen, M.; Pfuhler, S.; Phillips, B.; Sabbioni, E.; Sanner, T.; Vanparys, P. Genotoxicity and Mutagenicity. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA* 2005, 33 (1), 117-130.
- [2] Irigaray, P.; Newby, J.A.; Clapp, R.; Hardell, L.; Howard, V.; Montagnier, L.; Epstein, S.; Belpomme, D. Lifestyle-Related Factors and Environmental Agents Causing Cancer: An Overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2007, 61 (10), 640-658.
- [3] Chienthavorn, O.; Subprasert, P.; Insuan, W. Nitrosamines Extraction from Frankfurter Sausages by Using Superheated Water. *Separation Science and Technology* 2014, 49 (6), 838–846.
- [4] Fan, C.-C.; Lin, T.-F. N-Nitrosamines in Drinking Water and Beer: Detection and Risk Assessment. *Chemosphere* 2018, 200 48–56.
- [5] Tricker, A.R.; Preussmann, R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 1991, 259 (3), 277–289.
- [6] van Maanen, J.M.; Pachen, D.M.; Dallinga, J.W.; Kleinjans, J.C. Formation of nitrosamines during consumption of nitrate- and amine-rich foods, and the influence of the use of mouthwashes. *Cancer detection and prevention* 1998, 22 (3), 204–212.
- [7] International Council for Harmonization (ICH) Guideline: M7(R1) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals To Limit Potential Carcinogenic Risk. <https://www.fda.gov/media/85885/download> (Staženo 6.4.2020).
- [8] 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/variation-report/sartans-article--31-referral-chmp-assessment-report_en.pdf (Staženo 31.3.2020).



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Literatura

[9] Impact of the Article 5(3) Scientific Opinion on Nitrosamines in Human Medicinal Products on the Opinion Adopted Pursuant to Article 31 of Directive 2001/83/EC for Angiotensin-II- Receptor Antagonists (Sartans) Containing a Tetrazole Group (Candesartan, Irbesartan, Losartan, Olmesartan, Valsartan) Procedure no: EMEA/H/A-31/1471. https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/angiotensin-ii-receptor-antagonists-sartans-article--31-referral-chmp-assessment-report-impact/83/ec_en.pdf (Staženo 17.3.2021).

[10] Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products. EMA/409815/2020 Rev.14. 21 December 2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-marketing-authorisation-holders/applicants-chmp-opinion-article-53-regulation-ec-no-726/2004-referral-nitrosamine-impurities-human--medicinal-products_en.pdf (Staženo 10.1.2023).

[11] <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/n-nitrosodimethylamine> (24.5. 2023).

[12] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9798794/> (24.5. 2023).

[13] I.W. Ashworth, O. Dirat, A. Teasdale, M. Whiting, Potential for the Formation of N-Nitrosamines during the Manufacture of Active Pharmaceutical Ingredients: An Assessment of the Risk Posed by Trace Nitrite in Water, Organic Process Research & Development 24(9) (2020) 1629-1646, 10.1021/acs.oprd.0c00224.

[14] J. Schlingemann, C. Boucley, S. Hickert, L. Bourasseau, M. Walker, C. Celdran, T. Chemarin, C. Pegues, M. Fritzsche, J. Keitel, A. Goettsche, M. Seegel, S. Leicht, B. Guessregen, P. Reifenberg, S. Wetzels, T. Müller, F. Schooren, T. Schuster, M. Liebhold, A. Kirsch, P. Krueger, C. Saal, B. Mouton, S. Masanes, Avoiding N-nitrosodimethylamine formation in metformin pharmaceuticals by limiting dimethylamine and nitrite, International Journal of Pharmaceutics 620 (2022) 121740, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121740>.

[15] M. Homšak, M. Trampuž, K. Naveršnik, Z. Kitanovski, M. Žnidarič, M. Kiefer, Z. Časar, Assessment of a Diverse Array of Nitrite Scavengers in Solution and Solid State: A Study of Inhibitory Effect on the Formation of Alkyl-Aryl and Dialkyl N-Nitrosamine Derivatives, Processes 10(11) (2022) 2428, <https://doi.org/10.3390/pr10112428>.



Sledování a regulace nitrosaminů v léčivech - reálná hrozba nebo emoce?

Poděkování

Kolegům ze Zentivy, jmenovitě Jakub Jireš, Petr Gibala, David Mervart, Jan Bosák

Organizátorům konference za pozvání.

