



## VALUTAZIONE E ANALISI DELLA PRESENZA DELLE N-NITROSAMMINE NEI PRINCIPI ATTIVI PRODOTTI PRESSO L'AZIENDA DIPHARMA: TEORIA E PRATICA

### Evaluation and analysis of the presence of N-nitrosamines in Dipharma active pharmaceutical ingredients: theory and practice

Anita Maria Lis, Riccardo Carcano

Progetto di stage svolto presso Dipharma Francis srl, Baranzate (MI)

#### Keywords

N-nitrosamine  
Active Pharmaceutical  
Ingredient  
Nitrosating agent  
Nitrosatable amine  
Active Pharmaceutical  
Ingredients Committee

#### Abstract

**Introduction** The presence of nitrosamines, or more formally N-nitrosamines, in valsartan - Active Pharmaceutical Ingredient (API) manufactured by Zhejiang Huahai, came to light in June 2018. Some nitrosamines are genotoxic (may damage DNA) and carcinogenic, and can be formed in many different ways by reaction of most types of amines with any of a large number of nitrosating species. Nitrosatable amines are found in many foods and some are synthesized in the body. Furthermore, amines have a wide range of industrial and commercial applications, including the manufacture of medicines. The presence of unacceptable levels of harmful impurities in pharmaceutical products poses a threat to public health that can have far-reaching effects on patients, the pharmaceutical industry, regulatory agencies and healthcare providers. To ensure the quality of pharmaceutical products, manufacturers must properly assess the risk of nitrosamine formation in their products and further investigate any potential risk. The presence of unacceptable levels of nitrosamines in medicines represents a problem of great importance and understanding the risks and how to measure them is a first step towards effective management and control.

**Objectives** The project addressed the risk of nitrosamine presence in medicines for human use and focused on the risk assessment in relation to some of the active pharmaceutical ingredients produced by Dipharma Francis srl. The objective of the project was to establish, through the evaluation of the synthesis process and the other conditions, the level of risk and, if necessary, to perform further checks and analyses.

**Methods** The applied protocol includes 3 phases: Step 1 (risk assessment), during which numerous aspects of the production of the active ingredient must be analysed with the aim of understanding if there are conditions that could favour the formation of nitrosamines; Step 2 (confirmatory testing) is performed in order to carry out the analyses to confirm the presence of one or more nitrosamines identified during Step 1 and to establish whether any quantities present exceed the indicated limits; if the quantities present in the active ingredient exceed the established limits, it is necessary to carry out the actions foreseen in Step 3 (risk mitigation measures) and adopt effective measures to reduce the risk.

Corrispondenza: Anita Maria Lis. E-mail: anitallis@yahoo.it

*Results and Conclusion* Two cases were described in this study. The first case (Benserazide hydrochloride) well illustrates the execution of Step 1 (risk assessment). The thorough evaluation allowed to state that there is no risk of nitrosamine formation. The second case (Isosorbide-5-mononitrate) is focused on the execution of Step 2 (confirmatory testing), as the evaluation during Step 1 identified a potential presence of 3 nitrosamines. Based on the evidences collected during the execution of Step 2, the risk of the presence of nitrosamines in Isosorbide-5-mononitrate was redefined as negligible.

## Introduzione

A partire dal 2018, alti livelli di impurezze da nitrosammine sono stati trovati in alcuni farmaci comunemente prescritti come farmaci per la pressione sanguigna, antiacidi, farmaci per il diabete e farmaci contro il tabagismo [1]. Le nitrosammine possono essere presenti in vari contesti: ambiente, alimenti, acque potabili, pesticidi, medicinali per uso umano e veterinario, cosmesi. Le nitrosammine sono un gruppo di sostanze chimiche, alcune delle quali possono rappresentare un rischio per i pazienti e per la salute pubblica a causa delle loro proprietà mutagene. Una volta metabolizzate, le nitrosammine vengono convertite in agenti alchilanti: alcuni di questi sono noti per danneggiare il DNA e sono stati collegati al cancro. Livelli non accettabili di impurezze da nitrosammine in alcuni lotti del bloccante del recettore dell'angiotensina II (ARB) valsartan sono stati rilevati per la prima volta nel 2018 [2]. Successivamente, sono stati trovati in altri ARB, così come in farmaci non correlati, tra cui ranitidina, nizatidina, metformina, rifampicina e rifapentina. La scoperta di nitrosammine in diversi prodotti farmaceutici che contengono principi attivi con diverse strutture chimiche, ha indicato che potrebbero esserci molteplici fonti di impurezze da nitrosammine, inclusi altri componenti dei prodotti farmaceutici e il processo di fabbricazione in sé [2].

A settembre del 2019 è stato lanciato un processo denominato 'call for review' per i medicinali contenenti principi attivi farmaceutici (API) di sintesi chimica, con lo scopo di richiedere ai titolari dell'autorizzazione all'immissione in commercio (MAH) di rivedere i loro processi produttivi al fine di identificare e, se necessario, mitigare il rischio di presenza di impurezze da nitrosammine e riferire il risultato alle autorità. Questa pratica è stata avviata mentre era in corso la revisione da parte del Comitato per i Medicinali per Uso umano (CHMP), ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 3, in riferimento alle impurezze da nitrosammine nei medicinali per uso umano [3-5].

Approfondite indagini hanno stabilito che i livelli non accettabili di nitrosammine riscontrati nel principio attivo valsartan erano causati da un cambiamento nel processo di produzione apportato per migliorare il rendimento produttivo. Le nitrosammine possono formarsi durante tutto il processo di produzione, compresa la sintesi, la purificazione, la formulazione, l'imballaggio e lo stoccaggio. Anche piccole modifiche ai processi di produzione possono introdurre o modificare i livelli di impurezze. Tali impurezze potrebbero essere introdotte ad esempio nelle materie prime (*raw materials*), nei solventi o derivare dalla degradazione del prodotto. I produttori dovrebbero stabilire strategie di controllo per valutare e mitigare i potenziali rischi. Quando viene identificato il rischio di formazione di nitrosammine è essenziale l'uso di test analitici per rilevare e misurare i livelli di nitrosammine al fine di proteggere i pazienti dall'esposizione a livelli non accettabili di queste sostanze potenzialmente dannose [2].

Le N-nitrosammine sono il prodotto di reazione di un'ammina e un agente nitrosante, sebbene siano possibili anche altre vie di formazione, come ad esempio processi di ossidazione e di riduzione di composti come idrazina ed N-nitro derivati. Le cause della presenza delle N-nitrosammine nei medicinali fino ad oggi identificate possono essere raggruppate come fattori di rischio legati al processo di fabbricazione e conservazione dei principi attivi e/o come fattori di rischio associati alla produzione e conservazione del prodotto finito. Esistono anche fattori di rischio specificatamente correlati agli aspetti cGMP (*current Good Manufacturing Practice*) [3]. Di seguito sono elencati i fattori di rischio attualmente identificati per le impurezze da nitrosammine nei medicinali, insieme ad alcuni identificati in letteratura. Tuttavia, l'elenco non è esaustivo [3].

#### Fattori di rischio legati alla produzione del principio attivo:

1. Uso di sali ed esteri di nitrito (ad esempio  $\text{NaNO}_2$ ), o di altri agenti nitrosanti, in presenza di ammine secondarie o terziarie, nella stessa o diverse fasi del processo di produzione. Le fonti di ammine secondarie o terziarie possono anche essere *starting materials* (sostanze di proprietà e struttura chimica definite e che vengono incorporate come frammento strutturale significativo nella struttura del principio attivo; ciò le distingue da reagenti, solventi o altri *raw materials*), intermedi, reagenti, solventi e catalizzatori, che contengono il gruppo amminico, impurezze amminiche (ad esempio sali di ammonio quaternario) o che sono suscettibili di degradazione per formare ammine.
2. Formazione di nitriti mediante ossidazione di idrossilammina o rilascio di nitriti da precursori nitro-aromatici (ad esempio mediante denitrazione di fluoro), in presenza di ammine secondarie o terziarie nella stessa o diverse fasi del processo di produzione.
3. Utilizzo di acqua disinfettata (trattamento con cloro, cloroammina, ozono) in presenza di ammine secondarie o terziarie nella stessa o diverse fasi del processo produttivo.
4. Ossidazione di idrazine, idrazidi e idrazoni mediante ipoclorito, aria, ossigeno, ozono e perossidi durante il processo di produzione o durante lo stoccaggio.
5. Uso di materie prime (*raw materials*) contaminate nel processo produttivo dell'API, uso di materiali recuperati o riciclati contaminati, uso di *starting materials* e prodotti intermedi contaminati ricevuti da fornitori che utilizzano processi o materie prime (*raw materials*) che potrebbero contenere nitrosammine residue o agenti nitrosanti.
6. *Carry-over* di nitrosammine generate deliberatamente (ad esempio come *starting materials* o intermedi) durante il processo produttivo.

#### Fattori di rischio legati anche al prodotto finito:

7. Reazione dell'azoto 'nitrosabile' negli API o nelle loro impurezze/prodotti di degradazione con agenti nitrosanti presenti nei componenti del prodotto finito durante la produzione o lo stoccaggio. Un rischio particolare di formazione di nitrosammine va notato per i principi attivi che contengono un gruppo funzionale amminico 'nitrosabile'.
8. Processi di degradazione di principi attivi, compresi quelli indotti da reattività intrinseca (ad esempio la presenza di nitro-alchile, ossima o altri gruppi funzionali, o dovuti alla presenza di un agente nitrosante esogeno).
9. Ossidazione di idrazina o di altri gruppi funzionali contenenti ammine presenti nei principi attivi o nelle loro impurezze/prodotti di degradazione (ad esempio da idrazoni e idrazidi), sia nei processi di produzione dei principi attivi che durante lo stoccaggio. Questo fattore è stato osservato anche durante la produzione e lo stoccaggio di prodotti finiti contenenti questi gruppi funzionali. Potenziali ossidanti includono ossigeno e perossidi (impurezze comuni in alcuni eccipienti).
10. Uso di determinati materiali di imballaggio. Una rilevante contaminazione da nitrosammine è stata osservata nell'imballaggio primario di alcuni prodotti finiti confezionati in blister con un film di copertura contenente la nitrocellulosa. Durante il processo di termosaldatura del blister può essere generato termicamente dalla nitrocellulosa l'ossido di azoto.
11. Reazione di lisciviazione di ammine da resine a scambio anionico con gruppo funzionale di ammonio quaternario (utilizzate ad esempio per fasi di purificazione) con agenti nitrosanti presenti nella fase liquida.

#### Fattori di rischio relativi agli aspetti GMP:

12. Contaminazione crociata dovuta a diversi processi eseguiti successivamente sulla stessa linea di produzione.
13. *Carry-over* di impurezze tra le fasi del processo a causa di errori dell'operatore o batch record non sufficientemente dettagliati, come separazioni di fase inadeguate durante le procedure di lavorazione.
14. Utilizzo di materiali recuperati o riciclati contaminati (ad esempio solventi, reagenti e catalizzatori) laddove il recupero sia affidato a terzi che non sono a conoscenza del contenuto dei materiali che stanno trattando. Dovrebbero essere presi in considerazione anche i processi di recupero eseguiti utilizzando apparecchiature/ attrezzature non dedicate.

Se viene rilevata una nitrosammina, deve essere calcolato un limite che tenga conto di un'esposizione giornaliera per tutta la vita del paziente. I seguenti limiti in **Tabella 1** sono stati stabiliti per alcune specifiche N-nitrosammine e dovrebbero essere applicati; questi limiti sono applicabili solo se nel prodotto finito è presente una sola N-nitrosammina [4].

**Tabella 1** Limiti per alcune specifiche N-nitrosammine.

N-Nitrosammina	Acceptable Intake - dose giornaliera accettabile (ng/day)
NDMA (N-Nitrosodimethylamine)	96.0
NDEA (N-Nitrosodiethylamine)	26.5
EIPNA (N-Nitrosoethylisopropylamine)	26.5
DIPNA (N-Nitrosodiiisopropylamine)	26.5
NMBA (N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyric)	96.0
MeNP (1-Methyl-4-nitrosopiperazine)	26.5
NDBA (N-Nitroso-di-n-butylamine)	26.5

I limiti per le nitrosammine per cui non vi sono dati tossicologicamente convalidati possono essere fissati in conformità con i requisiti dell'UE. Questo può essere un limite di 18 ng al giorno oppure in alternativa un limite basato sulla relazione struttura-attività (SAR) [4].

Molte nitrosammine sono dei potenti cancerogeni, ad esempio NDMA, NDEA, NMBA. I test eseguiti su NDMA e NDEA hanno dimostrato che entrambe inducono danni al DNA. Utilizzando i livelli massimi di contaminanti riportati per NDMA e NDEA in alcuni prodotti farmaceutici richiamati contenenti valsartan e ipotizzando un'esposizione continua a questi livelli per sei anni, è stata stimato un intervallo di rischio di cancro associato a queste due nitrosammine. Per NDMA, il rischio di cancro stimato variava da 40 a 126 casi aggiuntivi per 100.000 individui esposti. Per NDEA, il rischio di cancro stimato variava da 12 a 48 casi aggiuntivi per 100.000 individui esposti. Utilizzando un altro approccio, la *Food and Drug Administration* (FDA) statunitense ha anche stimato che il rischio aggiuntivo nel corso della vita per i pazienti che assumevano la dose massima giornaliera di valsartan per quattro anni era di un caso di cancro in più ogni 8000 individui per NDMA (equivalente a 12.5 su 100.000) e di un caso di cancro aggiuntivo ogni 18.000 individui (equivalente a 5.6 su 100.000) per NDEA. Le ipotesi della FDA statunitense nella stima dei rischi includono una durata dell'esposizione di 4 anni e un peso corporeo di 50 kg. Tutte queste stime del rischio superano la probabilità di rischio di cancro nel corso della vita generalmente accettato dalla FDA statunitense per impurezze nei prodotti farmaceutici che è pari a 1 su 100.000 [6].

### Valutazione del rischio

Il processo di valutazione del rischio di formazione di nitrosammine inizia con lo Step 1. Se non viene identificato alcun rischio per il/i principio/i attivo/i, i MAH devono condurre una valutazione del rischio del prodotto finito e presentare l'esito dello Step 1 solo quando raggiungono una conclusione definitiva su tutti i componenti, compresi il/i principio/i attivo/i, di cui è composto il prodotto finito.

Se viene identificato un rischio per il/i principio/i attivo/i, i MAH devono presentare il report relativo allo Step 1 e procedere con i test di conferma previsti per lo Step 2 sul prodotto finito. Le azioni dello Step 2 consistono nell'effettuare ulteriori test di conferma sui prodotti per cui è stato identificato il rischio di formazione di nitrosammine o di contaminazione crociata, e segnalare la presenza confermata di nitrosammine il prima possibile. Nel caso in cui i livelli della nitrosammina rilevata siano superiori alle quantità di assunzione accettabili, dovrebbe essere eseguito lo Step 3 che consiste nell'attuare efficaci misure di mitigazione del rischio attraverso la presentazione di variazioni [3]. Le scadenze per la presentazione delle valutazioni del rischio per Step 1, Step 2 e Step 3 (esclusi i nuovi prodotti farmaceutici) erano le seguenti:

- Step 1: 31 marzo 2021 per i medicinali di sintesi chimica e 1 luglio 2021 per i medicinali biologici;
- Step 2: 26 settembre 2022;
- Step 3: 1 ottobre 2023 per i medicinali di sintesi chimica e 1 luglio 2023 per i medicinali biologici.

## Obiettivi

In seguito alla scoperta di impurezze da nitrosammine nella ranitidina cloridrato e alla scoperta di tali impurezze nei sartani, Dipharma Francis srl ha iniziato ad effettuare un'approfondita valutazione del rischio al fine di verificare la presenza di nitrosammine nei suoi principi attivi. Di conseguenza, Dipharma ha iniziato a testare e migliorare i propri sistemi e metodi per soddisfare i requisiti delle linee guida dell'EMA (Agenzia Europea per i Medicinali) [7].

Il protocollo da seguire prevede:

- Step 1 (valutazione del rischio), durante il quale devono essere analizzati numerosi aspetti relativi alla produzione del principio attivo (presenza di alert structures: agenti nitrosanti e ammine lungo il processo produttivo; attrezzature e tipo di acqua utilizzate durante la sintesi; possibile formazione di impurezze; informazioni da fornitori di starting materials, reagenti, solventi e catalizzatori) con lo scopo di capire se ci sono condizioni che potrebbero favorire la formazione di nitrosammine. Questa valutazione permette di identificare la classe di rischio per la presenza di nitrosammine.
- Il punteggio ottenuto permette di stabilire se è necessario o meno passare allo Step 2 (test di conferma) per confermare la presenza di una o più nitrosammine nel principio attivo e stabilire se eventuali quantità presenti superano i limiti indicati.
- Qualora le quantità presenti nel principio attivo dovessero risultare superiori ai limiti stabiliti, è necessario eseguire le azioni previste dallo Step 3 (misure di mitigazione del rischio) e adottare misure efficaci per ridurre il rischio.

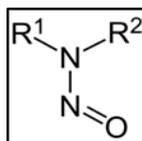
Gli obiettivi di questo progetto erano pertanto i) spiegare come viene eseguita la valutazione del rischio per la presenza di nitrosammine nei principi attivi farmaceutici; ii) stabilire il livello di rischio attraverso la valutazione del processo di sintesi e delle altre condizioni e, se necessario, effettuare ulteriori verifiche ed analisi.

## Metodi

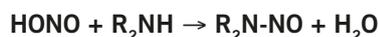
Le informazioni che seguono, relative ai metodi utilizzati, provengono dal "Protocollo di Valutazione del Rischio di presenza di Nitrosammine - Rev. 01", realizzato da Dipharma Francis srl nel 2021 [7]. Il documento è stato redatto ed approvato dall'Ufficio Qualità dell'azienda.

### STEP 1: Risk assessment – valutazione del rischio

Le nitrosammine sono composti organici di formula generale  $R_2N-N=O$ , dove R è di solito un gruppo alchilico.



La chimica organica delle nitrosammine è caratterizzata dalla presenza di un gruppo nitroso (NO+) legato all'ammina deprotonata. Di solito le nitrosammine si ottengono per reazione di acido nitroso (HNO<sub>2</sub>) con un'ammina secondaria:



La valutazione del rischio si concentra sulle *alert structures*, che potrebbero creare le condizioni per la formazione di nitrosammine (**Tabella 2**):

La valutazione del rischio viene eseguita utilizzando i principi di gestione del rischio delineati nella linea guida Q9 dell'ICH (*International Council for Harmonisation*) e riportando i risultati nella tabella detta 'matrice' – 'matrix template'. La valutazione è focalizzata sulle *alert structures* che possono creare le condizioni per la formazione di nitrosammine e il relativo rischio è calcolato applicando il metodo FMECA. Il metodo FMECA - *Failure Modes, Effects and Criticality Analysis* - è una metodologia progettata al fine di identificare potenziali '*failure modes*' per un prodotto o un processo, valutare il rischio associato a tali '*failure modes*', classificare i problemi in termini di importanza e identificare ed eseguire azioni correttive per affrontare le questioni più gravi.

**Tabella 2** Alert structures.

a) Nitriti (NO <sub>2</sub> -), nitrati (NO <sub>3</sub> -), azidi (N <sub>3</sub> -), N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> o N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , NOCl gas disciolto (composti inorganici e organici)
b) Nitrocomposti (R-NO <sub>2</sub> ), R=alchile
c) Nitrocomposti (R-NO <sub>2</sub> ), R=arile
d) Idrossilammine (H <sub>2</sub> NO)
e) Ammine secondarie ((R1)(R2)-NH), R1, R2=alchile, arile
f) Ammine terziarie ((R1)(R2)(R3)-N), R1, R2, R3=alchile, arile
g) Ammine primarie
h) Composti Azo- o Azossi- alifatici (R1-N=N-R2)
i) Anello tetrazolico
j) Ammidi primarie
k) Ammidi secondarie
l) Carbammati primari
m) Carbammati secondari
n) Idrazine
o) Impurezze di degradazione contenenti a) o e)
p) Carbone attivo*

\*Il carbone attivo è una fonte potenziale di formazione di nitrosammine come riportato in letteratura - "Impatto Catalitico del Carbone Attivo sulla Formazione di Nitrosammine da Diversi Precursori Amminici".

Considerando l'API, ci sono diverse potenziali fonti di *alert structures* che potrebbero formare impurezze da nitrosammine:

- CATEGORIA 1: *alert structures* in qualsiasi fase del processo produttivo;
- CATEGORIA 2: *alert structures* in qualsiasi starting material/intermedio o eccipienti utilizzati;
- CATEGORIA 3: *alert structures* in qualsiasi solvente utilizzato nel processo produttivo;
- CATEGORIA 4: *alert structures* in qualsiasi reagente/catalizzatore utilizzato nel processo produttivo;
- CATEGORIA 5: *alert structures* nel processo di trattamento delle acque;
- CATEGORIA 6: indicazione se le attrezzature utilizzate sono dedicate alla produzione di un singolo principio attivo o meno;

Per ogni *alert structure* elencata sopra è indicato un punteggio specifico. Questo punteggio rappresenta la GRAVITÀ assegnata a ciascun caso sulla base delle conoscenze scientifiche per identificare l'impatto sulla formazione di nitrosammine. Sulla base delle proprietà chimiche delle nitrosammine, il calcolo del rischio viene eseguito secondo la seguente formula:

$$IRP = A \times B + n$$

Dove:

IRP = Index of Risk Probability

A = Nitro Rilevability

B = Amine Rilevability

n = punteggio fornito da altri fattori

La **Nitro Rilevability** si ottiene nel modo seguente:

$$G \text{ Nitro} \times P \text{ Nitro} \times S \text{ Nitro}$$

**G = Gravità (Tabella 3)** è un punteggio applicato sulla base delle conoscenze scientifiche relative a ciascuna *alert structure*, al fine di indicare l'impatto di tale struttura sulla formazione del gruppo nitroso. L'impatto dell'*alert structure* valutata nel processo produttivo dovrebbe essere considerato seguendo la scala di impatto da 1 a 10. Il processo produttivo risulta più critico con il maggiore impatto sull'intera valutazione del rischio nel caso dell'effettiva presenza di specie chimiche in grado di formare nitrosammine. Mentre il punteggio per la stessa alert structure presente negli *starting*

*materials*, intermedi, solventi, reagenti o catalizzatori assume un valore su una scala da 1 a 3. Per le altre CATEGORIE (dalla 2 alla 5) si applica lo stesso approccio, ma il punteggio è 1/2/3 anziché 1/5/10. Per l'ultima categoria (attrezzature), il punteggio è 1/3/5, dove il punteggio più alto viene assegnato nel caso in cui le attrezzature, in uno stabilimento dove si producono sartani, sono utilizzate per la produzione di più prodotti, in quanto vi è un aumentato rischio di contaminazione.

**P = Presenza** è un punteggio che può essere 1 oppure 0, per indicare la presenza o l'assenza di ciascuna alert structure considerata.

**S = Criticità dello step** è l'indicazione del numero dello step in cui l'alert structure compare lungo il processo produttivo, rispetto allo step finale (N), secondo la **Tabella 4**.

**Tabella 3** Punteggi per la CATEGORIA 1 (su una scala da 1 a 10).

PUNTEGGIO	SIGNIFICATO
1 = Gravità bassa	la formazione di nitrosammine non è descritta in letteratura
5 = Gravità media	la formazione di nitrosammine è descritta in letteratura sotto condizioni particolari
10 = Gravità alta	la formazione di nitrosammine è altamente probabile

La **Amine Rilevability** si ottiene nel modo seguente:

$$G \text{ Amine} \times P \text{ Amine} \times S \text{ Amine}$$

**G = Gravità** è un punteggio applicato sulla base delle conoscenze scientifiche relative a ciascuna *alert structure*, al fine di indicare l'impatto di tale struttura sulla formazione del gruppo amminico secondario. L'approccio è lo stesso descritto per la Gravità di *Nitro Rilevability*.

**P = Presenza** è un punteggio che può essere 1 oppure 0, per indicare la presenza o l'assenza di ogni *alert structure* considerata e coinvolta nella formazione di ammine secondarie.

**S = Criticità dello step** è l'indicazione del numero dello step in cui l'*alert structure* compare lungo il processo produttivo, rispetto allo step finale (N), secondo la **Tabella 4**.

**Tabella 4** Punteggi per la CRITICITÀ.

CRITICITÀ	N. DELLO STEP*
1 = Criticità bassa	(N - 6) e antecedenti
2 = Criticità media	tra (N - 3) e (N - 5)
3 = Criticità alta	tra (N) e (N - 2)

\* Gli step comprendono tutti gli step chimici e fisici, escluse le attività di finitura (essiccazione, macinazione o micronizzazione).

Addendum n: alla rilevabilità verificata per nitrocomposti e ammine, relativamente a ciascuna categoria, potrebbe essere aggiunto un ulteriore punteggio legato a uno dei seguenti casi:

1. Quando un'impurezza di degradazione contiene gruppi nitro e/o ammine secondarie.
2. Quando nel processo produttivo viene utilizzato il carbone attivo.
3. Quando nel processo produttivo vengono utilizzati materiali recuperati/riciclati (solventi, reagenti o catalizzatori).
4. In assenza di informazioni dettagliate da uno o più fornitori di materiale impiegato. Il punteggio finale si ottiene sommando ogni punteggio parziale per ciascuna categoria. Sulla base delle indicazioni sopra citate, il potenziale rischio di formazione di impurezze da nitrosammine viene classificato secondo la **Tabella 5**.

**Tabella 5** Classificazione del potenziale rischio di formazione di impurezze da nitrosammine.

ESITO	INDICAZIONE
≥ 401	il rischio è <b>alto</b>
201- 400	il rischio è <b>moderato</b>
≤ 200	il rischio è <b>trascurabile</b>

---

## STEP 2: Confirmatory testing and risk assessment report – test di conferma e report sulla valutazione del rischio

L'esecuzione dello Step 2, per i prodotti che hanno mostrato un rischio elevato, deve avere luogo immediatamente dopo la valutazione dello Step 1 e prevede innanzitutto la validazione del metodo analitico e l'esecuzione dei test di conferma. Durante lo Step 2, l'approccio è quello di emettere il report di valutazione del rischio utilizzando il modello messo a disposizione dall'APIC - *Active Pharmaceutical Ingredients Committee* - che è considerato completo ed esplicativo di tutti i fattori di rischio per la formazione di nitrosammine. Il report di valutazione del rischio dell'APIC, quando richiesto, dovrebbe essere condiviso con i MAH in modo che possano confermare la presenza o l'assenza del rischio, e informare le autorità.

Durante l'esecuzione dello Step 1 e dello Step 2, devono essere intraprese le seguenti azioni, nell'ambito delle azioni correttive e preventive, a seconda del rischio valutato.

**RISCHIO ALTO:** per gli API valutati con un alto rischio di formazione di nitrosammine, devono essere implementate le seguenti azioni:

- informare i clienti condividendo il report di valutazione del rischio;
- eseguire l'analisi di un numero di lotti commisurato al rischio; pertanto, in caso di probabile formazione in funzione del processo produttivo, deve essere verificata la presenza delle seguenti impurezze da nitrosammine (**Tabella 6**);
- valutare eventuali altre nitrosammine che si potrebbero formare durante il processo e non sono elencate sopra;
- validare il metodo analitico applicato e rilasciare il relativo report di convalida;
- fissare il limite di rilevabilità delle impurezze da nitrosammine (la linea guida EMA/425645/2020, aggiornata il 22 febbraio 2021 [8], definisce 4 nuovi scenari che possono verificarsi);
- effettuare un'indagine al fine di definire la causa principale della formazione di nitrosammine e proporre azioni correttive, opportunamente descritte in un apposito documento;
- gestire, sulla base delle azioni correttive implementate, eventuali modifiche importanti che interessano l'ASMF/DMF (*Active Substance Master File/Drug Master File*), secondo la linea guida EMA/369136/2020 [4].

**RISCHIO MODERATO:** per gli API valutati a rischio moderato di formazione di nitrosammine, devono essere messe in atto le seguenti azioni:

- controllare le condizioni di produzione che potrebbero portare alla formazione di nitrosammine al fine di confermare la valutazione del rischio;
- se il rischio si conferma moderato, assegnare al prodotto la giusta priorità subito dopo gli API per i quali il rischio è stato valutato alto;
- proseguire con la stessa procedura descritta per i prodotti ad alto rischio.

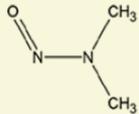
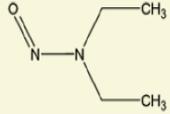
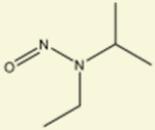
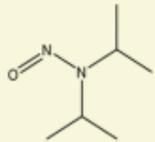
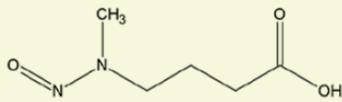
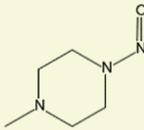
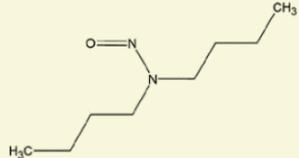
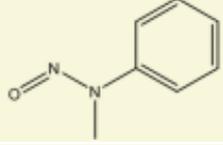
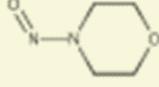
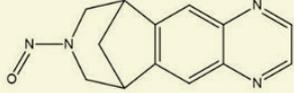
**RISCHIO TRASCURABILE:** per gli API valutati a rischio trascurabile di formazione di nitrosammine:

- verificare che ogni causa sia esclusa e che siano disponibili informazioni dai fornitori di *starting materials*, solventi e reagenti;
- se richiesto, informare i clienti, ad esempio condividendo il report di valutazione del rischio.

Lo Step 2 prevede l'esecuzione di test di conferma e/o ulteriori valutazioni del rischio di potenziale formazione di nitrosammine, per tutti gli API che presentano un rischio potenziale. L'approccio di Dipharma ai test di conferma si basa sulle linee guida dell'EMA. I limiti di potenziali nitrosammine sono stabiliti sulla base dell'assunzione accettabile – *Acceptable Intake* (AI) della nitrosamina in esame e della dose massima giornaliera – *Maximum Daily Dose* (MDD) dell'API, applicando la formula:

$$AI \text{ (ng/day)} / MDD \text{ (g/day)} = \text{ppb limit}$$

**Tabella 6** Impurezze da nitrosammine.

NDMA – N-Nitrosodimethylamine	
NDEA – N-Nitrosodiethylamine	
EIPNA – N-Nitrosoethylisopropylamine	
DIPNA – N-Nitrosodiisopropylamine	
NMBA – N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid	
MeNP – 1-Methyl-4-nitrosopiperazine	
NDBA – N-Nitroso-di-n-butylamine	
NMPA – N-Nitroso-N-methylaniline	
NMOR – N-Nitrosomorpholine	
NN 5 – N-Nitroso-varenicline	

Tutti i metodi analitici utilizzati in questo step devono essere sensibili e opportunamente validati. Il report di convalida deve essere emesso nel formato attualmente in uso. I test devono essere condotti sul 10% dei lotti annuali e su un minimo di 3 lotti all'anno (compresi i campioni conservati di lotti che non hanno ancora raggiunto la data di scadenza). Se vengono prodotti meno di 3 lotti all'anno, tutti i lotti devono essere testati.

Nel caso in cui durante lo Step 2 sia confermata la presenza di più di una nitrosammina, si possono utilizzare due approcci per stabilire i limiti [8]:

- l'assunzione giornaliera totale di tutte le N-nitrosammine identificate non deve superare il limite della più potente N-nitrosammina identificata;

- il livello di rischio totale della somma di tutte le N-nitrosammine rilevate non dovrebbe superare il rischio di 1 su 100.000 nel corso della vita.

La linea guida EMA/425645/2020 del 22 febbraio 2021 ha definito 4 scenari [8]:

**Scenario a:** una N-nitrosammina nota è stata rilevata in un medicinale e i livelli della N-nitrosammina superano il limite AI basato sui principi di ICH M7 (il rischio di 1 su 100.000 nel corso della vita). Lo stesso scenario si applica quando viene rilevata più di una N-nitrosammina nota e la somma totale delle N-nitrosammine supera il limite AI della N-nitrosammina più potente, o la somma di tutte le N-nitrosammine rilevate supera il rischio di 1 su 100.000 nel corso della vita. In caso di scenario a (una o più nitrosammine con un livello superiore al limite AI), è necessario agire immediatamente.

**Scenario b:** una N-nitrosammina nota è stata rilevata in un medicinale e il livello della N-nitrosammina non supera il limite AI basato sui principi di ICH M7 (il rischio di 1 su 100.000 nel corso della vita), tuttavia il contenuto totale della N-nitrosammina è superiore al 10% del limite AI. Lo stesso scenario si applica quando viene rilevata più di una N-nitrosammina nota e la somma totale delle N-nitrosammine non supera il limite AI della N-nitrosammina più potente, o la somma di tutte le N-nitrosammine rilevate è inferiore al rischio di 1 su 100.000 nella corso della vita. Lo scenario b include i casi in cui il livello di N-nitrosammina è superiore al 10% ma inferiore al 30% (in tal caso, se l'AI è costantemente inferiore al 30%, l'azienda può richiedere di non eseguire i test). La valutazione dovrebbe essere effettuata durante l'esecuzione dello Step 3.

**Scenario c:** nessuna N-nitrosammina è stata rilevata in un medicinale o il livello della N-nitrosammina nota è inferiore o uguale al 10% del limite AI basato sui principi di ICH M7. Lo stesso scenario si applica se è stata rilevata più di una N-nitrosammina nota e il contenuto totale delle N-nitrosammine è inferiore o uguale al 10% del limite AI basato sui principi di ICH M7 per la N-nitrosammina più potente o la somma di tutte le N-nitrosammine rilevate. Non sono previste ulteriori azioni.

**Scenario d:** una o più nuove N-nitrosammine sono state rilevate in un medicinale e non sono state ancora valutate ai sensi dell'articolo 5, paragrafo 3, da parte del CHMP. Deve essere eseguita la valutazione del rischio per decidere quale scenario - a, b oppure c - è applicabile.

Se, nonostante sforzi considerevoli, si dimostra che l'impurezza da nitrosammina non può essere sintetizzata, ciò potrebbe indicare che la nitrosammina non esiste o che non vi è alcun rischio che si formi durante il processo. In questi casi, potrebbe non essere necessario condurre test di conferma se ciò è adeguatamente giustificato dal punto di vista scientifico.

### STEP 3 Risk mitigation measures and submission of changes - misure di mitigazione del rischio e presentazione di modifiche

Se la presenza di nitrosammina/e è confermata e le quantità presenti nel principio attivo superano i limiti prestabiliti, è necessario eseguire le azioni dello Step 3 ed mettere in atto efficaci misure di mitigazione del rischio (modifiche del processo produttivo e/o della formulazione del prodotto). Per quanto riguarda le azioni che potrebbero essere intraprese dal produttore dell'API, tali modifiche possono riguardare, ad esempio, la sostituzione del/i solvente/i o del/i reagente/i con altri, il cambio del tipo di acqua, la modifica delle fasi di purificazione. Eventuali modifiche devono sempre essere valutate sulla base delle caratteristiche del processo produttivo dell'API considerato.

Sono stati sviluppati molti metodi analitici per consentire la quantificazione del livello di nitrosammine nei principi attivi e nei medicinali. Tuttavia, ciascun metodo deve essere adattato individualmente al tipo di principio attivo e/o alla formulazione del prodotto finito. Pertanto, è sempre necessario sviluppare un metodo, così come le sue validazioni, in conformità con gli standard attuali.

## Risultati e Discussione

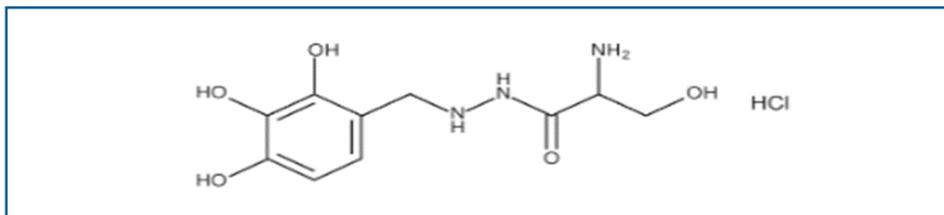
In questo studio sono descritti due casi, entrambi eseguiti applicando il "Protocollo di Valutazione del Rischio di presenza di Nitrosammine" di Dipharma. Il primo caso (Benserazide cloridrato) illustra bene l'esecuzione dello Step 1 (valutazione del rischio) e il secondo caso (Isosorbide-5-mononitrato) si concentra sull'esecuzione dello Step 2 (test di conferma).

### CASE STUDY 1 – Benserazide cloridrato

La malattia di Parkinson è una malattia progressiva che colpisce il sistema nervoso centrale e provoca movimenti involontari o incontrollabili, come tremori, rigidità e difficoltà di equilibrio e coordinazione. Sebbene non possa essere curata, i farmaci potrebbero migliorare significativamente i sintomi. La levodopa (chiamata anche L-dopa) è il farmaco più comunemente prescritto per la malattia di Parkinson, ma esistono anche altri farmaci che, spesso in combinazione con la levodopa, aiutano a controllare i sintomi della malattia. La benserazide è uno di quei farmaci che possono migliorare la vita dei malati di Parkinson. La prima preparazione combinata (miscela di benserazide con L-Dopa) è arrivata sul mercato nel 1973.

La benserazide cloridrato in combinazione con la levodopa è usata per il trattamento dei pazienti affetti da malattia di Parkinson e da sindrome delle gambe senza riposo. La benserazide è un inibitore periferico della DOPA-decarbossilasi. Impedendo la conversione di levodopa in dopamina a livello periferico, provoca un aumento della quantità di L-dopa che raggiunge il sistema nervoso centrale. Inoltre, la benserazide riduce anche gli effetti collaterali associati a un possibile accumulo di dopamina al di fuori del cervello, come vasocostrizione, nausea e aritmie [9]. Viene somministrata per via orale. La benserazide cloridrato non ha un effetto antiparkinson quando somministrata da sola. La sua struttura chimica è mostrata in **Figura 1** e la sua formula molecolare è  $C_{10}H_{16}ClN_3O_5$ .

**Figura 1**  
Struttura di benserazide cloridrato.



La benserazide cloridrato è un principio attivo di nuova produzione per Dipharma ed è destinato al mercato dei farmaci generici. Fino ad ora, la valutazione del rischio per la presenza di nitrosammine in questo principio attivo non era mai stata eseguita dall'azienda.

La valutazione del rischio per la potenziale presenza di nitrosammine è stata condotta tenendo conto della rilevabilità per gruppi nitro e gruppi amminici definita secondo gravità, presenza e criticità dello step. Durante l'esecuzione dello Step 1 è stato analizzato l'intero processo di sintesi della benserazide cloridrato, prendendo in considerazione tutti gli aspetti descritti nel paragrafo 'Metodi' e tutti i risultati sono stati riportati nella tabella 'matrice'.

La sintesi della benserazide cloridrato prevede 4 passaggi e coinvolge *starting materials*, reagenti, catalizzatori e solventi. Durante le fasi della sintesi si formano 3 intermedi e, al termine della quarta fase, si ottiene il prodotto finale. I risultati della valutazione vengono elencati di seguito.

CATEGORIA 1: *alert structures* in qualsiasi fase del processo produttivo. Per quanto riguarda gli agenti nitrosanti, nessuno di essi viene utilizzato nella sintesi, considerando tutte e quattro le fasi del processo produttivo. Sono state invece identificate le seguenti sostanze 'nitrosabili':

- La DL-serina, usata come *starting material* nella fase 1 della sintesi per ottenere l'intermedio BNS-1, è un'ammina primaria.
- L'idrazina idrato, utilizzata come reagente nella fase 2 per ottenere l'intermedio BNS-2, è un composto 'nitrosabile' ed è classificata come *alert structure*.
- L'API finale - benserazide cloridrato (BNS-4) – e gli intermedi BNS-1, BNS-2 e BNS-3 possiedono un gruppo amminico primario. Inoltre, l'API finale (BNS-4) e gli intermedi BNS-2 e BNS-3 possono essere considerati un'ammine secondaria.
- L'impurezza A (corrispondente anche all'intermedio BNS-2), l'impurezza B e l'impurezza C (corrispondente anche all'intermedio BNS-3) presentano un gruppo amminico primario e, inoltre, l'impurezza 1 ha un gruppo amminico secondario. Inoltre, le seguenti impurezze possono essere considerate un'ammine secondaria: Impurezza Acetyl Hydrazide, Impurezza B, Impurezza C, Impurezza Ciclo ND

1291-095, Impurezza 1.

Infine, il carbone attivo viene utilizzato come catalizzatore nella fase 4 della sintesi per ottenere l'API finale.

CATEGORIA 2: *alert structures* in qualsiasi starting material/intermedio o eccipiente utilizzati. Come già accennato in precedenza, nel processo produttivo della benserazide cloridrato eseguito da Dipharma non vengono utilizzati agenti nitrosanti e le *alert structures* relative alle sostanze 'nitrosabili' negli *starting materials* e negli intermedi sono state identificate come segue:

- La DL-serina, usata come *starting material* nella fase 1 per formare l'intermedio BNS-1, è un'ammina primaria, e anche gli intermedi BNS-1, BNS-2 e BNS-3 possiedono un gruppo amminico primario.
- Gli intermedi BNS-2 e BNS-3 possiedono un gruppo ammidico secondario.

Inoltre, basandosi sulle informazioni ricevute dai fornitori degli *starting materials* (DL-serina e triidrossibenzaldeide) e sulla via di sintesi, non è stato individuato alcun rischio di *starting materials* contaminati. Inoltre, nessun intermedio viene procurato dai fornitori e nessun eccipiente viene utilizzato nella sintesi.

CATEGORIA 3: *alert structures* in qualsiasi solvente utilizzato nel processo produttivo. Nessuna *alert structure* è presente nei solventi (metanolo, etanolo e isopropanolo) utilizzati per la sintesi del principio attivo benserazide cloridrato. Inoltre, tutti i solventi vengono utilizzati freschi, motivo per cui non è stato identificato alcun rischio di solventi contaminati.

CATEGORIA 4: *alert structures* in qualsiasi reagente/catalizzatore utilizzato nel processo produttivo. L'idrato di idrazina è considerato una *alert structure* e viene utilizzato come reagente nella fase 2 della sintesi per formare l'intermedio BNS-2. Basandosi sulle informazioni raccolte dal fornitore e sulla via di sintesi, non è stato identificato alcun rischio che l'idrato di idrazina impiegato sia contaminato. Inoltre, non sono presenti *alert structures* negli altri reagenti/catalizzatori utilizzati (cloruro di acetile, tetraidrofurano, Pd/C) e tutti i reagenti e catalizzatori vengono utilizzati freschi.

CATEGORIA 5: *alert structures* nel processo di trattamento delle acque. Durante il processo di produzione dell'API benserazide cloridrato viene utilizzata l'acqua demineralizzata. Inoltre, nel sito produttivo in cui viene prodotto il principio attivo possono essere utilizzate le seguenti tipologie di acqua: acqua potabile (opportunamente analizzata con i limiti di accettabilità stabiliti come segue: NMT 50 ppm per nitrati e NMT 0.10 ppm per nitriti), acqua di osmosi, acqua demineralizzata e acqua depurata (opportunamente analizzate con il limite per nitrati come segue: NMT 0.2 ppm). Inoltre, non viene effettuata l'aggiunta di clorammine. In queste circostanze il rischio attribuibile all'acqua è considerato trascurabile.

CATEGORIA 6: indicazione se le attrezzature utilizzate sono dedicate alla produzione di un singolo principio attivo o meno. Le attrezzature utilizzate vengono impiegate per il processo produttivo di diversi principi attivi (no sartani); tuttavia, sulla base delle procedure di pulizia convalidate ed applicate, è improbabile che sia presente il rischio di contaminazione crociata.

Al fine di facilitare la comprensione del contributo di ciascuna categoria al rischio complessivo, viene assegnata una classificazione parziale (**Tabella 7**).

I punteggi ottenuti sono presentati nella **Tabella 8**. Sulla base dei dati raccolti per la valutazione del rischio relativo alla benserazide cloridrato, il punteggio totale ottenuto è **120** e l'API è considerato a basso rischio (rischio trascurabile). Il punteggio ottenuto rende non necessaria l'esecuzione dello Step 2.

**Tabella 7** Classificazione parziale.

	CATEGORIE 1-4	CATEGORIE 5-6
<b>IMPATTO BASSO</b>	≤30	≤3
<b>IMPATTO MODERATO</b>	31 - 64	4 - 9
<b>IMPATTO ALTO</b>	≥65	≥10

Tabella 8 Punteggi ottenuti.

CATEGORIA	RISCHIO DI FORMAZIONE DI NITROSAMMINE IDENTIFICATO	COMMENTO	PUNTEGGIO PARZIALE
1	MODERATO	Nel processo produttivo vengono utilizzati alcuni agenti 'nitrosabili' (ammine primarie e secondarie, ammidie secondaria) e anche il carbone attivo, tuttavia non sono presenti agenti nitrosanti. L'impatto è moderato.	57
2	BASSO	Nonostante la presenza di alcuni agenti 'nitrosabili' tra gli starting materials e gli intermedi, poiché nel processo produttivo non vengono utilizzati agenti nitrosanti, l'impatto è basso.	0
3	BASSO	Nei solventi utilizzati per la sintesi non sono presenti alert structures e tutti i solventi vengono usati freschi. Le dichiarazioni ufficiali dei fornitori sono disponibili parzialmente. L'impatto è basso.	27
4	BASSO	Nonostante la presenza di idrato di idrazina, utilizzato come reagente nella fase 2 della sintesi, poiché nel processo produttivo non sono presenti agenti nitrosanti, l'impatto è basso. Negli altri reagenti/catalizzatori utilizzati non sono presenti alert structures e tutti i reagenti e catalizzatori sono utilizzati freschi. Le dichiarazioni ufficiali dei fornitori sono disponibili parzialmente.	27
5	BASSO	Basandosi sulle informazioni disponibili, il rischio attribuibile all'acqua impiegata nella sintesi è considerato trascurabile. L'impatto è basso.	0
6	MODERATO	L'attrezzatura utilizzata viene impiegata per la sintesi di diversi principi attivi (no sartani). L'impatto è moderato.	9
<b>TOTALE</b>			<b>120</b>

Oltre agli aspetti descritti sopra, si aggiungono le seguenti osservazioni: gli operatori coinvolti nelle attività di produzione vengono adeguatamente formati e il materiale utilizzato per l'imballaggio primario è il polietilene, che non presenta alcun rischio di formazione di nitrosammine.

Le informazioni raccolte durante l'esecuzione dello Step 1 e riportate nella tabella 'matrice' sono utili per l'emissione del report di valutazione del rischio utilizzando il modello messo a disposizione dall'APIC. Nel caso della benserazide cloridrato, questo report è stato emesso affermando che il rischio di formazione di nitrosammine durante la produzione dell'API è trascurabile.

Il modello del "Report on the Risk of Potential Presence of Nitrosamine Impurities" è disponibile sul sito web dell'APIC [10]. Deve essere compilato per un principio attivo alla volta ed è conforme ai requisiti applicabili per la valutazione del rischio nell'ambito delle nitrosammine come specificato dalle autorità regolatorie competenti. È composto da 8 sezioni. La sezione 1 "Introduction - Introduzione" afferma che il questionario è stato preparato in linea con i requisiti dell'EMA e si basa anche sui requisiti della FDA statunitense e di altre autorità regolatorie come Health Canada. Nella sezione 2 "Scope - Campo di applicazione" è specificato quali punti dovrebbero essere valutati nel corso della valutazione del rischio e quali fonti di potenziale contaminazione da nitrosammine possono verificarsi. Nella sezione 3 "Manufacturing/process steps covered by risk evaluation - Fasi di produzione/processo coperte dalla valutazione del rischio" va descritto il processo di produzione dell'API. La sezione 4 "Risk evaluation methodology - Metodologia di valutazione del rischio" spiega che il metodo applicato per eseguire la valutazione del rischio tiene conto della rilevanza per gruppi nitro e amminici definita secondo le seguenti dimensioni: gravità, presenza e criticità dello step. La sezione 5 "Summary of items reviewed for the risk evaluation - Riepilogo degli elementi esaminati per la valutazione del rischio" elenca tutti i punti presi in considerazione durante la va-

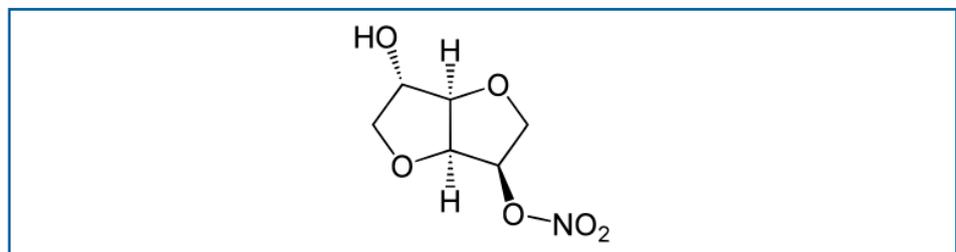
lutazione del rischio. I fattori di rischio sono suddivisi in tre categorie: fattori di rischio legati alla produzione del principio attivo; fattori di rischio legati anche al prodotto finito; fattori di rischio legati agli aspetti GMP. La sezione 6 “Risk outcome – Esito della valutazione del rischio” mostra il risultato ottenuto: il rischio della presenza di nitrosammine può essere dichiarato trascurabile oppure potenzialmente presente. Inoltre, vi è una tabella che elenca le impurezze da nitrosammine (se potenzialmente presenti), la fonte della contaminazione e le misure di mitigazione con i risultati dei test analitici. Nella sezione 7 “Additional information to support the risk evaluation by the drug product manufacturer/marketing authorization holder (MAH) - Ulteriori informazioni a supporto della valutazione del rischio del fabbricatore del prodotto farmaceutico/titolare dell’autorizzazione all’immissione in commercio (MAH)” il produttore dell’API deve indicare se è probabile che gli agenti nitrosanti non siano presenti nell’API finale o, al contrario, vi sia un rischio dovuto alla potenziale presenza di agenti nitrosanti nell’API finale. La stessa dichiarazione deve essere fatta per le sostanze ‘nitrosabili’. Tutti gli agenti nitrosanti e/o sostanze ‘nitrosabili’ rilevati devono essere elencati nelle tabelle della sezione 7. Nella sezione 8 “Changes in manufacturing process with potential impact on nitrosamine impurity formation - Modifiche al processo produttivo con potenziale impatto sulla formazione di impurezze da nitrosammine” si sottolinea che, in caso di modifiche al processo produttivo, starting materials, fornitori ecc. che possono influenzare questa valutazione del rischio, tale impatto sarà valutato, la valutazione sarà rivista quando necessario e i clienti saranno informati del risultato [10].

#### CASE STUDY 2 – Isosorbide-5-mononitrato

Il principio attivo isosorbide-5-mononitrato (IS5MN) appartiene a un gruppo di farmaci chiamati nitrati organici. Agisce rilassando i vasi sanguigni e facilitando il flusso di sangue e ossigeno al cuore riducendone il carico di lavoro. È indicato per la terapia di mantenimento dell’insufficienza coronarica, nella prevenzione degli attacchi di angina pectoris, nel trattamento di recupero della funzionalità cardiaca dopo un infarto e nel trattamento dell’insufficienza cardiaca cronica. L’isosorbide-5-mononitrato agisce come profarmaco per l’ossido nitrico (NO) che è un potente vasodilatatore [9]. La somministrazione avviene per via orale. La struttura chimica dell’isosorbide-5-mononitrato è mostrata in **Figura 2** e la sua formula molecolare è  $C_6H_9NO_6$ .

L’isosorbide-5-mononitrato è un principio attivo prodotto da Dipharma. La valutazione del rischio per la presenza di nitrosammine per questo API è stata effettuata dall’azienda subito dopo l’inizio dell’emergenza nel 2018. Il punteggio totale ottenuto durante la valutazione dello Step 1 era **222** e l’API era perciò considerato a rischio moderato. Per questo motivo il rischio di formazione di nitrosammine in IS5MN (puro e diluito) è stato definito potenzialmente presente. Possibili impurezze da nitrosammine erano NDMA, NDEA e NED3A. Come già spiegato, la procedura di valutazione del rischio è composta da 3 step e, se durante il primo step la valutazione individua il rischio della presenza di nitrosammine, è necessario procedere con lo Step 2 per effettuare le analisi per poter confermare la presenza della presunta nitrosammina nel principio attivo e stabilire se le eventuali quantità presenti superano i limiti stabiliti. Nel caso specifico dell’isosorbide-5-mononitrato, dopo aver eseguito i test di conferma durante lo Step 2, è stato dimostrato che il rischio della presenza di nitrosammine nell’API (puro e diluito) era improbabile: i dati analitici ottenuti hanno dimostrato che tutti i risultati erano inferiori al 10% del limite calcolato in tutti i casi (NDMA, NDEA, NED3A). L’esecuzione dello Step 2 ha consentito di riclassificare il rischio come trascurabile. Per quanto riguarda le nitrosammine NDMA e NDEA, sono state eseguite le seguenti analisi nell’ambito dei test di conferma dello Step 2:

**Figura 2**  
Struttura di  
isosorbide-5-mononitrato.



- Secondo la policy di Dipharma, la presenza di nitrosammine NDMA e NDEA è sempre verificata nei prodotti con il potenziale rischio di presenza e l'eventuale presenza viene verificata mediante specifici metodi validati. Sebbene le analisi fossero già state eseguite, sono state ripetute internamente considerando il 10% del limite accettabile in base all'AI (**Tabella 9**).

I limiti sono stati stabiliti sulla base dell'assunzione accettabile (AI) delle due nitrosammine in esame e della dose massima giornaliera (MDD) di isosorbide-5-mononitrato applicando la seguente formula:

$$AI/MDD = \text{ppb limit}$$

Dove:

AI = ng/day

MDD = g/day

**Tabella 9** Calcolo dei limiti per NDMA e NDEA.

Nitrosammina	AI (ng/day) (EMA)	MDD (g/day) isosorbide-5-mononitrato (Drugs.com)	Limite ppb
NDMA	96	0,24	400
NDEA	26,5	0,24	110

I limiti stabiliti sono i seguenti: NDMA NMT 400 ppb; NDEA NMT 110 ppb.

Lo screening dei lotti eseguito su 19 diversi lotti di isosorbide-5-mononitrato su un periodo di produzione di cinque anni ha mostrato che sia NDMA che NDEA erano al di sotto dei limiti di rivelabilità o detezione (LOD) in tutti i casi testati (NDMA: LOD = 12 ppb; NDEA: LOD = 3,3 ppb). Pertanto, i risultati erano conformi allo 'scenario c' menzionato nella linea guida EMA, che riporta che in caso di nitrosammina non rilevata o con AI  $\leq 10\%$  non sono necessarie ulteriori azioni.

Relativamente alla nitrosammina NED3A, nell'ambito dei test di conferma dello Step 2, sono state adottate le seguenti misure di mitigazione:

- È stata eseguita una valutazione in-silico della genotossicità per l'ipotetica impurezza da nitrosammina NED3A che poteva formarsi nel processo produttivo dell'API isosorbide-5-mononitrato. Sono state applicate due metodologie complementari (QSAR (*Quantitative structure-activity relationship*) come indicato dalle linee guida ICH M7. Le metodologie complementari ('*expert rule-based*' e '*statistical*') applicate sono state: TEST di EPA e Piattaforma VEGA dell'Istituto Mario Negri. Questi software regolatori vengono utilizzati per identificare gli *alert* strutturali di mutagenicità, eventuali meccanismi di genotossicità e per prevedere la potenziale genotossicità di sostanze senza dati sperimentali. Dopo una valutazione dettagliata, l'impurezza NED3A è risultata mutagena ed è stata assegnata alla Classe 3. Secondo il capitolo 6 de "la linea guida ICH M7 (R1) sulla valutazione e il controllo delle impurezze reattive di DNA (mutagene) nei prodotti farmaceutici per limitare il potenziale rischio cancerogeno", la definizione di impurezza della Classe 3 corrisponde a: *alert structure*, non correlata alla struttura del farmaco, nessun dato di mutagenicità. In questo caso l'azione proposta per il controllo è: un controllo pari o inferiore ai limiti accettabili (TTC appropriato - *Threshold of Toxicological Concern*) o l'esecuzione di un test di mutagenicità batterica. Possono verificarsi 2 casi diversi:
  - se mutagena: l'impurezza deve essere riclassificata in Classe 2, che corrisponde a mutageni noti con la potenziale attività cancerogena sconosciuta; l'azione proposta è: un controllo pari o inferiore ai limiti accettabili;
  - se non mutagena: l'impurezza deve essere riclassificata in Classe 5, che corrisponde a nessun alert strutturale, o una *alert structure* con dati sufficienti per dimostrare l'assenza di mutagenicità o cancerogenicità; l'azione proposta è: trattarla come un'impurezza non mutagena;
- È stato condotto uno studio preliminare per sviluppare il metodo LC/MS per la quantificazione di NED3A nell'isosorbide-5-mononitrato prodotto da Dipharma. I risultati ottenuti dallo screening dei lotti hanno mostrato un contenuto di NED3A inferiore a 30 ppb con l'eccezione di un caso in cui il contenuto era di 50 ppb.
- Al fine di definire la migliore strategia da applicare e seguendo l'approccio della linea guida ICH M7, Dipharma ha deciso di eseguire il test di Ames, che fungeva da lettura qualitativa per la potenziale attività mutagena dell'impurezza NED3A,

basandosi sull'azione proposta per il controllo di impurezze di Classe 3 definite nella linea guida. In caso di potenziale attività mutagena confermata dal test di Ames, il limite da applicare è di 18 ng/giorno. Al contrario, in caso di potenziale attività non mutagena confermata, l'impurezza deve essere trattata secondo le indicazioni della linea guida ICH M7, riferite alla classe corrispondente. Il test di Ames eseguito ha mostrato un chiaro risultato negativo e non sono state intraprese ulteriori indagini. E' stato concluso che la nitrosammina NED3A non induceva la mutazione inversa in *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli* sia in assenza che in presenza dell'estratto di fegato di ratto S9, un enzima epatico in grado di attivare metabolicamente i mutageni nelle condizioni sperimentali riportate. Secondo le indicazioni riportate dalla linea guida ICH M7 (R1): "un test di mutagenicità batterica negativo opportunamente condotto annullerebbe qualsiasi preoccupazione basata sulla struttura e non si raccomandano ulteriori valutazioni di genotossicità. Tali impurezze devono essere considerate non mutagene (Classe 5)." Pertanto, secondo le indicazioni della linea guida ICH M7 (R1), la nitrosammina NED3A è stata trattata come non mutagena.

- In base a quanto sopra, l'impurezza NED3A poteva essere trattata come una potenziale impurezza ordinaria, con un limite NMT 0,10%. Successivamente sono stati condotti ulteriori studi impiegando un metodo HPLC adeguato e validato, considerando i seguenti limiti:

*Specification limit* (limite di specifica) = NMT 0,10%

LOQ = 0,005% (limite di quantificazione)

LOD = 0,0015% (limite di rivelabilità o detezione)

Lo screening dei lotti è stato eseguito su 19 lotti industriali dell'API coprendo un periodo di produzione di cinque anni (dal 2015 al 2020). Sulla base dei risultati dei test analitici, NED3A era al di sotto del limite di detezione in tutti i lotti testati e quindi soddisfaceva il limite accettabile di NMT 0,10%. Pertanto, non sarebbe stato necessario effettuare i test di routine sull'API.

Nel 2022 è stato affermato esplicitamente che le autorità regolatorie non avrebbero accettato un test di Ames negativo come unica prova dell'assenza di proprietà mutagene di una nitrosammina. Il test di Ames è un test biologico per valutare la potenziale attività mutagena dei composti chimici e viene utilizzato per determinare l'attività mutagena dei prodotti chimici osservando se causano mutazioni nei batteri [11]; tuttavia, alcune nitrosammine mostrano la mutagenicità in vivo nonostante l'esito negativo del test di Ames. A quel punto, poiché il test di Ames utilizzato per l'analisi della nitrosammina NED3A non era più ritenuto sufficiente, Dipharma ha dovuto effettuare un'ulteriore valutazione della nitrosammina con un metodo diverso per confermare che il limite fosse accettabile. Al posto del test di Ames, sono state intraprese le seguenti azioni:

- La valutazione della presenza della nitrosammina NED3A nell'isosorbide-5-mononitrato è stata ripetuta con un metodo analitico più performante. Questo metodo, infatti, ha permesso di ottenere dati più robusti e di raggiungere il 10% del limite basato sull'AI. Per questo screening si è deciso di testare solo i lotti recenti in quanto erano quelli disponibili e quelli prodotti secondo l'attuale processo produttivo. Il limite è stato stabilito sulla base dell'AI della nitrosammina in esame e della MDD di IS5MN applicando la formula (**Tabella 10**):

$$AI/MDD = \text{ppb limit}$$

**Tabella 10** Calcolo del limite per NED3A.

Nitrosammina	AI (ng/day) (EMA)	MDD (g/day) isosorbide-5-mononitrato (Drugs.com)	Limite ppb
NED3A	18	0.24	75

*Il limite stabilito è il seguente: NED3A NMT 75 ppb.*

La convalida è stata eseguita come un test limite al 10% del limite target (NED3A = 7.5 ppb), il limite corrispondente al LOQ del metodo. Il LOD è stato fissato a 1/3 dello standard di 7.5 ppb (2.5 ppb). Lo screening eseguito su 10 lotti ha evidenziato l'assenza della nitrosammina (<7.5 ppb) in tutti i campioni esaminati. Il test eseguito in questo studio e i dati raccolti hanno dimostrato che la procedura analitica LC/MS sviluppata per la quantificazione di NED3A nell'isosorbide-5-mononitrato era adatta

allo scopo previsto. Lo screening eseguito su 10 lotti recenti e prodotti nello stabilimento di produzione di Dipharma ha mostrato che il contenuto di NED3A era sempre inferiore a 7.5 ppb, ovvero il 10% del limite calcolato (75 ppb).

La nuova conclusione coincide con la precedente: il rischio della presenza di nitrosammine nell'isosorbide-5-mononitrato (puro e diluito) si è dimostrato improbabile sulla base della conferma dell'assenza delle nitrosammine riportate durante l'esecuzione dello Step 1, come risultato da dati analitici che dimostrano che tutti i valori sono inferiori al 10% del limite calcolato in tutti i casi (NDMA, NDEA, NED3A). Sulla base delle evidenze raccolte, il rischio di presenza di nitrosammine nell'API isosorbide-5-mononitrato è stato ridefinito come trascurabile e i dati forniti dalle nuove analisi hanno consentito di aggiornare il report di valutazione del rischio [10].

### Aspetti regolatori – ASMF/DMF E CEP

Il report sulla valutazione del rischio è essenziale per consentire ai MAH di condurre la propria valutazione del rischio del prodotto finito ed è utilizzato anche nella stesura dell'*Active Substance Master File* (ASMF), chiamato anche *Drug Master File* (DMF) - una sezione specifica del dossier che fornisce dati completi su un principio attivo (chimica, produzione, stabilità, purezza, profilo di impurezze, confezionamento, aspetti cGMP). L'ASMF/DMF è presentato all'autorità regolatoria competente ed è diviso in 2 parti: *Applicant's Part* (USA: Open Part), che contiene tutte le informazioni necessarie per il titolare per valutare la qualità e presentare una domanda per un'autorizzazione o una modifica, e *Restricted Part* (US: Closed Part), che contiene informazioni riservate sulla procedura di produzione e sulla sua convalida, divulgate solo alle autorità. Le informazioni sulla valutazione del rischio per la presenza di nitrosammine possono essere trovate nella sezione '*Impurity Profile*' dell'ASMF/DMF [12][13]. Inoltre, le informazioni raccolte grazie alle analisi effettuate sono utili per l'ottenimento del CEP - *Certificate of Suitability to European Pharmacopoeia* (un certificato disponibile solo per i principi attivi presenti nella Farmacopea Europea). Il CEP rappresenta uno dei tre modi per fornire le informazioni su un principio attivo. L'autorità di emissione è la EDQM - *European Directorate for the Quality of Medicines*, e il titolare del CEP - il produttore dell'API - è responsabile della sua applicazione e dell'intero ciclo di vita del documento. Il CEP è facoltativo e non obbligatorio per gli API presenti nella Farmacopea Europea. Il certificato consente al produttore di un principio attivo di dimostrare che la qualità di tale principio attivo è controllata secondo la relativa monografia. Il CEP è accettato in tutti gli stati membri dell'Unione Europea e da tutti gli stati che hanno aderito alla Convenzione per l'elaborazione di una Farmacopea europea - *Convention for the creation of a European Pharmacopoeia* (compreso il Regno Unito) [14].

## Conclusioni

Le prime informazioni sugli effetti teratogeni, mutageni e genotossici delle nitrosammine sono apparse a metà del XX secolo. Fonti di nitrosammine nell'ambiente umano sono, ad esempio, salumi, carni trasformate, acqua potabile, fumo di tabacco e alcune materie plastiche. La scoperta della presenza di nitrosammine in alcuni medicinali è stata accolta con grande preoccupazione nel 2018 [15] e da allora si è reso necessario ritirare dal commercio migliaia di prodotti farmaceutici in tutto il mondo a causa della presenza inaspettata di nitrosammine.

Oltre alla classe farmacologica dei sartani, anche i farmaci antidiabetici, gli antistaminici e gli antibiotici sono stati oggetto di indagine [16].

La prima categoria di farmaci in cui è stata dimostrata la presenza di composti cancerogeni sono stati i sartani (valsartan, losartan, irbesartan) e successivamente anche metformina, ranitidina, nizatidina, rifapentina e rifampicina [16].

Le indagini effettuate hanno dimostrato che nel caso dei sartani le nitrosammine erano delle impurezze del processo di sintesi, formatesi nella fase di formazione dell'anello tetrazolico da azidi organici o inorganici. Nel caso degli antibiotici macrolidi del gruppo delle ansamicine le nitrosammine erano sempre delle impurezze legate al processo di sintesi, e nel caso di metformina, ranitidina e nizatidina risultavano essere prodotti di degradazione di composti medicinali [15].

Quando si scoprì che le nitrosammine potevano essere presenti in alcuni farmaci che erano in uso nel trattamento dell'ipertensione già da più di 5 anni, cioè dall'ultima modifica della sintesi da parte del produttore del farmaco, furono condotti studi os-

servazionali retrospettivi che hanno portato ad accertare il livello di rischio di cancro associato all'assunzione di preparati contaminati [15].

È importante sottolineare che le impurezze da nitrosammine possono essere introdotte in un prodotto farmaceutico in diverse fasi del processo produttivo perché i possibili contaminanti potrebbero provenire da una varietà di fonti: principio attivo, eccipienti, solventi, degradazione del prodotto o imballaggio.

L'EMA ha sviluppato un piano d'azione per i medicinali per valutare il rischio di formazione di nitrosammine. La procedura è composta da 3 passaggi. Il primo prevede la valutazione del rischio della presenza di nitrosammine. In caso di rischio rilevato, il secondo passaggio prevede lo svolgimento di analisi volte a confermare o smentire le ipotesi relative alla presenza di nitrosammine. L'ultimo passaggio, se risulta necessario, prevede delle modifiche al processo produttivo e l'introduzione di controlli per ridurre la presenza di nitrosammine.

Grazie agli sforzi delle autorità, dei produttori di principi attivi e dei produttori di prodotti finiti, è stato possibile creare metodi validi ed efficaci per effettuare un'analisi di rischio affidabile che consenta di identificare il possibile rischio di formazione di nitrosammine nei medicinali. Inoltre, questi rischi, quando individuati, possono essere evitati, garantendo la tutela della salute dei pazienti la cui vita dipende spesso dalla terapia farmacologica.

## Bibliografia

- [1] Nitrosamines – USP standards and solutions respond to drug recalls. Available at: <https://www.usp.org/small-molecules/nitrosamine-impurities> [Accessed December 2022].
- [2] Nitrosamine impurities in medicines: what's the risk? Available at: <https://qualitymatters.usp.org/nitrosamine-impurities-medicines-whats-risk> [Accessed December 2022].
- [3] Questions and answers for marketing authorization 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. Available at: [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](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) [Accessed December 2022].
- [4] Assessment report, Procedure under Article 5(3) of Regulation EC (No) 726/2004, Nitrosamine impurities in human medicinal products. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf) [Accessed December 2022].
- [5] Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs> [Accessed December 2022].
- [6] Li K, Ricker K, Feng C, Tsai, ChingYi J, Hsieh, Osborne G, Meng Sun, Marder ME, Elmore S, Schmitz R, Sandy MS. Estimated Cancer Risks Associated with Nitrosamine Contamination in Commonly Used Medications. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18(18): 9465.
- [7] Nitrosamines Risk Assessment Protocol – Rev. 01 – Dipharma Francis srl. 2021.
- [8] European Medicines Regulatory Network approach for the implementation of the CHMP Opinion pursuant to Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 for nitrosamine impurities in human medicines. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/european-medicines-regulatory-network-approach-implementation-chmp-opinion-pursuant-article-53/2004-nitrosamine-impurities-human-medicines\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/european-medicines-regulatory-network-approach-implementation-chmp-opinion-pursuant-article-53/2004-nitrosamine-impurities-human-medicines_en.pdf) [Accessed December 2022].
- [9] Goodman LS, Gilman A. *The Pharmacological Basic of Therapeutics*. Editors: Brunton L, Chabner B, Knollman B, 12th Edition, New York, 2011; 615, 747-751, 753.
- [10] <https://apic.cefic.org/publication/nitrosamines> [Accessed December 2022].
- [11] Vijay U, Gupta S, Mathur P, Suravajhala P, Bhatnagar P. Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. *Bio Protoc*. 2018; 8(6): e2763.
- [12] Active substance master file procedure - Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/active-substance-master-file-procedure-scientific-guideline> [Accessed March 2023].
- [13] Drug Master Files (DMFs). Available at: <https://www.fda.gov/drugs/forms-submission-requirements/drug-master-files-dmfs> [Accessed March 2023].
- [14] The European Pharmacopoeia and certificates of suitability (CEP). Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-european-directorate-quality-medicines-healthcare-edqm-european-pharmacopoeia\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-european-directorate-quality-medicines-healthcare-edqm-european-pharmacopoeia_en.pdf) [Accessed February 2023].
- [15] Dominiak K, Lewandowska M, Dettlaff K. Nitrosamines in medicinal products. *Farm Pol*. 2022; 78(3): 151-158.
- [16] Schmidtsdorff S, Neumann J, Schmidt A H, Parr M K. Risk assessment for nitrosated pharmaceuticals: A future perspective in drug development. *Arch Pharm*. 2022; 355(4).