

Fachbereich Toxikologie und Biologie

Relevanzprüfung der **Grundwassermetaboliten** der **Produkte** mit dem **Wirkstoff** Chlo-rothalonil im Rahmen der (teil-)gezielten Überprüfung

Beurteilung der im Rahmen des rechtlichen Gehörs eingereichten toxikologischen Informationen

3.12.2019

Inhaltsverzeichnis

1.	Ausgangslage	3
2.	Relevanzbeurteilung unter Berücksichtigung der nachgereichten Daten	3
2.1	R417888 (M12): Nachgereichte Daten	3
2.1.1	Auswertung In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay	3
2.1.2	Auswertung Validation Of Bioanalytical Method: Rat Plasma	8
2.1.3	Auswertung In Vitro Mikronukleus Test in Humanlymphozyten	8
2.1.4	R417888 (M12): Beurteilung Relevanz	14
2.2	R182281 (SDS-3701): Nachgereichte Daten	15
2.2.1	Auswertung In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay	15
2.2.2	Auswertung Validation Of Bioanalytical Method: Rat Plasma	21
2.2.3	R182281 (SDS-3701): Beurteilung Gentoxizität	22
2.3	SYN548764 (SYN548581M11): Nachgereichte Daten	22
2.3.1	Auswertung S. typhimurium and E. coli Reverse Mutation Assay	22
2.3.2	Auswertung In Vitro Micronucleus Test In Human Lymphocytes	27
2.3.3	Auswertung Gene Mutation Assay In Chinese Hamster V79 Cells In Vitro	34
2.3.4	SYN548764 (SYN548581, M11): Beurteilung Relevanz	39
3.	Übertragungskonzept (<i>Read-across</i>)	39
4.	Schlussfolgerungen und Zusammenfassung	40
5.	Anhang	40
5.1	Bibliographie	40
5.2	Gruppierung der Metaboliten für Read-across	42
5.3	Datenbasis für die Gruppierung der Metaboliten zwecks read-across Beurteilung	43

1. Ausgangslage

Bei der (teil-)gezielten Überprüfung der Produkte mit dem Wirkstoff Chlorothalonil bezüglich Eintrag ins Grundwasser, wurden u.a. die Grundwassermetaboliten R417888 und SYN548764 unter Berücksichtigung des Leitfadens Sanco/221/2000 –rev.10- final (Europäische Kommission, 2003) durch das BLV als relevant beurteilt (BLV, 2019). Im Rahmen des rechtlichen Gehörs zur (teil-)gezielten Überprüfung hat die Bewilligungsinhaberin von Chlorothalonil weitere toxikologische Untersuchungen zu den Grundwassermetaboliten R417888 und SYN548764 eingereicht. Diese Untersuchungen werden in diesem Gutachten bewertet und einbezogen, um die Relevanz der Grundwassermetaboliten R417888 und SYN548764 neu zu bewerten.

Zudem hat die Bewilligungsinhaberin weitere Studien mit dem Metaboliten R182281 eingereicht, einem Metaboliten in pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln, der auch Teil der entsprechenden Rückstandsdefinitionen ist (sowohl Vollzug als auch Risikobewertung). Für R182281 kann aufgrund der bisherigen Datenlage ein gentoxisches Potential nicht ausgeschlossen werden (BLV, 2019; EFSA, 2018). Auch die mit R182281 eingereichte Studie wird hier beurteilt.

Um die Relevanz der Grundwassermetaboliten SYN507900 und R611968 zu beurteilen, hat die Bewilligungsinhaberin ein *read-across* vom Metaboliten R182281 vorgeschlagen. Das Beurteilungskonzept des *read-across* zur Relevanzbeurteilung von Grundwassermetaboliten wird vom BLV grundsätzlich akzeptiert. SYN507900 und R611968 werden momentan als relevant betrachtet (BLV, 2019). Im vorliegenden Gutachten wird also unter Berücksichtigung der neuen toxikologischen Erkenntnisse zu R182281 die Relevanz von SYN507900 und R611968 neu beurteilt. Ebenso wird der *read-across* ausgehend von R417888 unter Berücksichtigung der nachgereichten Daten neu beurteilt.

2. Relevanzbeurteilung unter Berücksichtigung der nachgereichten Daten

2.1 R417888 (M12): Nachgereichte Daten

Mit dem Metaboliten R417888 wurden im Rahmen des rechtlichen Gehörs die folgenden Studien eingereicht:

- R417888 – CrI:CD(SD) Rat In Vivo Comet Test. Report Number: GG30DP. [REDACTED], 2019.
- R417888 - Validation of a Bioanalytical Method for the Determination of R417888 in Rat Plasma (K2EDTA) using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection (LC-MS/MS). Report Number: LX12NW. Shah, Niksha, 2019
- R417888 - In Vitro Micronucleus Test in Human Lymphocytes. Report Number: FX04HP. Gilby, Ben, 2019.

Diese Studien werden nachfolgend beurteilt.

2.1.1 Auswertung In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay

Studientitel	R417888 – CrI:CD(SD) Rat In Vivo Comet Test
Referenz	[REDACTED], 2019
Durchführung	11. März 2019 – 14. August 2019
Testlabor	Covance CRS Limited, Woolley Road, Alconbury, Huntingdon, Cambridgeshire, PE28 4HS, United Kingdom
Reportreferenz	Report Number: GG30DP
Leitlinie(n)	OECD Guideline For The Testing Of Chemicals (2016): In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, Test Guideline 489
Abweichungen von der Leitlinie	Es werden im Studienbericht keine mit der Positivkontrollsubstanz erzeugte Dosis-Wirkungs-Kurven im Duodenum ausgewiesen. Es wird davon ausgegangen, dass dies die Gültigkeit der Ergebnisse des Tests nicht in Frage stellt.

GLP	Ja
Testmaterial	R417888, batch number MES 517/1, purity 98 % (w/w)

In einem *in vivo* Comet-Assay wurde das Potential von R417888 untersucht, in der DNA von Leber- und Duodenalzellen von Crl:CD(SD) Ratten Strangbrüche zu induzieren. Die folgende Abweichung von der Testleitlinie wurde festgestellt:

Nebst der Leber wurde das Duodenum untersucht. In der Testrichtlinie wird bestimmt, dass für andere Gewebe als der Leber, mit der Positivkontrollsubstanz in diesen Geweben erzeugte Dosis-Wirkungs-Kurven im Testbericht ausgewiesen werden müssen (OECD, 2016a). Solche Dosis-Wirkungs-Kurven für das Duodenum fehlen im Testbericht. Diese Abweichung stellt die Gültigkeit der Testergebnisse nicht grundsätzlich in Frage. Mit der simultanen Positivkontrolle, 200 mg/kg KG Ethylmethansulfonat (EMS), wurde im durchgeführten Test im Duodenum verglichen mit der Negativkontrolle nämlich eine statistisch signifikante Erhöhung von DNA-Strangbrüchen beobachtet. Zudem umfassen die historischen Positivkontrollen welche das Duodenum betreffen und im Zeitraum zwischen März 2017 und März 2019 erzeugt wurden, 14 Studien. Dabei betrug das Minimum des Masses für Strangbrüche im Median 26 % *tail intensity* (TI), während in den entsprechenden historischen Negativkontrollen maximal 3 % TI gemessen wurden. Damit kann die Kompetenz des durchführenden Labors, Substanzen welche DNA-Strangbrüche im Duodenum verursachen als solche zu identifizieren, als hinreichend belegt betrachtet werden.

Material und Methoden

Gruppen von 6 männlichen Crl:CD(SD) Ratten wurden mittels Schlundsonde im Abstand von rund 24 h zwei Dosen von entweder 500, 1000 oder 2000 mg/kg KG R417888 in Carboxymethylcellulose verabreicht. Einer weiteren Gruppe von 6 Tieren, der Negativkontrolle, wurde jeweils Carboxymethylcellulose alleine verabreicht. Den drei Tieren der Positivkontrollgruppe wurde einmalig 200 mg/kg KG Ethylmethansulfonat (EMS) verabreicht. Ungefähr 0.5 h nach der zweiten Dosis (Test- und Negativkontrollgruppe, nach 3 h im Fall der Positivkontrolle) wurden aus Leber und Duodenum der Tiere Einzelzell-Suspensionen gewonnen. Die DNA dieser Zellen wurde danach mittels Einzelzell-Gelelektrophorese auf Strangbrüche untersucht.

Die höchste in diesem Comet-Assay verabreichte Dosis, 2000 mg/kg KG, wurde vorab in einem Versuch mit je zwei männlichen und weiblichen Crl:CD(SD) Ratten bestimmt. In einem weiteren Vorversuch wurden drei männlichen Ratten im Abstand von ungefähr 24 h zwei Dosen von 2000 mg/kg KG R417888 verabreicht, und 0.5, 1, 2, 4, 8 und 24 h nach der zweiten Gabe Blut entnommen und R417888 im Plasma gemessen. Die höchsten durchschnittlichen Plasmakonzentrationen wurden 0.5 h nach der zweiten Gabe gemessen. Deshalb wurden im Comet-Assay die Einzelzell-Suspensionen der Zielgewebe Leber und Duodenum 0.5 h nach der zweiten Dosierung, der angenäherten T_{max} (Plasma) von R417888, hergestellt. Die Bestimmung von R417888 im Rattenplasma erfolgte anhand einer validierten Methode (vgl. Abschnitt 2.1.2).

Resultate

Die Stabilität von R417888 in 0.5% Carboxymethylcellulose, dem Vehikel bei der Dosierung der Ratten mittels Schlundsonde, wurde mit einer validierten Methode überprüft und bestätigt.

Weder in den Leber- noch in den Duodenalzellen und in keiner der getesteten Dosen, war das Mass für DNA-Strangbrüche, die Fluoreszenz-Intensität im «Kometenschweif» (%TI), gegenüber der Negativkontrolle statistisch signifikant erhöht (Tabelle 1 und Tabelle 2). Bewertet werden die Gruppenmittelwerte des Median der %TI¹. Auch ergaben sich keine statistisch signifikante, zunehmende Dosis-

¹ Pro Tier wurden auf drei verschiedenen Objektträgern je fünfzig Zellen elektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet. Pro Objektträger wird der Median des Messwerts %TI bestimmt, der Mittelwert der drei Mediane entspricht dem relevanten Wert der individuellen Tiere. Aus diesen Mittelwerten der Mediane der individuellen Tiere werden die Gruppenmittelwerte bestimmt. Letztere werden statistisch beurteilt.

Effekt-Trends. In der Leber zeigte sich eine statistisch signifikante Verminderung der %TI und ein statistisch signifikanter negativer Trend.

Tabelle 1: Ergebnisse %TI in der Leber

Behandlung	Dosis (mg/kg/Tag)	Anzahl Zellen beurteilt	Gruppenmittelwert der Mediane der <i>tail</i> Intensität % (SD) #
Negativkontrolle	-	900	0.60 (0.3)
R417888	500	900	0.25* (0.2)
R417888	1000	900	0.22* (0.1)
R417888	2000	900	0.47* (0.3)
EMS	200	450	26.57****L+ (4.2)

Negativkontrolle: 0.5% Carboxymethylcellulose
 EMS: Ethylmethanesulfonat, Positivkontrolle, einmalig, ungefähr 3 Stunden vor Tötung der Tiere verabreicht
 SD: Standardabweichung
 # Fehler von ± 1% aufgrund Rundung der Werte für tabellarischen Präsentation der Resultate können auftreten
 Ausschliesslich die mediane Fluoreszenz-Intensität des «Kometenschweifs» wurde statistisch bewertet (einseitige Tests)
 p-Werte Ergebnisse der Vergleiche mit der Kontrolle mittels Williams Test, ausser falls mit (+) bezeichnet mit dem t-Test
 *** $p < 0.001$ (signifikant)
 * $p < 0.05$ (signifikant)
 L Analyse der log-transformierten Daten

Die %TI-Werte aller Dosisstufen (Gruppenmittelwerte der Mediane) sowohl der Leber- als auch der Duodenumzellen lagen innerhalb der 95%-Konfidenzgrenze der entsprechenden historischen Negativkontrolldaten des durchführenden Labors. Die Positivkontrollsubstanz EMS induzierte statistisch signifikant höhere TI-Werte als die Negativkontrolle.

Tabelle 2: Ergebnisse %TI im Duodenum

Behandlung	Dosis (mg/kg/Tag)	Anzahl Zellen beurteilt	Gruppenmittelwert des Medians der <i>tail</i> Intensität % (SD) #
Negativkontrolle	-	900	2.30 (0.8)
R417888	500	900	2.12 (0.6)
R417888	1000	900	2.46 (1.0)
R417888	2000	900	2.49 (0.6)
EMS	200	450	34.64**** (1.8)

Negativkontrolle: 0.5% Carboxymethylcellulose
 EMS: Ethylmethanesulfonat, Positivkontrolle, einmalig, ungefähr 3 Stunden vor Tötung der Tiere verabreicht
 SD: Standardabweichung
 # Fehler von ± 1% aufgrund Rundung der Werte für tabellarischen Präsentation der Resultate können auftreten
 Ausschliesslich die mediane Fluoreszenz-Intensität des «Kometenschweifs» wurde statistisch bewertet (einseitige Tests)
 p-Werte Ergebnisse der Vergleiche mit der Kontrolle mittels Williams Test, ausser falls mit (+) bezeichnet mit dem t-Test
 *** $p < 0.001$ (signifikant)
 * $p < 0.05$ (signifikant)

Die Anzahl sogenannter *hedgehog* Zellen in der Leber behandelter Tiere war gegenüber der Kontrolle erhöht: durchschnittlich wurden 0.0, 0.7, 2.0 und 0.8 *hedgehog* Zellen in der Kontrolle, und den Behandlungsgruppen 500, 1000 und 2000 mg/kg KG gefunden (vgl. Tabelle 3). Ein signifikanter Dosis-

Wirkungstrendscheint nicht vorzuliegen. Aus dem Studienreport geht aber nicht klar hervor, ob die Anzahl der *hedgehog* Zellen ebenfalls statistisch untersucht wurde.

Tabelle 3: Anzahl Hedgehog-Zellen in Duodenum

Behandlung (mg/kg/day)	Tiernummer	Duodenum		Liver	
		Anzahl Hedgehog Zellen	Gruppenmittel Anzahl Hedgehog-Zellen (SD)	Anzahl Hedgehog Zellen	Gruppenmittel Anzahl Hedgehog-Zellen (SD)
Negativkontrolle (-)	101	3 4	3.7 (0.8)	0	0.0 (0.0)
	102	3		0	
	103	3		0	
	104			0	
	105	4		0	
	106	5		0	
R417888 (500)	201	11	11.0 (3.3)	0	0.7 (1.2)
	202	12		1	
	203	15		0	
	204	11		0	
	205	12		0	
	206	5		3	
R417888 (1000)	301	14	12.5 (4.6)	0	2.0 (1.3)
	302	14		3	
	303	9		1	
	304	7		3	
	305	20		2	
	306	11		3	
R417888 (2000)	401	36	26.7 (8.3)	0	0.8 (1.2)
	402	21 29		1	
	403	16		3	
	404			0	
	405	22		1	
	406	36		0	
EMS (200)	501	1	0.3 (0.6)	0	0.0 (0.0)
	502	0		0	
	503	0		0	

Negativkontrolle: 0.5% Carboxymethylcellulose

EMS: Ethylmethanesulfonat, Positivkontrolle, einmalig, ungefähr 3 Stunden vor Tötung der Tiere verabreicht

Auch im Duodenum wurden *hedgehog* Zellen beobachtet: in der Negativkontrolle, den Behandlungsgruppen 500, 1000 und 2000 mg/kg KG R417888 betrug die durchschnittliche Anzahl an *hedgehog* Zellen 3.7, 11.0, 12.5 und 26.7 (vgl. Tabelle 3). Der Studienautor spricht von einer dosisabhängigen Zunahme. Aus dem Studienreport geht aber nicht klar hervor, ob die Anzahl der *hedgehog* Zellen statistisch auf einen Trend untersucht wurden.

Diskussion

Der Comet-Assay erfüllt sowohl in der Leber als auch im Duodenum die Kriterien der Leitlinie (OECD, 2016a) für ein negatives Resultat:

- a. keine der Testkonzentrationen weist eine statistisch signifikante Erhöhung der %TI, verglichen mit der Negativkontrolle auf
- b. mit einem geeigneten Trendtest wird keine konzentrationsabhängige Zunahme der %TI festgestellt
- c. alle Ergebnisse liegen innerhalb der Verteilung der zugehörigen historischen Negativkontrolldaten
- d. direkter oder indirekter Nachweis der Exposition / Toxizität des Zielgewebes

Der letztere Punkt wird als erfüllt angesehen, da R417888 nach Verabreichung per Gavage im Plasma nachgewiesen wurde (indirekter Nachweis) und der Comet-Assay mit der Limitdosis gemäss Leitlinie durchgeführt wurde (2000 mg/kg KG, OECD, 2016a).

Die Bedeutung der signifikanten und dosisabhängigen Abnahme der %TI in der Leber ist unklar. Die Ätiologie von *hedgehog* Zellen im Comet-Assay ist ebenfalls unklar. Der Studienautor erachtet die beobachtete Zunahme der *hedgehog* Zellen im Duodenum als behandlungsbedingt. Deren Ursache sei zwar unklar, sei aber wahrscheinlich auf Zytotoxizität zurückzuführen. Weiterführende Untersuchungen, z.B. Histopathologie, um durch die Gabe von R417888 verursachte Zytotoxizität im Duodenumgewebe zu belegen, wurden aber keine durchgeführt.

Schlussfolgerung des Studienautors / der Studienautorin

Unter den Bedingungen des Tests hat R417888, welches männlichen Crl:CD(SD) Ratten mittels Schlundsonde verabreicht wurde, zu keiner Erhöhung von DNA-Strangbrüchen in Leber- und Duodenumzellen geführt. R417888 erbrachte in diesem *in vivo* Comet-Assay ein negatives Resultat.

Schlussfolgerung BLV

Die Stabilität von R417888 in 0.5% Carboxymethylcellulose wurde mit einer validierten Methode bestimmt. Nach Einschätzung des Fachbereichs Laboratorien des BLV - es scheint keine Validierungsrichtlinien zu geben - sind die Parameter für die Validierung insgesamt adäquat gewählt und auch die Resultate sehen plausibel aus. Insbesondere werden im Rahmen der Validierung die höher konzentrierten Lösungen zur Analyse in den Arbeitsbereich verdünnt, so dass mit der Validierung effektiv ein Arbeitsbereich von 1-100 mg/mL Probe abgedeckt wird. Jedoch wäre es sehr sinnvoll, den vorgesehenen Arbeitsbereich (z.B. entsprechend dem validierten Bereich) anzugeben, um riesige Verdünnungsfaktoren klar auszuschliessen.

Zur Bestimmung von R417888 im Plasma anhand der validierten Methode (vgl. 2.1.2) gilt es zu bemerken, dass die Versuchs-Lösungen mit Ausnahme der 24 h Werte nach der Aufarbeitung gemäss validierter Methode oberhalb des Messbereichs lagen und 20-fach mit blank Matrix-Extrakt verdünnt wurden. Dieses Vorgehen ist gemäss den validierten Methoden grundsätzlich vorgesehen, war jedoch nicht Bestandteil der Validierung (d.h. es wurden im Rahmen der Validierungen keinerlei Verdünnungsversuche durchgeführt). Nach Einschätzung des Fachbereichs Laboratorien des BLV sollte diese Verdünnung (entspricht nicht guter Laborarbeit) unter üblichen Umständen nicht zu einer extremen Verfälschung der Resultate führen. Der Zeitpunkt der Gewinnung der Einzelzell-Suspensionen der Zielgewebe, 0.5 h nach der zweiten Dosierung, der angenäherten T_{max}, ist deshalb adäquat gewählt.

Die biologische Bedeutung der signifikanten und dosisabhängigen Abnahme der %TI in der Leber ist unklar.

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass die Entstehung von *hedgehog* Zellen ein Indikator sowohl für Zytotoxizität als auch für Gentoxizität sein können (e.g. Lorenzo, Y. et al.). Sind *hedgehogs* auf Gentoxizität zurückzuführen, entsprechen sie einer Stufe in einem Kontinuum von gentoxischen Schäden. In einem solchen Fall ist nebst einer Zunahme von *hedgehogs* auch immer eine Zunahme der %TI zu erwarten. Im Comet-Assay mit R417888 wurde keine Zunahme der %TI beobachtet und deshalb erachten wir die Zunahme von *hedgehog* Zellen nicht als Indikator für Gentoxizität, sondern als Hinweis auf andere, letztlich ungeklärte Effekte.

2.1.2 Auswertung Validation Of Bioanalytical Method: Rat Plasma

Studientitel	R417888 - Validation of a Bioanalytical Method for the Determination of R417888 in Rat Plasma (K2EDTA) using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection (LC-MS/MS)
Referenz	Shah, N., 2019
Durchführung	04. April – 11. Mai 2019
Testlabor	Covance CRS Limited Woolley Road, Alconbury, Huntingdon Cambridgeshire, PE28 4HS, United Kingdom
Reportreferenz	Report Number: LX12NW
Leitlinie(n)	SANCO/3029/99 Rev 4 (11/07/2000) for pre-registration data requirements and SANCO 825/00 Rev 8.1 (16/11/2010) for post-registration monitoring.
Abweichungen von der Leitlinie	-
GLP	Ja
Testmaterial	R417888, Batchnummer MES 517/1, 98 % Reinheitsgrad

Die Validierungsstudie zum Nachweis von R417888 in Rattenplasma wurde vom Fachbereich Laboratorien (FB LAB) des BLV bewertet. Der FB LAB schliesst, dass die LC-MS/MS Methoden gemäss den Unterlagen als geeignet erscheinen, um R417888 in Rattenplasma im Konzentrationsbereich von 0.05 bis 1.5 mg/L zu quantifizieren. Die Methoden erfüllen die Validierungsanforderungen gemäss SANCO/825/00 rev. 8.1 (16.11.2010) und SANCO/3029/99 rev.4 (11.07.2000).

2.1.3 Auswertung In Vitro Mikronukleus Test in Humanlymphozyten

Studientitel	R417888 - <i>In Vitro</i> Micronucleus Test in Human Lymphocytes
Referenz	Gilby, B., 2019
Durchführung	25. Februar 2019 – 3. April 2019
Testlabor	Covance CRS Limited Woolley Road, Alconbury, Huntingdon Cambridgeshire, PE28 4HS, United Kingdom
Reportreferenz	Report Number: FX04HP
Leitlinie(n)	OECD Guideline for the Testing of Chemicals (2016): <i>In vitro</i> mammalian Cell Micronucleus Test, Test Guideline 487
Abweichungen von der Leitlinie	Keine
GLP	Ja
Testmaterial	R417888, Batchnummer MES 517/1, 98 % Reinheitsgrad

In einem *in vitro* Mikronukleus-Test wurde das Potential von R417888 untersucht, in humanen Lymphozyten aus peripherem Blut die Inzidenz von Mikronuklei zu erhöhen. Mikronuklei können aus Chromosomenfragmenten mit fehlendem Zentromer oder aus intakten Chromosomen, welche während der Anaphase der Mitose nicht zu einem der Spindelpole zu migrieren vermochten, hervorgehen. Mittels des *in vitro* Mikronukleus-Tests können folglich sowohl aneugene (numerische Chromosomenaberrationen) als auch klastogene (strukturelle Chromosomenaberrationen) Wirkungen detektiert werden. Im vorliegenden Test wurden keine Abweichungen von der Testleitlinie festgestellt.

Material und Methoden

Es wurden Vor- und Hauptversuche durchgeführt. Hier werden ausschliesslich die Hauptversuche diskutiert. Humane Lymphozyten aus peripherem menschlichem Blut (Primärkulturen) zweier verschiedener Spender wurden mit Phytohämagglutinin (PHA) behandelt, um die Mitose anzuregen. Ungefähr 48 h nach der PHA-Stimulation wurden die Lymphozyten mit verschiedenen Konzentrationen von R417888 in DMSO und entweder mit oder ohne metabolischer Aktivierung mittels S9-Mix inku-

biert. Die Behandlungsdauer betrug entweder 3 oder 20 h. Da 2000 µg/ml R417888 in DMSO vollständig löslich waren und keine ausgeprägte zytotoxische Wirkung auf die Lymphozyten hatte, betrug die höchste getestete Konzentration 2000 µg/ml. Dies entspricht der maximal in der Testrichtlinie (OECD, 2016b) vorgesehenen Testkonzentration.

Die getesteten Konzentrationen und Behandlungspläne der Hauptversuche werden in Tabelle 4 gezeigt. Jeweils mindestens drei aufeinanderfolgende Testkonzentrationen wurden auf Mikronuklei untersucht (unterstrichen in Tabelle 4). Negativkontrollen (DMSO) und geeignete Positivkontrollen wurden jeweils mitgeführt. Bei den Negativkontrollen wurden jeweils 4 Replikate, bei den Positivkontrollen und den Behandlungsgruppen jeweils 2 Replikate untersucht.

Tabelle 4: Übersicht zur Behandlungsdauer, +/- metabolische Aktivierung mit S9-Mix, geprüfte Konzentrationen

Hauptstudie:	- S9-Mix, 3 h Behandlung	62.5, 125, 250, <u>500</u> , <u>1000</u> und <u>2000</u> µg/mL
	- S9-Mix, 3 h Behandlung (Wiederholung)	250, <u>500</u> , <u>1000</u> , <u>1500</u> und <u>2000</u> µg/mL
	+ S9-Mix, 3 h Behandlung	250, <u>500</u> , <u>1000</u> und <u>2000</u> µg/mL
	- S9-Mix, 20 h Behandlung	62.5, 125, 250, <u>500</u> , <u>1000</u> , <u>1500</u> und <u>2000</u> µg/mL

Unterstrichen: Kulturen, welche auf Mikrokerne analysiert wurde

Zur statistischen Bewertung wurde die arcsin-Wurzel-Transformation auf die Daten angewendet. Mit R417888 behandelte Gruppen wurden mittels Williams-Test, Positivkontrollen mittels t-Test mit den Negativkontrollen verglichen. Die Daten wurden mittels linearer Kontraste auf Trends untersucht. Das statistische Signifikanzniveau wurde bei 5% festgelegt.

Resultate

Negativ- und Positivkontrollen erbrachten die jeweils erwarteten Resultate und demonstrierten, dass das Testsystem im durchführenden Labor korrekt funktionierte (vgl. mit historischen Kontrolldaten des Labors, Tabelle 9, Tabelle 10 und Tabelle 11). In keinem der Behandlungsarme wurde relevante Zytotoxizität festgestellt. Bei einer Behandlungsdauer von 3 h und einer Inkubation ohne S9-Mix war die Anzahl Mikronuklei pro 1000 untersuchter Zellen bei der Behandlungskonzentration 2000 µg/mL gegenüber der Negativkontrolle statistisch signifikant erhöht (Tabelle 5) und lag auch ausserhalb der oberen 95%-Kontrollgrenze der historischen Negativkontrollen des Labors (Tabelle 9). Ein konzentrationsabhängiger, zunehmender Trend der Mikronukleus-Inzidenz wurde nicht festgestellt.

Tabelle 5: Hauptversuch, 3 h Behandlung mit R417888, ohne S9-Mix

Behandlung/ Konzentration (µg/mL)	Mittelwert Zytostase (%)	Zweikernige Zellen welche Mikronuklei enthalten			
		Pro 1000 Zellen	Mittelwert	p-Wert ^d	Trendtest p-Wert ^e
Negativkontrolle (Lösungsmittel) ^a	0.0	4 6 5 8	5.8		
R417888 / 500	1.8	6 6	6.0	1.000	
R417888 / 1000	2.9	7 3	5.0	1.000	0.564
R417888 / 2000	8.7	8 12	10.0	0.047*	0.078
MMC ^b / 0.3	35.1	31 35	33.0	<0.001***	
COL ^c / 0.06	23.7	25 24	24.5	<0.001***	

- ^a Lösungsmittelkontrolle = DMSO (0.5 % v/v)
- ^b Positivkontrolle (Klastogenität): Mitomycin C
- ^c Positivkontrolle (Aneugenität): Colchicin
- ^d *p*-Werte für den Williams-Test beim paarweisen Vergleich zwischen Behandlungsgruppe und Negativkontrolle, bzw. für den *t*-Test beim paarweisen Vergleich zwischen Positiv- und Negativkontrolle
- ^e *p*-Werte für den Trendtest mittels linearer Kontraste, welcher die Negativkontrolle und die unteren getesteten Konzentrationen beinhaltet
- * *p*<0.05, *** *p*<0.001

In einem Wiederholversuch wurden zusätzlich zu den R417888-Konzentrationen 500, 1000 und 2000 µg/mL, die Konzentration 1500 µg/mL auf Mikronuklei untersucht (3 h Inkubation, ohne S9 Mix). Beim Wiederholversuch wurde bei keiner der geprüften Konzentrationen eine statistisch signifikante Erhöhung der Mikronukleus-Inzidenz verglichen mit der Negativkontrolle festgestellt. In den Behandlungsgruppen ergab sich auch kein konzentrationsabhängiger statistisch signifikanter zunehmender Trend der Mikronukleus-Inzidenz und alle Inzidenzen lagen innerhalb der 95%-Kontrollgrenze der historischen Negativkontrollen des durchführenden Labors (Tabelle 6).

Tabelle 6: Hauptversuch, 3 h Behandlung mit R417888, ohne S9-Mix; Wiederholversuch

Behandlung/ Konzentration (µg/mL)	Mittelwert Zytostase (%)	Zweikernige Zellen welche Mikronuklei enthalten			
		Pro 1000 Zellen	Mittelwert	<i>p</i> -Wert ^d	Trendtest <i>p</i> -Wert ^e
Negativkontrolle (Lösungsmittel) ^a	0.0	4 8 4 6	5.5		
R417888 / 500	0.0 ^f	3 6	4.5	1.000	
R417888 / 1000	1.5	7 5	6.0	0.902	0.761
R417888 / 1500	2.0	9 5	7.0	0.695	0.343
R417888 / 2000	2.3	8 5	6.5	0.695	0.315
MMC ^b / 0.3	39.2	39 28	33.5	<0.001***	
COL ^c / 0.06	27.4	23 26	24.5	<0.001***	

- ^a Lösungsmittelkontrolle = DMSO (0.5 % v/v)
- ^b Positivkontrolle (Klastogenität): Mitomycin C
- ^c Positivkontrolle (Aneugenität): Colchicin
- ^d *p*-Werte für den Williams-Test beim paarweisen Vergleich zwischen Behandlungsgruppe und Negativkontrolle, bzw. für den *t*-Test beim paarweisen Vergleich zwischen Positiv- und Negativkontrolle
- ^e *p*-Werte für den Trendtest mittels linearer Kontraste, welcher die Negativkontrolle und die unteren getesteten Konzentrationen beinhaltet
- ^f Der Cytostase-Wert wird mit 0.0 ausgewiesen da der CBPI-Wert der Behandlungsgruppe ≥ jenem der Kontrollgruppe betrug
- * *p*<0.05, *** *p*<0.001

Sowohl bei einer Inkubationszeit von 3 h mit S9-Mix als auch bei einer Inkubationszeit von 20 h ohne metabolischer Aktivierung mit S9-Mix wurden bei den mit R417888 behandelten Zellen keine statistisch signifikanten Erhöhungen der Mikronukleus-Inzidenzen und keine konzentrationsabhängigen statistisch signifikanten zunehmenden Trends festgestellt (Tabelle 7 und Tabelle 8). Die beobachteten Mikronukleus-Inzidenzen der mit R417888 behandelten Zellen lagen zudem alle innerhalb der 95%-

Kontrollgrenze der historischen Negativkontrollen des durchführenden Labors (vgl. mit Tabelle 10 und Tabelle 11).

Tabelle 7: Hauptversuch, 3 h Behandlung mit R417888, mit S9-Mix

Behandlung/ Konzentration (µg/mL)	Mittelwert Zytostase (%)	Zweikernige Zellen welche Mikronuklei enthalten			
		Pro 1000 Zel- len	Mittelwert	p-Wert ^c	Trendtest p- Wert ^d
Negativkontrolle (Lö- sungsmittel) ^a	0.0	6 10 8 6	7.5		
R417888 / 500	0.0 ^e	9 10	9.5	1.000	
R417888 / 1000	7.9	7 6	6.5	0.788	0.494
R417888 / 2000	3.5	7 7	7.0	0.788	0.360
CPA ^b / 10	28.3	17 22	19.5	<0.001***	

^a Lösungsmittelkontrolle = DMSO (0.5 % v/v)

^b Positivkontrolle (Klastogenität): Cyclophosphamid (erfordert metabolische Aktivierung für klastogene Wirkung)

^c p-Werte für den Williams-Test beim paarweisen Vergleich zwischen Behandlungsgruppe und Negativkontrolle, bzw. für den t-Test beim paarweisen Vergleich zwischen Positiv- und Negativkontrolle

^d p-Werte für den Trendtest mittels linearer Kontraste, welcher die Negativkontrolle und die unteren getesteten Konzentrationen beinhaltet

^e Der Zytostase-Wert wird mit 0.0 ausgewiesen da der CBPI-Wert der Behandlungsgruppe \geq jenem der Kontrollgruppe betrug

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Tabelle 8: Hauptversuch, 20 h Behandlung mit R417888, ohne S9-Mix

Behandlung/ Konzentration (µg/mL)	Mittelwert Zytostase (%)	Zweikernige Zellen welche Mikronuklei enthalten			
		Pro 1000 Zel- len	Mittelwert	p-Wert ^d	Trendtest p- Wert ^e
Negativkontrolle (Lö- sungsmittel) ^a	0.0	6 6 6 6	6.0		
R417888 / 500	0.0 ^f	3 8	5.5	0.666	
R417888 / 1000	3.9	4 5	4.5	0.535	0.405
R417888 / 1500	3.3	2 8	5.0	0.535	0.372
R417888 / 2000	6.7	4 5	4.5	0.535	0.372
MMC ^b / 0.1	26.6	18 21	19.5	<0.001***	
COL ^c / 0.015	46.6	15 14	14.5	0.006**	

^a Lösungsmittelkontrolle = DMSO (0.5 % v/v)

^b Positivkontrolle (Klastogenität): Mitomycin C

- ° Positivkontrolle (Aneugenität): Colchicin
 - ° p-Werte für den Williams-Test beim paarweisen Vergleich zwischen Behandlungsgruppe und Negativkontrolle, bzw. für den t-Test beim paarweisen Vergleich zwischen Positiv- und Negativkontrolle
 - ° p-Werte für den Trendtest mittels linearer Kontraste, welcher die Negativkontrolle und die unteren getesteten Konzentrationen beinhaltet
 - f Der Zytostase-Wert wird mit 0.0 ausgewiesen da der CBPI-Wert der Behandlungsgruppe \geq jenem der Kontrollgruppe betrug
- ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tabelle 9: Historische Kontrolldaten des durchführenden Labors von Oktober 2016 bis Oktober 2018. 3 h Exposition, ohne S9-Mix (42 Studien)

	Negativkontrolle		Mitomycin C (0.2 oder 0.3 µg/mL)		Colchicin (0.05, 0.06 oder 0.07 µg/mL)	
	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)
Minimum	2.0	3.3	16.0	17.0	14.0	15.5
Maximum	14.0	10.5	62.0	58.0	48.0	47.0
Mittelwert	6.5	6.6	32.8	32.8	24.7	24.7
Standardabweichung	2.4	1.7	10.7	10.0	7.0	6.6
Untere 95% Kontrollgrenzen		3.1		20.7		11.5
Obere 95 Kontrollgrenzen		9.9		52.8		37.9

Tabelle 10: Historische Kontrolldaten des durchführenden Labors von Oktober 2016 bis Oktober 2018. 3 h Exposition, mit S9-Mix (45 Studien)

	Negativkontrolle		Cyclophosphamid (5 oder 10 µg/mL)	
	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)
Minimum	1.0	3.3	13.0	16.0
Maximum	15.0	12.5	38.0	36.5
Mittelwert	6.4	6.4	23.2	23.2
Standardabweichung	2.6	2.0	5.7	5.2
Untere 95% Kontrollgrenzen		2.4		12.7
Obere 95 Kontrollgrenzen		10.4		33.6

Tabelle 11 Historische Kontrolldaten des durchführenden Labors von Oktober 2016 bis Oktober 2018. 20 h Exposition, ohne S9-Mix (42 Studien)

	Negativkontrolle		Mitomycin C (0.05 oder 0.1 µg/mL)		Colchicin (0.01, 0.015 oder 0.002 µg/mL)	
	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)
Minimum	0.0	4.3	15.0	16.0	13.0	14.0
Maximum	14.0	11.5	41.0	37.0	25.0	23.0
Mittelwert	7.1	7.1	26.7	26.7	17.1	17.1
Standardabweichung	2.4	1.7	6.7	6.1	2.4	2.1
Untere 95% Kontrollgrenzen		3.8		18.6		13.0
Obere 95 Kontrollgrenzen		10.5		38.8		21.3

Diskussion

Gemäss der Testrichtlinie (OECD, 2016b) wird eine Prüfsubstanz als klar positiv erachtet, falls bei einer der geprüften Versuchsbedingungen:

- mindestens eine der Testkonzentrationen verglichen mit der simultanen Negativkontrolle eine statistisch signifikant erhöhte Mikronukleus-Inzidenz aufweist
- die Erhöhung bei mindestens einer der Versuchsbedingungen konzentrationsabhängig ist, wenn sie mit einem geeigneten Trendtest daraufhin untersucht wird
- ein Ergebnis ausserhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegt (z.B. der 95%-Kontrollgrenzen)

Werden alle diese drei Kriterien erfüllt, wird die Prüfsubstanz als aneugen/klastogen im untersuchten Testsystem betrachtet. Demgegenüber gilt eine Prüfsubstanz als klar negativ, wenn in allen untersuchten Versuchsbedingungen:

- die Mikronukleus-Inzidenz keiner der geprüften Testkonzentrationen statistisch signifikant gegenüber der simultanen Negativkontrolle erhöht ist
- keine konzentrationsabhängige Erhöhung der Mikronukleus-Inzidenz vorliegt, werden die Inzidenzen mit einem geeigneten Trendtest daraufhin untersucht
- alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z.B. der 95%-Kontrollgrenzen)

Eine Prüfsubstanz wird als nicht-aneugen/klastogen im untersuchten Testsystem betrachtet, wenn alle Bedingungen für ein negatives Resultat erfüllt werden.

Bei einer Expositionsdauer von 3 h mit S9-Mix und einer Expositionsdauer von 20 h ohne S9-Mix wurden keine gegenüber den simultanen Negativkontrollen statistisch signifikant erhöhten und keine konzentrationsabhängig erhöhten Mikronukleus-Inzidenzen festgestellt. Alle Mikronukleus-Inzidenzen lagen zudem innerhalb der 95%-Kontrollgrenzen der historischen Negativkontrollen des durchführenden Labors.

Bei einer Expositionsdauer von 3 h ohne S9-Mix wurde bei der höchsten getesteten R417888-Konzentration, 2000 µg/mL, eine gegenüber der simultanen Negativkontrolle statistisch signifikant erhöhte Mikronukleus-Inzidenz festgestellt. Diese lag auch ausserhalb der oberen 95%-Kontrollgrenze

der historischen Negativkontrollen des durchführenden Labors. Konzentrationsabhängige Erhöhungen der Mikronukleus-Inzidenzen wurden keine festgestellt.

Damit ist R417888 gemäss oben genannter Kriterien weder klar positiv noch klar negativ. Die Bestimmungen der Testrichtlinie sehen in einem solchen Fall vor, dass weitere Untersuchungen durchgeführt werden können, etwa zusätzliche Zellen evaluiert oder ein Wiederholexperiment mit veränderten Versuchsbedingungen durchgeführt wird.

Im vorliegenden Fall wurde das Experiment mit einer Expositionsdauer von 3 h ohne metabolischer Aktivierung mit S9-Mix wiederholt, wobei gegenüber dem ursprünglichen Experiment eine zusätzliche R417888-Konzentration untersucht wurde. Hierbei wurden keine gegenüber der simultanen Negativkontrolle statistisch signifikant erhöhten Mikronukleus-Inzidenzen festgestellt. Alle Mikronukleus-Inzidenzen des Wiederholperiments lagen innerhalb der 95%-Kontrollgrenze der historischen Negativkontrollen des durchführenden Labors. Konzentrationsabhängige Erhöhungen der Mikronukleus-Inzidenzen wurden keine festgestellt.

Schlussfolgerung des Studienautors / der Studienautorin

Da das nicht eindeutig positive Resultat nach 3 h Behandlung ohne S9-Mix des ursprünglichen Experiments in einem Wiederholexperiment mit veränderten Prüfkonzentrationen nicht reproduziert wurde – das Wiederholexperiment erbrachte ein eindeutig negatives Ergebnis – erachtet der Studienautor das Ergebnis nach 3 h Behandlung ohne S9-Mix insgesamt als negativ.

Folglich schloss der Studienautor, dass sich unter den experimentellen Bedingungen keine Hinweise ergeben hätten, dass R417888 in kultivierten humanen Lymphozyten eine erhöhte Bildung von Mikronuklei induziert hätte. Infolgedessen schliesst der Studienautor, dass R417888 in diesem *in vitro* Mikronukleustest negativ war (nicht klastogen und nicht aneugen).

Schlussfolgerung BLV

Einzig bei einer Expositionsdauer von 3 h und ohne metabolische Aktivierung mit S9-Mix ergaben sich Hinweise, dass die Behandlung mit R417888 zu einer erhöhten Inzidenz an Mikronuklei in den exponierten Lymphozyten führen könnte. Das Ergebnis war nicht eindeutig positiv. Zur Klärung des Befundes, wurde deshalb das Experiment mit dreistündiger Exposition ohne metabolische Aktivierung mit S9-Mix wiederholt. Dabei wurde eine zusätzliche Konzentration, 1500 µg/ml, getestet. Im Wiederholexperiment resultierte ein klar negatives Ergebnis.

Beim nicht eindeutig positiven bzw. negativen Experiment betrug die statistisch signifikant erhöhte Mikronukleus(MN)-Inzidenz 10/1000 Zellen (Tabelle 5). Die obere Grenze des 95%-Kontrollbereichs der historischen Negativkontrollen beträgt 9.9/1000 Zellen (Tabelle 9). Das Ergebnis der mit 2000 µg/ml behandelten Zellen liegt also nur knapp ausserhalb der 95%-Kontrollgrenzen. Eine konzentrationsabhängige Zunahme der MN-Inzidenz wurde keine beobachtet.

Da das erste Experiment mit einer Expositionsdauer von 3h ohne S9-Mix nicht eindeutig positiv war, d.h. keine konzentrationsabhängige Zunahme beobachtet wurde, die erhöhte MN-Inzidenz nur marginal ausserhalb der historischen Negativkontrollen lag und das Wiederholexperiment ein eindeutig negatives Ergebnis erbrachte, erachten wir das Ergebnis des vorliegenden *in vitro* Mikronukleus-Tests als negativ. Unter den experimentellen Bedingungen hatte R417888 in kultivierten humanen Lymphozyten kein klastogenes und kein aneugenes Potential.

2.1.4 R417888 (M12): Beurteilung Relevanz

R417888 wurde bei der (teil-)gezielten Überprüfung der Produkte mit dem Wirkstoff Chlorothalonil als relevant beurteilt, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass R417888 gentoxisch ist. R417888 erbrachte positive Ergebnisse in *in vitro* Säugerzell-Mutationstest, die nicht *in vivo* nachuntersucht wurden. Zudem bestand eine Datenlücke bezüglich Aneugenität, diese wurde bei R417888 nicht untersucht.

Mit dem vorgelegten *in vivo* Comet-Assay werden die positiven Ergebnisse in *in vitro* Säugerzellmutationstests adressiert. Zwar können mit dem Comet-Assay keine *cross-linking agents* detektiert werden, solche können aber in den Stämmen *E.coli* WP2/*E.coli* WP2 (pKM101) und *S. typhimurium* TA102 in Ames-Tests erkannt werden. R417888 war in mehreren Ames-Tests mit dem Stamm *E.coli* WP2 negativ (RAR, 2017). Es kann daher geschlossen werden, dass R417888 *in vivo* wahrscheinlich nicht mutagen ist.

Die bisher fehlenden Untersuchungen zum aneugenem Potential von R417888 werden mit dem jetzt eingereichten *in vitro* Mikronukelus-Test in Humanlymphozyten adressiert. Dieser erbrachte ein negatives Ergebnis. Interessant wäre aber zu klären, warum die positiven Ergebnisse in Chromosomenaberrationstests nach OECD Testrichtlinie 473 (OECD, 2016c), die allesamt bei der Exposition ohne S9-Mix beobachtet wurden, in diesem Mikronukelus-Test nicht reproduziert werden konnten. Während mit dem Test nach OECD Testrichtlinie 473 nur klastogene Wirkungen detektiert werden können, können mit dem Mikronukelus-Test nach OECD Testrichtlinie 487 sowohl klastogene als auch aneugene Wirkungen detektiert werden. Es kann aber festgehalten werden, dass sich R417888 *in vivo* nicht klastogen war (BLV, 2019).

Die im Rahmen des rechtlichen Gehörs nachgereichten Studien, die hier diskutierten *in vivo* Comet- und *in vitro* Mikronukelus-Tests, erlauben unter Berücksichtigung der bereits bewerteten Studien (BLV, 2019) den Schluss, dass R417888 wahrscheinlich kein gentoxisches Potential hat. Damit und unter Berücksichtigung des bereits diskutierten karzinogenen Potentials (BLV, 2019) ist R417888 ein toxikologisch nicht relevanter Grundwassermetabolit².

2.2 R182281 (SDS-3701): Nachgereichte Daten

Mit dem Metaboliten R182281 wurden im Rahmen des rechtlichen Gehörs die folgenden Studien eingereicht:

- R182281 – CrI:CD(SD) Rat *In Vivo* Comet Test. Report Number: GG30DP. [REDACTED], 2019.
- R182281 - Validation of a Bioanalytical Method for the Determination of R182281 in Rat Plasma (K2EDTA) using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection (LC-MS/MS). Report Number: LX12NW. Shah, Niksha, 2019

Diese Studien werden nachfolgend beurteilt.

2.2.1 Auswertung In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay

Studientitel	R182281 – CrI:CD(SD) Rat <i>In Vivo</i> Comet Test
Referenz	[REDACTED], 2019
Durchführung	11. März 2019 – 14. August 2019
Testlabor	Covance CRS Limited, Woolley Road, Alconbury, Huntingdon, Cambridgeshire, PE28 4HS, United Kingdom
Berichtsnummer	NR52CX
Dokumentnummer	R182281_10078
Leitlinie(n)	OECD Guideline For The Testing Of Chemicals (2016): <i>In Vivo</i> Mammalian Alkaline Comet Assay, Test Guideline 489
Abweichungen von der Leitlinie	Es werden im Studienbericht keine mit der Positivkontrollsubstanz erzeugte Dosis-Wirkungs-Kurven im Duodenum ausgewiesen. Es wird davon ausgegangen, dass dies die Gültigkeit der Ergebnisse des Tests nicht in Frage stellt.

² Die dänischen Behörden (the Danish Environmental Protection Agency) haben nach der Auswertung weiterer Studien den Metaboliten R417888 ebenfalls als nicht relevant eingestuft (<https://mst.dk/service/nyheder/nyhedsarkiv/2019/sep/pesticidrest-skader-ikke-arveanlaeggene/>).

GLP	Ja
Testmaterial	R182281, Batchnummer P2, Reinheitsgrad 98.7 % (w/w)

In einem *in vivo* Comet-Assay wurde das Potential von R182281 untersucht, in der DNA von Leber- und Duodenalzellen von CrI:CD(SD) Ratten Strangbrüche zu induzieren. Die folgende Abweichung von der Testleitlinie wurde festgestellt:

Nebst der Leber wurde das Duodenum untersucht. In der Testrichtlinie wird bestimmt, dass für andere Gewebe als der Leber, mit der Positivkontrollsubstanz in diesen Geweben erzeugte Dosis-Wirkungs-Kurven im Testbericht ausgewiesen werden müssen (OECD, 2016a). Solche Dosis-Wirkungs-Kurven für das Duodenum fehlen im Testbericht. Diese Abweichung stellt die Gültigkeit der Testergebnisse nicht grundsätzlich in Frage. Mit der simultanen Positivkontrolle Ethylmethansulfonat (EMS) wurde im durchgeführten Test im Duodenum bei einer Dosis von 200 mg/kg KG verglichen mit der Negativkontrolle nämlich eine statistisch signifikante Erhöhung von DNA-Strangbrüchen beobachtet. Zudem umfassen die historischen Positivkontrollen welche das Duodenum betreffen und im Zeitraum zwischen März 2017 und März 2019 erzeugt wurden, 14 Studien. Dabei betrug das Minimum des Masses für Strangbrüche im Median 26 % TI, während in den entsprechenden historischen Negativkontrollen maximal 3 % TI gemessen wurden. Damit kann die Kompetenz des durchführenden Labors, Substanzen welche DNA-Strangbrüche im Duodenum verursachen als solche zu identifizieren, als hinreichend belegt betrachtet werden.

Material und Methoden

Die Stabilität von R182281 in 0.5% Carboxymethylcellulose, dem Vehikel bei der Dosierung der Ratten mittels Schlundsonde, wurde mit einer validierten Methode überprüft und bestätigt.

Es wurden pro Behandlungsgruppe 6 männliche CrI:CD(SD) Ratten mittels Schlundsonde im Abstand von rund 24 h zwei Dosen mit einem Volumen von 10 ml/kg und einer Dosis von entweder 31.25, 62.5 oder 125 mg/kg KG R182281 in 0.5% Carboxymethylcellulose verabreicht. Als Negativkontrolle wurde 6 weiteren männlichen CrI:CD(SD) Ratten jeweils 20 ml/kg 0.5% Carboxymethylcellulose verabreicht. Den drei Tieren der Positivkontrollgruppe wurde einmalig ein Volumen von 10 ml/kg und einer Dosis von 200 mg/kg KG Ethylmethansulfonat (EMS) verabreicht. Einzelzell-Suspensionen aus der Leber und dem Duodenum der Test- und Negativkontrollgruppen wurden ungefähr 4 h nach der zweiten Dosis und 3 h nach der Einzeldosis der Positivkontrolle gewonnen. Die DNA dieser Zellen wurde danach mittels Einzelzell-Gelelektrophorese auf Strangbrüche untersucht.

Die höchste in diesem Comet-Assay verabreichte Dosis, 125 mg/kg KG, wurde vorab aus einem Vorversuch abgeleitet. Im Vorversuch wurden je zwei männliche und weibliche CrI:CD(SD) Ratten im Abstand von ungefähr 24 h zwei Dosen von 125 oder 250 mg/kg KG/Tag mg/kg KG R182281 verabreicht. Zusätzlich wurden drei männlichen Tieren 0.5, 1, 2, 4, 8 und 24 h nach der zweiten Dosisgabe von 125 mg/kg KG/Tag Blut entnommen und R182281 im Plasma gemessen. Die durchschnittlichen Plasmakonzentrationen waren zwischen 0.5 h und 8 h vergleichbar (243.0 mg/L (0.5 h), 274.3 mg/L (1 h), 258.7 mg/L (2 h), 290.0 mg/L (4 h), 293.3 mg/L (8 h) und 199.7 mg/L (24 h). Deshalb wurden im Comet-Assay die Einzelzell-Suspensionen der Zielgewebe Leber und Duodenum 4 h nach der zweiten Dosierung, der angenäherten Steady-State Konzentration (Plasma) von R182281, hergestellt. Die Bestimmung von R182281 im Rattenplasma erfolgte anhand einer validierten Methode (vgl. Abschnitt 2.2.2).

Resultate

In den Leber wurde mittels linearer Kontraste im Williams-Test kein statistisch signifikanter Trend für die Zunahme des TI¹⁾ beobachtet. Im Williams -Test wurde aber im paarweisen Vergleich gegenüber der Negativkontrolle bei einer Dosis von 125 mg/kg KG/Tag eine statistisch signifikante Erhöhung der Gruppenmittelwerte des Median der %TI beobachtet (Tabelle 12).

Im Duodenum wurde gemäss Williams-Test über alle getesteten Dosen kein Trend für die Zunahme des TI identifiziert. Weiter wurde im paarweisen Vergleich zwischen der höchsten Dosis und der ver-

suchsinternen Negativkontrolle im Williams-Test keine statistisch signifikante Erhöhung der Gruppenmittelwerte des Median der %TI identifiziert (Tabelle 14).

Die TI-Werte inklusive Negativkontrolle der Leber- als auch der Duodenumzellen aller Dosisstufen lagen innerhalb der 95%-Kontrollgrenzen der entsprechenden laborinternen historischen Negativkontrolldaten des durchführenden Labors (Tabelle 13 und Tabelle 15). Die Positivkontrollsubstanz EMS induzierte gemäss t-Test im Mittel statistisch signifikant mehr Strangbrüche als die Negativkontrolle und lag innerhalb der 95%-Kontrollgrenzen der laborinternen historischen Positivkontrolle.

Tabelle 12: Resultate und statistische Angaben zur %TI in der Leber

Behandlung	Dosis (mg/kg/Tag)	Anzahl Zellen beurteilt	Gruppenmittelwert des Medians der <i>tail</i> Intensität % (SD) #
Vehikel	-	900	0.26 (0.2)
R182281	31.25	900	0.22 (0.1)
R182281	62.5	900	0.28 (0.2)
R182281	125	900	0.48* (0.2)
EMS	200	450	25.73***+ (0.9)

Negativkontrolle: 0.5% Carboxymethylcellulose

EMS: Ethylmethansulfonat, Positivkontrolle einmalig ungefähr 3 Stunden vor dem Studienende verabreicht

SD: Standardabweichung

Fehler von $\pm 1\%$ können aufgrund vom Runden der Werte im Rahmen der tabellarischen Präsentation der Resultate auftreten.

Ausschliesslich die mediane Fluoreszenz-Intensität des «Kometenschweifs» wurde statistisch bewertet (einseitige Tests)

p Werte Ergebnisse der Vergleiche mit der Kontrolle mittels Williams Test, ausser falls mit (+) bezeichnet mit dem dem t-test (+).

*** $p < 0.001$ (signifikant)

* $p < 0.05$ (signifikant)

Tabelle 13: Historische laborinterne Comet Kontrolldaten der Leber (Wistar Han und Sprague-Dawley Ratten) - Median % *tail* Intensität - März-17 – Mar-19

	Kontrollwerte (Vehikel)		Positivkontrollwerte	
	106 Tiere	19 Studien	58 Tiere	18 Studien
Minimum	0.0	0.1	16.8	18.2
Maximum	1.7	0.9	60.2	54.9
Mittelwert	0.4	0.4	34.2	33.4
Standardabweichung	0.3	0.2	11.3	11.0
Untere 95% Kontrollgrenze	0.0	0.0	11.5	11.4
Obere 95% Kontrollgrenze	1.1	0.9	56.8	55.3

Tabelle 14: Resultate und statistische Angaben zur %TI Intensität im Dünndarm

Behandlung	Dosis (mg/kg/Tag)	Anzahl Zellen beurteilt	Gruppenmittelwert des Medians der <i>tail</i> Intensität % (SD) #
Vehikel	-	900	1.98 (0.6)
R182281	31.25	900	1.71 (0.5)
R182281	62.5	900	1.80 (0.2)
R182281	125	900	1.50 (0.8)
EMS	200	450	34.97***L+ (7.0)

Negativkontrolle: 0.5% Carboxymethylcellulose

EMS: Ethylmethanesulfonat, Positivkontrolle einmalig ungefähr 3 Stunden vor dem Studienende appliziert

SD: Standardabweichung

Fehler von $\pm 1\%$ können aufgrund vom Runden der Werte im Rahmen der tabellarischen Präsentation der Resultate auftreten.

Ausschliesslich die mediane Fluoreszenz-Intensität des «Kometenschweifs» wurde statistisch bewertet (einseitige Tests)

p Werte Ergebnisse der Vergleiche mit der Kontrolle mittels Williams Test, ausser falls mit (+) bezeichnet mit dem dem t-test (+).

*** p < 0.001 (signifikant)

* p < 0.05 (signifikant)

L Analyse nach logarithmischer Transformation der Daten vorgenommen

Tabelle 15: Historische laborinterne Comet Kontrolldaten des Duodenums (Wistar Han und Sprague-Dawley Ratten)- Median % Tail Intensität- März-17 – Mar-19

	Kontrollwerte (Vehikel)		Positivkontrollwerte	
	78 Tiere	14 Studien	42 Tiere	14 Studien
Minimum	0.1	0.3	23.2	26.0
Maximum	4.1	3.0	55.1	50.5
Mittelwert	1.4	1.3	38.3	38.3
Standardabweichung	1.0	0.8	9.7	9.1
Untere 95% Kontrollgrenze	0.0	0.0	18.9	20.1
Obere 95% Kontrollgrenze	3.4	3.0	57.7	56.5

Die Anzahl sogenannter *hedgehog* Zellen in der Leber behandelte Tiere war gegenüber der Kontrolle erhöht. Durchschnittlich wurden 0.8, 1.3 und 2.5 *hedgehog* Zellen in den Behandlungsgruppen mit 31.25, 62.5 und 125 mg/kg KG gefunden (Tabelle 16). In der Positivkontrolle und der Negativkontrolle wurden keine *hedgehog* Zellen identifiziert. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde statistisch nicht untersucht. Der Studienautor spricht von einer dosisabhängigen Zunahme. Die numerische Zunahme sei gemäss Studienautor wahrscheinlich auf mechanische/enzyminduzierte Schädigungen während der Probenaufbereitung zurückzuführen oder beruhe auf extremen genotoxische Effekten.

Auch im Duodenum wurden *hedgehog* Zellen beobachtet. In der Negativkontrolle, den mit 31.25, 62.5 und 125 mg/kg R182281 behandelten Gruppen betrug die durchschnittliche Anzahl an *hedgehog* Zellen 1.7, 4.2, 10.3 und 12.7. In der Positivkontrolle wurden durchschnittlich 0.7 *hedgehog* Zellen identifiziert. Der Studienautor spricht von einer dosisabhängigen Zunahme. Im Duodenum wurden auch in der Negativkontrolle *hedgehog* Zellen identifiziert, was vom Studienautor als mögliche Zellbeschädigung während der Probenaufbereitung gewertet wird.

Weiterführende Untersuchungen im Lebergewebe, um die dosisabhängige Zunahme der *hedgehog* Zellen zusammen mit der Zunahme des TI Wertes bei der höchsten Dosis innerhalb der 95%-Kontrollgrenze besser einordnen zu können, wurden aber auf Grund der negativen Bewertung des Studienautors keine durchgeführt.

Tabelle 16: Resultate und statistische Angaben zu den *hedgehog* Zellen in der Leber und dem Duodenum

Behandlung (mg/kg/day)	Tiernummer	Duodenum		Liver	
		Anzahl Hedgehog Zellen	Gruppenmittel Anzahl Hedgehog Zellen (SD)	Anzahl Hedgehog Zellen	Gruppenmittel Anzahl Hedgehog Zellen (SD)
Vehikel (-)	101	2	1.7 (0.5)	0	0.0 (0.0)
	102	1		0	
	103	2		0	
	104	1		0	
	105	2		0	
	106	2		0	
R182281 (31.25)	201	3	4.2 (3.3)	0	0.8 (0.8)
	202	2		1	
	203	6		1	
	204	2		0	
	205	10		2	
	206	2		1	
R182281 (62.5)	301	5	10.3 (6.3)	0	1.3 (1.8)
	302	3		0	
	303	8		1	
	304	11		3	
	305	19		4	
	306	16		0	
R182281 (125)	401	7	12.7 (4.6)	2	2.5 (1.0)
	402	8		4	
	403	19		2	
	404	16		3	
	405	13		3	
	406	13		1	
EMS (200)	501	0	0.7 (1.2)	0	0.0 (0.0)
	502	2		0	
	503	0		0	

Negativkontrolle 0.5% Carboxymethylcellulose

EMS Ethylmethanesulfonat, Positivkontrolle, Einmalige Gabe ungefähr 3 Stunden vor der Terminierung.

Diskussion

Gemäss der Testrichtlinie (OECD, 2016a) wird eine Prüfsubstanz als klar positiv erachtet, falls bei einer der geprüften Versuchsbedingungen:

- mindestens eine der Testkonzentrationen verglichen mit der simultanen Negativkontrolle eine statistisch signifikante Erhöhung aufweist,
- die Erhöhung dosisabhängig ist, wenn sie mit einem geeigneten Trendtest daraufhin untersucht wird,
- ein Ergebnis für die gegebene Spezies, Negativkontrolle, Administrationsroute und Anzahl an Dosisgaben ausserhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegt.

Werden alle diese drei Kriterien erfüllt, weist die Prüfsubstanz die Fähigkeit auf DNA-Strangbrüche im untersuchten Gewebe und Testsystem induzieren zu können. Demgegenüber gilt eine Prüfsubstanz als klar negativ, wenn in allen untersuchten Versuchsbedingungen:

- a. keine der Testkonzentrationen eine statistisch signifikante Erhöhung verglichen mit der Negativkontrolle aufweist,
- b. mit einem geeigneten Trendtest keine konzentrationsabhängige Zunahme festgestellt wird,
- c. alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der zugehörigen historischen Negativkontrolldaten für eine gegebene Spezies, Vehikel, Administrationsroute, Gewebe und Anzahl Dosisgaben liegen,
- d. direkte oder indirekte Exposition oder Toxizität des Zielgewebes nachgewiesen werden kann.

Nach Verabreichung von R182281 per Gavage wurde R182281 im Plasma nachgewiesen und erbringt daher einen indirekten Expositionsnachweis.

R182281 zeigte bei der höchsten Dosis eine signifikante Erhöhung von DNA-Strangbrüchen. Allerdings innerhalb der 95% Kontrollgrenzen der historischen Negativkontrolle. Zusammen mit der beobachteten Zunahme an *hedghog* Zellen in der Leber kann die hier durchgeführte Studie ohne weitere histopathologischen Untersuchungen weder als klar positiv noch als negativ gewertet werden.

Schlussfolgerung Studienautors / der Studienautorin

R182281 zeigte keine Hinweise auf eine Auslösung einer erhöhten Inzidenz an DNA-Strangbrüchen in der Leber oder dem Dünndarm bei der Behandlung männlicher CrI:CD(SD) Ratten mittels Schlundsonde und weist daher im *in vivo* Comet-Assay ein negatives Resultat auf.

Schlussfolgerung BLV

Die Stabilität von R182281 in 0.5% Carboxymethylcellulose wurde mit einer validierten Methode bestimmt. Nach Einschätzung des Fachbereichs Laboratorien des BLV - es scheint keine Validierungs-Richtlinien zu geben - sind die Parameter für die Validierung insgesamt adäquat gewählt und auch die Resultate sehen plausibel aus. Insbesondere werden im Rahmen der Validierung die höher konzentrierten Lösungen zur Analyse in den Arbeitsbereich verdünnt, so dass mit der Validierung effektiv ein Arbeitsbereich von 1-100 mg/mL Probe abgedeckt wird. Jedoch wäre es sinnvoll, den vorgesehenen Arbeitsbereich (z.B. entsprechend dem validierten Bereich) anzugeben, um riesige Verdünnungsfaktoren klar auszuschliessen.

Im Rahmen der Methodvalidierung für die Formulierungsanalyse betreffend des durchgeführten Comet-Assays mit R182281 wird die Stabilität des Standards sowie der «extracted solution» nach 8 Tagen nicht überprüft, obwohl in beiden Fällen Stabilitätsuntersuchungen nach 8 Tagen durchgeführt werden. Wenn die Standard- und Extrakt-Stabilitäten von R182281 derart gering sind, dass diese jeweils neu hergestellt werden müssen, dann wäre dies unbedingt im Studienbericht zu erwähnen.

Zur Bestimmung von R182281 im Plasma anhand der validierten Methode im Bioanalysis Contributing Report zu R182281 –CrI:CD(SD) Rat In Vivo Comet Test (vgl. 2.2.2) gilt es zu bemerken, dass die Versuchs-Lösungen nach der Aufarbeitung gemäss validierter Methode weit oberhalb des Messbereichs lagen und in 2 Stufen 600-fach mit blank Matrix-Extrakt verdünnt wurden. Dieses Vorgehen ist gemäss den validierten Methoden grundsätzlich vorgesehen, war jedoch nicht Bestandteil der Validierung (d.h. es wurden im Rahmen der Validierungen keinerlei Verdünnungsversuche durchgeführt). Eine derartige Verdünnung (Faktor 600) bringt diverse Unsicherheiten mit sich (z. B. stellt sich die Frage, ob sich überhaupt noch die ganze Menge Analyt im hochkonzentrierten Extrakt löst (z.B. wäre eine Phasentrennung denkbar)). Eine Berechnung detaillierter quantitativer Daten ist daher nach Ansicht des FB Laboratorien als unsicher zu beurteilen.

Eine genaue Einschätzung des Zeitpunktes für eine optimale Probeentnahme ist daher mit grossen Unsicherheiten verbunden. Da der gewählte Zeitpunkt der Probeentnahme in diesem Versuch aber den generellen Empfehlungen der OECD Leitlinie folgt, sollten diese Unsicherheiten keinen Einfluss auf die Testresultate aufweisen.

Die in der Studie getesteten Höchstdosis wurde vom Studienautor als *maximum tolerated dose* (MTD) identifiziert obwohl in der Vorstudie bei den männlichen Ratten bei 125 mg/kg KG/Tag einzig eine leichte Reduktion des Körpergewichts von 1.4-4.3% beobachtet wurde. In der Vorstudie zeigte einzig eine der weiblichen Ratten klinische Symptome. Allerdings wurde in der Vorstudie mit einer Dosis von 250 mg/kg KG/Tag in beiden Geschlechtern die MTD klar überschritten. Weiter zeigten andere Studien mit wiederholter Gabe von R182281 (RAR, 2017) in männlichen Ratten mit einer Dosis um ~125 mg/kg KG/Tag klinische und klinisch-chemische Effekte.

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass die Entstehung von *hedgehog* Zellen ein Indikator sowohl für Zytotoxizität als auch für Genotoxizität sein können (e.g. Lorenzo, Y. et al.). Sind *hedgehogs* auf Genotoxizität zurückzuführen, entsprechen sie einer Stufe in einem Kontinuum von genotoxischen Schäden. In einem solchen Fall ist nebst einer Zunahme von *hedgehogs* auch immer eine Zunahme der %TI zu erwarten. Im Comet-Assay mit R182281 wurde im Duodenum keine Zunahme der %TI beobachtet und deshalb erachten wir die Zunahme von *hedgehog* Zellen im Duodenum nicht als Indikator für Genotoxizität sondern als Hinweis auf andere, letztlich ungeklärte Effekte.

In der Leber ist das Testergebnis weniger eindeutig. Unter den Bedingungen des Tests, hat die höchste getestete Dosis von R182281 im Vergleich zur Negativkontrolle in der Leber von männlichen Crl:CD(SD) Ratten zu einer statistisch signifikanten Erhöhung von DNA-Strangbrüchen geführt. Weiterführende Untersuchungen wären für die Einordnung der beobachteten Zunahme an *hedgehog* Zellen in der Leber sehr hilfreich gewesen. Die Erhöhung von DNA-Strangbrüchen in der Leber lag innerhalb der 95%-Konfidenzgrenze der entsprechenden historischen Negativkontrolldaten und war nahe bei deren Mittelwert. Der unklare Befund sollte weiter untersucht werden. Daten zur Zytotoxizität sowie histopathologische Untersuchungen werden für eine definitive Beurteilung benötigt. Aufgrund fehlender Untersuchungen zu Klärung des zweideutigen Resultats in dem hier beurteilten *in vivo* Comet-Assay kann für R182281 in der Leber ein mögliches genotoxisches Potential nicht ausgeschlossen werden.

2.2.2 Auswertung Validation Of Bioanalytical Method: Rat Plasma

Studientitel	R182281 - Validation of a Bioanalytical Method for the Determination of R182281 in Rat Plasma (K2EDTA) using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection (LC-MS/MS)
Referenz	Shah, N., 2019
Durchführung	04. April – 11. Mai 2019
Testlabor	Covance CRS Limited Woolley Road, Alconbury, Huntingdon Cambridgeshire, PE28 4HS, United Kingdom
Berichtnummer	WN22JV
Leitlinie(n)	SANCO/3029/99 Rev 4 (11/07/2000) for pre-registration data requirements and SANCO 825/00 Rev 8.1 (16/11/2010) for post-registration monitoring.
Abweichungen von der Leitlinie	Keine
GLP	Ja.
Testmaterial	R182281 Batchnummer P2, 98.7 % Reinheitsgrad

Die Validierungsstudie zum Nachweis von R182281 in Rattenplasma wurde vom Fachbereich Laboratorien (FB LAB) des BLV bewertet. Die LC-MS/MS Methoden gemäss den Unterlagen werden vom FB LAB als geeignet erachtet, um R182281 in Rattenplasma im Konzentrationsbereich von 0.05 bis 1.5 mg/L zu quantifizieren. Betreffend Wiederfindungsrate wurde am Tag 0 bei der quantitativen Ionentransition ein Mittel von 109% identifiziert und bei der bestätigenden Ionentransformation ein Mittel von 108%. Die mittlere Wiederfindungsrate sollte im Idealfall zwischen 80-100% liegen. Da die Wiederfindungsrate noch innerhalb von 70-110% liegt, sind die Validierungsanforderungen gemäss SAN-

CO/825/00 rev. 8.1 (16.11.2010) und SANCO/3029/99 rev.4 (11.07.2000) erfüllt, wenn auch nicht ideal.

2.2.3 R182281 (SDS-3701): Beurteilung Gentoxizität

Ein gentoxisches Potential konnte anhand der neu eingereichten *in vivo* Studie in der Leber nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Weiter ist R182281 akut oral toxisch Kategorie 3 und weist ein anderes toxisches Profil als die Muttersubstanz auf. Grundsätzlich sind Metaboliten, welche als toxisch einzustufen sind, gemäss Leitfaden Sanco/221/2000 –rev.10-final als relevant anzusehen. In der Langzeitstudie mit R182281 wurden bei Ratten keine behandlungsbedingten Tumore beobachtet und somit kein kanzerogenes Potential festgestellt.

2.3 SYN548764 (SYN548581M11): Nachgereichte Daten

Mit dem Metaboliten SYN548764 wurden im Rahmen des rechtlichen Gehörs die folgenden Studien eingereicht:

- SYN548764- Salmonella Typhimurium and Escherichia Coli, Reverse Mutation Assay: SYN548764_10015. Sokolowski, A., 2019
- SYN548764- Human Lymphocytes, *In Vitro* Micronucleus Test, SYN548764_10017. Gilby, B., 2019
- SYN548764- V79 Cells , Gene Mutation Assay in Chinese Hamster V79 Cells *in vitro* (V79/HPRT), SYN548764_10019, Sokolowski, A. , 2019

Diese Studien werden nachfolgend beurteilt.

2.3.1 Auswertung S. typhimurium and E. coli Reverse Mutation Assay

Studientitel	SYN548764 – Salmonella Typhimurium and Escherichia Coli Reverse Mutation Assay Final Report
Referenz	Sokolowski, A., 2019
Durchführung	22. Januar 2019 – 18. Januar 2019
Testlabor	Envigo CRS GmbH, in den Leppsteinswiesen 19, 64380 Rossdorf, Deutschland
Berichtnummer	1941400
Dokumentnummer	SYN548764_10015
Leitlinie(n)	OECD Guideline For The Testing Of Chemicals (1997): Bacterial Reverse Mutation Test, Test Guideline 471
Abweichungen von der Leitlinie	Keine
GLP	Ja
Testmaterial	SYN548764, Batchnummer MES 377/3, Reinheitsgrad 99 % (w/w)

In einem Ames-Test wurde das Potential von SYN548764 untersucht, Genmutationen (Basenaustausch, Rasterverschiebungen Punktmutationen etc.) in den *Salmonella typhimurium* (*S. Typhimurium*) Stämmen TA 1535, TA 1537, TA 98 und TA 100 sowie in den *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämmen WP2 *uvrA* (pKM101) und WP2 (pKM101) zu induzieren.

Material und Methoden

In der Studie wurde die Präinkubationsmethode verwendet, wobei die Testsubstanz mit den Bakterienstämmen bei 37° für 60 min. vorinkubiert wurden, bevor diese mit dem Agar vermischt wurden. Die Testsubstanz wurde in entionisiertem Wasser gelöst. Als versuchsinterne Negativkontrolle wird zum einen die Lösungsmittelkontrolle (entionisiertes Wasser) und zum anderen die unbehandelte Kontrolle herangezogen. Als Positivkontrolle wurde in den Versuchen ohne metabolische Aktivierung

für die Stämme TA 1535 und TA 100 Natriumazid (NaN₃), für die Stämme TA 1537 und TA 98 4-nitro-o-phenylenediamin (4-NOPD), sowie für die Stämme WP2 *uvrA* und WP2 Methylmethansulfonat (MMS) verwendet. Mit metabolischer Aktivierung wurde für alle geprüften Stämme als Positivkontrolle 2-Aminoanthracen (2-AA) benutzt.

Im Vorexperiment wurden die Bakterienstämme pro Platte mit 3, 10, 33, 100, 333, 1000, 2500 und 5000 µg der Testsubstanz SYN548764 exponiert. Das Vorexperiment wurde schliesslich als Experiment I verwendet. Im Experiment II wurden die Bakterienstämme pro Platte mit 33, 100, 333, 1000, 2500 und 5000 µg der gleichen Testsubstanz exponiert.

Die Evaluation wurde anhand des Petri Viewer zusammen mit der Software Ames Study durchgeführt. Eine statistische Analyse wurde keine durchgeführt.

Resultate

Die OECD Richtlinie 471 macht keine konkrete Angabe zur Erhöhung der Anzahl Revertanten-Kolonien um von einer relevanten Erhöhung zu sprechen. Gemäss der Publikation von Levy, D., D., et al. (2019) ist aber eine 2-3-fache Erhöhung der Anzahl Revertanten-Kolonien auf den behandelten Platten gegenüber den unbehandelten Platten als relevante erhöhte Anzahl zu betrachten. Es wurde im Versuch in beiden Experimenten mit und ohne metabolische Aktivierung keine relevante Erhöhung der Anzahl Revertanten-Kolonien beobachtet verglichen zur Lösungsmittelkontrolle und unbehandelten Kontrolle (Verhältnis < 2) (Tabelle 17: Zusammenfassung der Resultate ohne metabolische Aktivierung Experiment I Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 19 und Tabelle 20).

Die versuchsinternen Negativkontrollen lagen alle innerhalb des 99%-Kontrollgrenzen der laborinternen Negativkontrollen, weshalb die Validität des Versuchs bestätigt werden konnte (Tabelle 21 und Tabelle 22).

Die versuchsinterne Positivkontrolle im Experiment I mit dem Stamm WP2 *uvrA* pKM101 lag unterhalb der durch das BLV errechneten unteren 99%- Kontrollgrenze der historischen Positivkontrolldaten (Mittelwert ± 3SD; unter Annahme einer angenäherten Normalverteilung). Verglichen zur Lösungsmittelkontrolle zeigte die versuchsinterne Positivkontrolle allerdings mit einer 2-3-fachen Erhöhung der Anzahl Revertanten ein positives Resultat und bestätigt das Funktionieren des Versuchs.

Eine mögliche Dosiswirkungsbeziehung wurde statistisch in der Studie nicht evaluiert. Die Resultate weisen allerdings nicht auf eine vorhandene Dosiswirkungsbeziehung hin.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Resultate ohne metabolische Aktivierung Experiment I

Metabolische Aktivierung	Testgruppe	Konzentration (pro Platte)	Anzahl revertante Kolonien (Mittelwert ±SD)					
			TA 1535	TA 1537	TA 98	TA 100	WP2 pKM101	WP2 <i>uvrA</i> pKM101
Ohne S9	Entionisiertes Wasser		11 ± 3	13 ± 2	25 ± 10	113 ± 11	279 ± 16	367 ± 9
			13 ± 2	12 ± 2	33 ± 10	118 ± 13	289 ± 31	353 ± 13
	SYN548764	3 µg	12 ± 4	13 ± 3	31 ± 9	107 ± 19	317 ± 25	378 ± 30
		10 µg	12 ± 5	12 ± 3	28 ± 1	121 ± 8	317 ± 20	373 ± 46
		33 µg	12 ± 2	10 ± 2	31 ± 5	126 ± 8	312 ± 19	403 ± 9
		100 µg	12 ± 1	14 ± 5	35 ± 7	119 ± 11	324 ± 21	370 ± 11
		333 µg	8 ± 2	13 ± 2	31 ± 5	107 ± 15	316 ± 19	344 ± 23
		1000 µg	10 ± 2	15 ± 3	31 ± 3	104 ± 7	318 ± 13	353 ± 27

Metabolische Aktivierung	Testgruppe	Konzentration (pro Platte)	Anzahl revertante Kolonien (Mittelwert ±SD)					
			TA 1535	TA 1537	TA 98	TA 100	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101
		2500 µg	8 ± 3	9 ± 3	29 ± 7	103 ± 25	325 ± 8	378 ± 23
		5000 µg	8 ± 3	9 ± 1	29 ± 7	109 ± 13	328 ± 6	387 ± 14
	NaN3	10 µg	948 ± 45			1515 ± 7		
	4-NOPD	10 µg	353 ± 23					
	4-NOPD	50 µg	70 ± 4					
	MMS	2.0 µL	3917 ± 182 3594 ± 106					

Tabelle 18: Zusammenfassung der Resultate mit metabolischer Aktivierung Experiment I

Metabolische Aktivierung	Testgruppe	Konzentration (pro Platte)	Anzahl revertante Kolonien (Mittelwert ±SD)					
			TA 1535	TA 1537	TA 98	TA 100	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101
Mit S9	Entionisiertes Wasser		17 ± 3 14 ± 3	14 ± 5 15 ±	42 ± 8 48 ± 10	136 ± 12 151 ± 13	315 ± 12 336 ± 10	402 ± 20 437 ± 16
	SYN548764	3 µg	13 ± 3	15 ± 3	47 ± 12	133 ± 12	326 ± 3	424 ± 52
		10 µg	16 ± 4	11 ± 4	39 ± 2	149 ± 16	333 ± 37	388 ± 23
		33 µg	17 ± 3	15 ± 1	40 ± 13	136 ± 7	337 ± 19	419 ± 14
		100 µg	14 ± 2	16 ± 4	37 ± 9	122 ± 7	330 ± 16	420 ± 8
		333 µg	14 ± 2	13 ± 4	42 ± 3	136 ± 6	327 ± 18	418 ± 9
		1000 µg	10 ± 4	17 ± 2	42 ± 4	137 ± 6	344 ± 24	418 ± 10
		2500 µg	8 ± 3	16 ± 2	43 ± 12	134 ± 10	336 ± 30	417 ± 49
		5000 µg	8 ± 3	13 ± 2	42 ± 6	136 ± 11	341 ± 13	406 ± 26
	2-AA	2.5 µg	275 ± 15 415 ± 31 3046 ± 370 3989 ± 210					
	2-AA	10.0 µg	933 ± 31 1270 ± 43					

Tabelle 19: Zusammenfassung der Resultate ohne metabolische Aktivierung Experiment II

Metabolische Aktivierung	Testgruppe	Konzentration (pro Platte)	Anzahl revertante Kolonien (Mittelwert ±SD)					
			TA 1535	TA 1537	TA 98	TA 100	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101
Ohne S9	Entionisiertes Wasser		13 ± 4 11 ± 3	13 ± 4 14 ± 2	38 ± 3 35 ± 2	125 ± 10 127 ± 5	277 ± 31 271 ± 21	297 ± 5 287 ± 13
		SYN548764	33 µg	13 ± 3	16 ± 4	27 ± 9	120 ± 10	300 ± 9
		100 µg	18 ± 6	17 ± 6	35 ± 8	140 ± 11	306 ± 8	283 ± 21
		333 µg	16 ± 6	18 ± 5	27 ± 4	131 ± 8	292 ± 22	262 ± 16

Metabolische Aktivierung	Testgruppe	Konzentration (pro Platte)	Anzahl revertante Kolonien (Mittelwert \pm SD)					
			TA 1535	TA 1537	TA 98	TA 100	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101
		1000 μ g	10 \pm 4	12 \pm 5	31 \pm 2	122 \pm 2	293 \pm 18	280 \pm 19
		2500 μ g	9 \pm 2	10 \pm 1	25 \pm 3	126 \pm 4	301 \pm 21	263 \pm 6
		5000 μ g	10 \pm 1	11 \pm 4	33 \pm 12	130 \pm 11	239 \pm 8	259 \pm 11
	NaN3	10 μ g	1104 \pm					
	4-NOPD	10 μ g	25			1726 \pm 123		
	4-NOPD	50 μ g	123					
	MMS	2.0 μ L	480 \pm 16					

Tabelle 20: Zusammenfassung der Resultate mit metabolische Aktivierung Experiment II

Metabolische Aktivierung	Testgruppe	Konzentration (pro Platte)	Anzahl revertante Kolonien (Mittelwert \pm SD)					
			TA 1535	TA 1537	TA 98	TA 100	WP2 pKM101	WP2 uvrA pKM101
Mit S9	Inaktiviertes Wasser		15 \pm 2	16 \pm 5	41 \pm 5	144 \pm 9	308 \pm 18	335 \pm 11
			13 \pm 3	12 \pm 3	42 \pm 1	136 \pm 17	320 \pm 17	365 \pm 20
	YN548764	33 μ g	15 \pm 5	11 \pm 4	48 \pm 10	133 \pm 20	313 \pm 4	366 \pm 32
		100 μ g	16 \pm 6	14 \pm 5	39 \pm 4	143 \pm 11	323 \pm 10	340 \pm 31
		333 μ g	14 \pm 5	15 \pm 6	35 \pm 2	136 \pm 6	304 \pm 18	334 \pm 41
		1000 μ g	14 \pm 3	14 \pm 2	48 \pm 6	144 \pm 9	330 \pm 18	372 \pm 14
		2500 μ g	14 \pm 3	10 \pm 1	39 \pm 2	153 \pm 9	302 \pm 24	350 \pm 37
		5000 μ g	16 \pm 5	14 \pm 2	40 \pm 9	127 \pm 6	320 \pm 27	345 \pm 28
	AA	2.5 μ g	389 \pm 6	211 \pm 26	3419 \pm 170	3958 \pm 198		
	AA	10.0 μ g					977 \pm 49	1601 \pm 67

Tabelle 21: Übersicht der historischen Kontrolldaten

Stamm	Historische Kontrollen	ohne S9				Mit S9			
		Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
TA 1535	Lösungsmittelnegativkontrolle	11	2.3	6	22	12	2.3	7	22
	unbehandelte Negativkontrolle	11	2.9	6	28	12	2.8	7	23
	Positivkontrolle	1245	161.4	367	1791	398	61.0	183	613
TA 1537	Lösungsmittelnegativkontrolle	10	2.2	6	19	13	3.2	7	30
	unbehandelte Negativkontrolle	10	2.7	5	21	14	3.6	6	29
	Positivkontrolle	94	30.0	48	231	170	64.8	81	421
TA 98	Lösungsmittelnegativkontrolle	26	4.2	13	43	36	6.1	12	56
	unbehandelte Negativkontrolle	27	4.7	14	40	39	6.4	12	59
	Positivkontrolle	421	176.8	196	2068	3908	815.0	223	5918

Stamm	Historische Kontrollen	ohne S9				Mit S9			
		Mittelwert	SD	Min	Max	Mittelwert	SD	Min	Max
TA 100	Lösungsmittelnegativkontrolle	160	29.3	79	214	148	31.3	76	216
	unbehandelte Negativkontrolle	181	26.1	80	235	171	27.7	87	218
	Positivkontrolle	2074	262.7	511	2850	3626	981.9	553	5860
WP2 pKM101	Lösungsmittelnegativkontrolle	205	27.6	171	289	233	29.3	194	310
	unbehandelte Negativkontrolle	220	32.2	167	297	259	33.4	204	338
	Positivkontrolle	3894	522.5	2576	5458	1277	403.5	950	4063
WP2 uvrA pKM101	Lösungsmittelnegativkontrolle	324	39.5	243	389	378	48.0	277	469
	unbehandelte Negativkontrolle	339	32.3	279	402	389	39.2	302	476
	Positivkontrolle	3706	589.3	2754	5261	2191	252.7	1720	2731

Tabelle 22: Errechnete Kontrollgrenzen unter der Annahme der angenäherten Normalverteilung (BLV Beurteilung)

Stamm	Historische Kontrollen	ohne S9		mit S9	
		$\bar{x} \pm 2SD$	$\bar{x} \pm 3SD$	$\bar{x} \pm 2SD$	$\bar{x} \pm 3SD$
TA 1535	Lösungsmittelnegativkontrolle	6.4, 15.6	4.1, 17.9	7.4, 16.6	5.1, 18.9
	unbehandelte Negativkontrolle	5.2, 16.8	2.3, 19.7	6.4, 17.6	3.6, 20.4
	Positivkontrolle	922.2, 1567.8	760.8, 1729.2	276,520	215,581
TA 1537	Lösungsmittelnegativkontrolle	5.6, 14.4	3.4, 16.6	6.6, 19.4	3.4, 22.6
	unbehandelte Negativkontrolle	4.6, 15.4	1.9, 18.1	6.8, 21.2	3.2, 24.8
	Positivkontrolle	34, 154	4, 184	40.4, 299.6	-24.4, 364.4
TA 98	Lösungsmittelnegativkontrolle	17.6, 34.4	13.4, 38.6	23.8, 48.2	17.7, 54.3
	unbehandelte Negativkontrolle	17.6, 36.4	12.9, 41.1	26.2, 51.8	19.8, 58.2
	Positivkontrolle	64.4, 774.6	-109.4, 951.4	2278, 5538	1463, 6353
TA 100	Lösungsmittelnegativkontrolle	101.4, 218.6	72.1, 247.9	85.4, 210.6	54.1, 241.9
	unbehandelte Negativkontrolle	128.8, 233.2	102.7, 259.3	115.6, 226.4	87.9, 254.1
	Positivkontrolle	1548.6, 2599.4	1285.9, 2862.1	1662.2, 5589.8	680.3, 6571.7
WP2 pKM101	Lösungsmittelnegativkontrolle	149.8, 260.2	122.2, 287.8	174.4, 291.6	145.1, 320.9
	unbehandelte Negativkontrolle	155.6, 284.4	123.4, 316.6	192.2, 325.8	158.8, 359.2
	Positivkontrolle	2849, 4939	2326.5, 5461.5	470, 2084	66.5, 2487.5
WP2 uvrA pKM101	Lösungsmittelnegativkontrolle	245, 403	205.5, 442.5	282, 474	234, 522
	unbehandelte Negativkontrolle	274.4, 403.6	242.1, 435.9	310.6, 467.4	271.4, 506.6
	Positivkontrolle	5473.9, 4884.6	1938.1, 5473.9	1685.6, 2696.4	1432.9, 2949.1

Diskussion

Der Ames-Test erfüllt keines der folgenden Kriterien der Leitlinie (OECD, 1997) für ein positives Resultat:

- Eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Anzahl Revertanten-Kolonien
- Erhöhte Anzahl Revertanten-Kolonien bei einer oder mehreren Konzentrationen in mindestens einem Stamm mit oder ohne metabolischer Aktivierung.
- Biologische Relevanz der Resultate ist bei den Befunden zu berücksichtigen.

Schlussfolgerung des Studienautors / der Studienautorin

Unter den Bedingungen des Tests hat SYN548764 bei keiner der getesteten Stämme ein positives Resultat bezüglich Genmutationen (Basenaustausch, Rasterverschiebungen Punktmutationen etc.) gezeigt. SYN548764 hat in diesem Ames-Test daher ein negatives Resultat erbracht.

Schlussfolgerung BLV

In der Leitlinie wird festgehalten, dass mit metabolischer Aktivierung 2-Aminoanthracen nicht als einziger Indikator für eine Bestätigung der Effizienz gelten sollte. In der Studie wurden keine weiteren Positivkontrollen bei einer metabolischen Aktivierung eingesetzt. Allerdings wird im Studienbericht bestätigt, dass jeder S9 Mix Batch routinemässig neben 2-Aminoanthracen auch mit Benzo[a]pyren getestet wird. Somit kann die Verwendung von 2-Aminoanthracen als einzige Positivkontrolle bei einer metabolischen Aktivierung akzeptiert werden. Die Zertifikate im Anhang des Studienreports zeigen für T98, dass mit Benzo[a]pyren eine 2-5-fach höhere Anzahl an Revertanten verglichen zur Kontrolle beobachtet werden kann.

SYN548764 wies bei keiner der getesteten Stämme ein positives Resultat bezüglich Genmutationen (Basenaustausch, Rasterverschiebungen Punktmutationen etc.) auf. Die Resultate der Positivkontrolle des Stammes WP2 *uvrA* pKM101 weisen auf leichte Qualitätsprobleme im Rahmen der Studiendurchführung hin, welche aber die Ergebnisse des Tests nicht in Frage stellen.

Im Rahmen dieses Ames-Tests weist SYN548764 in den hier geprüften Bakterienstämmen (*S. Typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 98 und TA 100 sowie *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101) und WP2 (pKM101)) kein mutagenes Potential auf.

2.3.2 Auswertung In Vitro Micronucleus Test In Human Lymphocytes

Studientitel	SYN548764 – <i>In Vitro</i> Micronucleus Test in Human Lymphocytes Final Report
Referenz	Gilby, B. , 2019
Durchführung	25 März 2019 – 17 Mai 2019
Testlabor	Covance CRS Limited Woolley Road, Alconbury, Huntingdon Cambridgeshire, PE28 4HS, United Kingdom
Berichtnummer	CR95FJ
Dokumentnummer	SYN548764_10017
Leitlinie(n)	OECD Guideline For The Testing Of Chemicals (2016): <i>In Vitro</i> Mammalian Cell Micronucleus Test, Test Guideline 487
Abweichungen von der Leitlinie	Keine
GLP	Ja
Testmaterial	SYN548764, Batchnummer MES 377/3, Reinheitsgrad 99% (w/w)

In einem *in vitro* Mikronukleus Assay wurde das Potential von SYN548764 untersucht, eine Erhöhung der Anzahl Mikronuklei in menschlichen Lymphozyten zu induzieren als Surrogat für die Untersuchung eines möglichen Potentials betreffend Chromosomenaberrationen (Klastogenität und Aneugenität). Mikronuklei können ihren Ursprung in azentrischen Chromosomenfragmenten oder der der nicht korrekten Chromosomenmigration zu den Polen der Zellen während der Anaphase der Zellteilung haben.

Material und Methoden

In der durchgeführten Studie wurde die Testsubstanz in Wasser gelöst. Die Effekte von SYN548764 auf den pH und die Osmolarität des Kulturmediums wurde ebenso geprüft.

Humane Lymphozyten wurden zwei gesunden erwachsenen Nichtraucher-Probanden (18-35 Jahre alt, Vorstudie weibliche Probandinnen, Hauptstudie je ein männlicher Proband und eine weibliche Probandin) entnommen, gepoolt und mit Kulturmedium verdünnt. Die kultivierten Zellen wurden zur Stimulierung der Zellteilung mit Phytohaemagglutinin (PHA) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit der Testsubstanz, Negativkontrolle und den Positivkontrollen behandelt. Für die Analyse der zweikerigen Zellen wurde die Zytokinese nach der 3-stündigen und während der 20-stündigen Behandlung mittels Cytochalasin B blockiert.

In der Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem Vehikel, in diesem Fall mit Wasser, behandelt, und in der Positivkontrolle ohne metabolische Aktivierung mit Mitomycin (0.3, µg/ml (3 h) und 0.1 µg/ml (20 h)) und mit Kolchizin (0.06 und 0.07, µg/ml (3 h) sowie 0.015 und 0.02 µg/ml (20 h)). Mit metabolischer Aktivierung wurden die Zellen mit Cyclophosphamid behandelt (10 µg/ml).

Tabelle 23: Übersicht zur Behandlungsdauer, +/- metabolische Aktivierung mit S9-Mix, geprüfte Konzentrationen

Vorstudie	
- S9-Mix, 3 h Behandlung	3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 und 2000 µg/mL.
+ S9-Mix, 3 h Behandlung	3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 und 2000 µg/mL.
- S9-Mix, 20 h Behandlung	3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 und 2000 µg/mL.
Hauptstudie	
- S9-Mix, 3 h Behandlung	250, 500, 1000 und 2000 µg/mL*.
+ S9-Mix, 3 h Behandlung	250, 500, 1000 und 2000 µg/mL#.
- S9-Mix, 20 h Behandlung	50, 500, 750, 1000, 1049.76, 1166.4, 1296, 1440 und 1600 µg/mL. *
- S9-Mix, 3 h Behandlung, Wiederholung	250, <u>500</u> [§] , <u>1000</u> [§] und <u>2000</u> [§] µg/mL.
+ S9-Mix, 3 h Behandlung, Wiederholung	250, <u>500</u> [§] , <u>1000</u> [§] und <u>2000</u> [§] µg/mL.
- S9-Mix, 20 h Behandlung, Wiederholung	<u>20</u> [§] , 200, 300, 400, <u>500</u> [§] , <u>600</u> [§] , 700, <u>800</u> [§] , 900, 1000, 1100 und 1200 µg/mL.

* Die Daten zur Zytotoxizität wurden im Bericht wiedergegeben, die Mikronukleusdaten wurden durch die Firma im Bericht nicht aufgeführt. Die Anzahl Mikronuklei in der Negativkontrolle lag über der historischen Kontrolle und wurde vom Studienautor als Ausreisser identifiziert. Aus diesem Grund wurde das Experiment mit den gleichen Dosen wiederholt.

Es wurden weder Daten zur Zytotoxizität noch zu den Mikronuklei im Studienbericht präsentiert.

§ Konzentrationen, welche bezüglich Mikrokernen untersucht und im Bericht rapportiert wurden, sind unterstrichen.

Nach der Zellernte, Fixierung und der Färbung mit einer Acridinorange-Lösung wurden die Proben mit den Zellen in der Interphase mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierbei wurden einkernige, zweikernige und mehrkernige Zellen beurteilt und abnormale Zahlen von Zellen in der Mitose, polyploide sowie nekrotische Zellen und Zellüberreste notiert.

Zur statistischen Bewertung wurden die Daten mittels arcsin-Wurzel transformiert. Im paarweisen Vergleich wurden die mit SYN548764 behandelten Proben mit der Negativkontrolle mittels Williams-Test (William 1971, 1972) geprüft. Die Positivkontrollen wurden paarweise mit der Negativkontrolle mittels t-Test verglichen. Über lineare Kontraste wurde zudem ein möglicher Trend evaluiert. Das statistische Signifikanzniveau wurde bei 5% festgelegt.

Resultate

Betreffend Osmolarität und pH im Zellkulturmedium wurde bei der Testsubstanz SYN548764 verglichen mit der Negativkontrolle einzig eine Erhöhung von 10 mOsmol/kg und eine pH-Erhöhung von 0.2 beobachtet.

In der Vorstudie wurde bei einer Exposition von 3h mit und ohne metabolischer Aktivierung keine Zytostase identifiziert. Bei einer 20-stündigen Exposition ohne metabolische Aktivierung wurde verglichen mit der Kontrolle ab einer Dosis von 2000 µg/mL eine Zytostase mit einem CBPI (*Cytokinesis-block proliferation index*) von > 45% +/-5% (74.4%) beobachtet. Dementsprechend wurden in der Hauptstudie bei einer 20-stündigen Exposition Konzentrationen bis 1600 µg/mL getestet.

In der ersten Hauptstudie wurde verglichen mit der Kontrolle eine Zytostase mit einem CBPI von > 45% +/-5% (54%) ab einer Konzentration von 500 µg/mL beobachtet.

In einem Wiederholungsexperiment mit einer Exposition von 20h ohne metabolische Aktivierung wurde daraufhin bis 1200 µg/mL getestet, wobei verglichen mit der Kontrolle eine Zytostase ab einer Konzentration von 800 µg/mL mit einem CBPI von > 45% +/-5% (55.3%) beobachtet wurde.

In der wiederholten Hauptstudie wurde bei einer Exposition von 3h mit und ohne metabolische Aktivierung keine statistisch signifikant erhöhte Anzahl Mikronuklei pro 1000 zweikernigen Zellen beobachtet. Ebenso wenig wurde ein Trend mit steigender Dosis beobachtet. Allerdings lagen sowohl die interne Kontrolle als auch die mit SYN548764 behandelten Gruppen ohne metabolische Aktivierung höher als die obere 95%-Konfidenzgrenze der historischen Negativkontrolldaten. In einem zweiseitigen ungepaarten Welch-test – durchgeführt durch das BLV - erwies sich der Mittelwert der Negativkontrolle des Experiments als statistisch signifikant unterschiedlich zum Mittelwert der historischen Negativkontrolle (P-Wert =6.2⁻⁵, KI= 4.3 bis 6.7).

Die Positivkontrollen wiesen mit und ohne metabolische Aktivierung eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl Mikronuklei auf, was auf eine funktionierende Testdurchführung hindeutet. Die Mittelwerte der Positivkontrollen im Experiment lagen innerhalb der historischen Positivkontrolldaten.

Tabelle 24: Wiederholung Hauptstudie: Exposition von 3h ohne S9

Behandlung/ Konzentration (µg/mL)	Mittelwert Zytostase (%)	Zweikernige Zellen welche Mikronuklei enthalten			
		pro1000 Zellen	Mittelwert	Paarweiser Vergleich P-Wert ^d	Trendtest P-Wert ^e
Negativkontrolle (Lösungsmittel) ^a	0.0	12 13 11 12	12.0		
SYN548764 / 500	7.2	13 11	12.0	1.000	
SYN548764 / 1000	2.6	13 12	12.5	1.000	0.699
SYN548764 / 2000	22.7	13 11	12.0	1.000	0.908
MMC ^b / 0.3	12.9	41 38	39.5	<0.001***	
COL ^c / 0.07	21.7	38 31	34.5	<0.001***	

a. Negativkontrolle = Wasser (10% v/v)

b. Positivkontrolle (Klastogenität) = Mitomycin C

c. Positivkontrolle (Aneugenität) =Kolchizin

d. P-Werte Paarweiser Vergleich zur Negativkontrolle mittels Williams-Test für SYN548764 und für die Positivkontrolle mittels t-test

e. P- Werte für den Trendtest mittels linearer Kontraste, welcher die Negativkontrolle und die getesteten Konzentrationen von SYN548764

*** P-Wert<0.001

Tabelle 25: Laborinterne Historische Kontrolldaten mit einer Exposition von 3h ohne S9 (24. März 2017 bis 27. März 2019, 48 Versuche)

	Negativkontrolle		Mitomycin C (0.2 or 0.3 µg/mL)		Kolchizin (0.05, 0.06 oder 0.07 µg/mL)	
	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)
Minimum	2.0	3.3	14.0	14.5	14.0	15.5
Maximum	12.0	9.8	62.0	58.0	48.0	47.0
Mittelwert	6.5	6.5	31.1	31.1	24.8	24.8
Standardabweichung	2.3	1.6	9.4	9.1	6.7	6.2
Untere 95% Kontrollgrenzen		3.3		20.0		12.4
Obere 95 Kontrollgrenzen		9.6		49.4		37.2

Tabelle 26: Wiederholung Hauptstudie: Exposition von 3h mit S9

Behandlung/ Konzentration (µg/mL)	Mittelwert Zytostase (%)	Zweikernige Zellen welche Mikronuklei enthalten			
		pro1000 Zellen	Mittelwert	Paarweiser Vergleich P-Wert ^c	Trendtest P-Wert ^d
Negativkontrolle (Vehikel) ^a	0.0	3 3 6 4	4.0		
SYN548764 / 500	1.1	4 2	3.0	1.000	
SYN548764 / 1000	1.2	3 4	3.5	1.000	0.678
SYN548764 / 2000	4.6	5 5	5.0	0.452	0.301
CPA ^b / 10	33.2	13 16	14.5	<0.001***	

a. Negativkontrolle = Wasser (10% v/v)

b. Positivkontrolle (Klastogenität) = Cyclophosphamid (erfordert metabolische Aktivierung für klastogene Wirkung)

c. P-Werte Paarweiser Vergleich zur Negativkontrolle mittels Williams-Test für SYN548764 und für die Positivkontrolle mittels t-test

d. P- Werte für den Trendtest mittels linearer Kontraste, welcher die Negativkontrolle und die getesteten Konzentrationen von SYN548764

*** P-Wert<0.001

Tabelle 27: Laborinterne Historische Kontrolldaten betreffend mit einer Exposition von 3h mit S9 (24. März 2017 bis 27. März 2019, 48 Versuche)

	Negativkontrolle		Cyclophosphamid (5 oder 10 µg/mL)	
	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)
Minimum	1.0	3.3	13.0	16.0
Maximum	15.0	10.8	37.0	36.5
Mittelwert	6.2	6.2	23.1	23.1
Standardabweichung	2.3	1.7	5.4	5.0
Untere 95% Kontrollgrenzen		2.9		13.1
Obere 95 Kontrollgrenzen		9.6		33.0

In der Wiederholungsstudie wurde bei einer Exposition von 20h ohne metabolische Aktivierung keine statistisch signifikant erhöhte Anzahl Mikronuklei pro 1000 zweikernigen Zellen beobachtet. Ebenso wenig wurde ein Trend mit steigender Dosis beobachtet. Allerdings lag die interne Kontrolle direkt an der oberen 95%-Konfidenzgrenze der historischen Kontrolldaten und das Testresultat mit 20 µg/ml SYN548764 ausserhalb. In einem zweiseitigen Welch-test für ungepaarte Stichproben erweist sich der Mittelwert des Experiments als statistisch nicht signifikant unterschiedlich zur historischen Kontrolle (P-Wert =0.1, KI= 5.2 bis 15).

Die Positivkontrollen wiesen eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl Mikronuklei auf, was auf eine funktionierende Testdurchführung hinweist. Dabei lagen der Mittelwert der Positivkontrolle Kolchizin oberhalb der 95%-Kontrollgrenzen der historischen Kontrolldaten. In einem zweiseitigen ungepaarten Welch-test erweist sich der Mittelwert des Experiments als statistisch nicht signifikant unterschiedlich zur historischen Kontrolle (P-Wert =0.32, KI= -36.7 bis 49.5).

Tabelle 28: Wiederholung Hauptstudie: Exposition von 20h ohne S9

Behandlung/ Konzentration (µg/mL)	Mittelwert Zytostase (%)	Zweikernige Zellen welche Mikronuklei enthalten			
		pro1000 Zellen	Mittelwert	Paarweiser Vergleich P-Wert ^b	Trendtest P-Wert ^c
Negativkontrolle (Vehikel) ^a	0.0	11 9 12 10	10.5		
SYN548764 / 20	1.0	11 13	12.0	1.000	
SYN548764 / 500	27.2	7 9	8.0	0.323	0.159
SYN548764 / 600	40.3	10 8	9.0	0.323	0.150
SYN548764 / 800	55.3	7 9	8.0	0.197	0.067
MMC ^b / 0.1	39.4	28 36	32.0	<0.001***	
COL ^c / 0.015	50.1	20 27	23.5	<0.001***	

a. Negativkontrolle = Wasser (10% v/v)

- b. Positivkontrolle (Klastogenität) = Mitomycin C
- c. Positivkontrolle (Aneugenität) = Kolchizin
- d. P-Werte Paarweiser Vergleich zur Negativkontrolle mittels Williams-Test für SYN548764 und für die Positivkontrolle mittels t-test
- e. P- Werte für den Trendtest mittels linearer Kontraste, welcher die Negativkontrolle und die getesteten Konzentrationen von SYN548764
- f. *** P-Wert<0.001

Tabelle 29: Laborinterne Historische Kontrolldaten betreffend einer Exposition von 20h ohne S9 (24. März 2017 bis 27. März 2019 zu 48 Versuchen)

	Negativkontrolle		Mitomycin C (0.2 or 0.3 µg/mL)		Kolchizin (0.05, 0.06 oder 0.07 µg/mL)	
	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen	Zweikernige Zellen MN (Mittel der Gruppe)	Zweikernige Zellen MN/1000 Zellen
Minimum	3.0	4.3	15.0	16.0	13.0	14.0
Maximum	14.0	11.5	41.0	37.0	25.0	23.0
Mittelwert	7.1	7.1	26.2	26.2	17.1	17.1
Standardabweichung	2.4	1.7	6.8	6.3	2.3	2.1
Untere 95% Kontrollgrenzen		3.7		17.9		12.9
Obere 95 Kontrollgrenzen		10.5		38.8		21.2

Tabelle 30: Gesamtübersicht der Resultate über alle ausgewerteten Versuche

Exposition	Behandlung/ Konzentration (µg/mL)	Zytostase (%)	Zweikernige Zellen welche Mikronuklei enthalten		
			pro1000 Zellen	Paarweiser Vergleich P-Wert ^e	Trendtest P-Wert ^f
Wiederholt 3-h -S9	Negativkontrolle ^a	0.0 ^g	12.0		0.699
	SYN548764 (500)	7.2	12.0	1.000	0.908
	SYN548764 (1000)	2.6	12.5	1.000	
	SYN548764 (2000)	22.7	12.0	1.000	
	MMC (0.3) ^b	12.9	39.5	<0.001***	
COL (0.07) ^c	21.7	34.5	<0.001***		
Wiederholt 3-h +S9	Negativkontrolle ^a	0.0	4.0		0.678
	SYN548764 (500)	1.1	3.0	1.000	0.301
	SYN548764 (1000)	1.2	3.5	1.000	
	SYN548764 (2000)	4.6	5.0	0.452	
	CPA (10) ^d	33.2	14.5	<0.001***	

Exposition	Behandlung/ Konzentration (µg/mL)	Zytostase (%)	Zweikernige Zellen welche Mikronuklei enthalten		
			pro1000 Zellen	Paarweiser Vergleich P-Wert ^e	Trendtest P-Wert ^f
Wiederholt 20-h -S9	Negativkontrolle ^a	0.0	10.5		0.159
	SYN548764 (20)	1.0	12.0	1.000	0.150
	SYN548764 (500)	27.2	8.0	0.323	0.067
	SYN548764 (600)	40.3	9.0	0.323	
	SYN548764 (800)	55.3	8.0	0.197	
	MMC (0.1) ^b	39.4	32.0	<0.001***	
COL (0.015) ^c	50.1	23.5	<0.001***		

^a Negativkontrolle = Wasser (10% v/v)

^b Positivkontrolle (Klastogenität): Mitomycin C

^c Positivkontrolle (Aneugenität): Colchicin

^d Positivkontrolle (Klastogenität) = Cyclophosphamid (erfordert metabolische Aktivierung für klastogene Wirkung)

^e p-Werte für den Williams-Test beim paarweisen Vergleich zwischen Behandlungsgruppe und Negativkontrolle, bzw. für den t-Test beim paarweisen Vergleich zwischen Positiv- und Negativkontrolle

^f p-Werte für den Trendtest mittels linearer Kontraste, welcher die Negativkontrolle und die unteren getesteten Konzentrationen beinhaltet

^g Der Cytostase-Wert wird mit 0.0 ausgewiesen da der CBPI-Wert der Behandlungsgruppe \geq jenem der Kontrollgruppe

** p<0.01

*** <0.001

Diskussion

Gemäss der Testrichtlinie (OECD, 2016b) wird eine Prüfsubstanz als klar positiv erachtet, falls bei einer der geprüften Versuchsbedingungen:

- mindestens eine der Testkonzentrationen verglichen mit der simultanen Negativkontrolle eine statistisch signifikant erhöhte Mikronukleus-Inzidenz aufweist,
- die Erhöhung bei mindestens einer der Versuchsbedingungen konzentrationsabhängig ist, wenn sie mit einem geeigneten Trendtest daraufhin untersucht wird,
- ein Ergebnis ausserhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegt (z.B. der 95%-Kontrollgrenzen).

Werden alle diese drei Kriterien erfüllt, wird die Prüfsubstanz als aneugen/klastogen im untersuchten Testsystem betrachtet. Demgegenüber gilt eine Prüfsubstanz als klar negativ, wenn in allen untersuchten Versuchsbedingungen:

- die Mikronukleus-Inzidenz keiner der geprüften Testkonzentrationen statistisch signifikant gegenüber der simultanen Negativkontrolle erhöht ist,
- keine konzentrationsabhängige Erhöhung der Mikronukleus-Inzidenz vorliegt, wenn diese mit einem geeigneten Trendtest daraufhin untersucht wird,
- alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z.B. der 95%-Kontrollgrenzen).

Eine Prüfsubstanz wird als nicht-aneugen/klastogen im untersuchten Testsystem betrachtet, wenn alle Bedingungen für ein negatives Resultat erfüllt werden.

Im hier durchgeführten *in vitro* Mikronukleus Test wies keine der Testkonzentrationen eine statistisch signifikante Erhöhung verglichen mit der Negativkontrolle auf. Weiter wurde mit einem geeigneten Trendtest keine konzentrationsabhängige Zunahme festgestellt. Allerdings lagen sowohl die interne Kontrolle als auch die mit SYN548764 behandelten Gruppen ohne metabolische Aktivierung und einer

Exposition von 3 h höher als die obere 95%-Konfidenzgrenze der historischen Negativkontrolldaten. In einem zweiseitigen ungepaarten Welch-test – durchgeführt durch das BLV - erwies sich der Mittelwert der Negativkontrolle des Experiments als statistisch signifikant unterschiedlich verglichen mit dem Mittelwert der historischen Negativkontrolle (p-Wert = 6.2×10^{-5} , KI= 4.3 bis 6.7).

In der wiederholten Hauptstudie lag bei einer Exposition von 20 h ohne metabolische Aktivierung die interne Kontrolle direkt an der oberen 95%-Konfidenzgrenze der historischen Kontrolldaten und das Testresultat mit 20 µg/ml SYN 548764 ausserhalb. In einem Welch-Test konnte allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zu diesem Befund identifiziert werden verglichen mit der historischen Negativkontrolle.

Die Negativkontrolle des Versuchs mit einer Exposition von 3 h ohne S9 ist aus Sicht BLV nicht als Teil der historischen Kontrolldaten anzusehen. In der Studie wird mitgeteilt, dass übereinstimmend mit der OECD Richtlinie 487 (2016) diese Negativkontrolle Teil der laborinternen historischen Kontrolldaten sei, weil diese nicht als extremer Ausreisser angesehen werden müsse und interne Qualitätskontrollen bestanden hätten. Aus unserer Sicht hätte diese Bewertung anhand von Berechnungen dokumentiert werden müssen.

Zu hinterfragen ist ebenfalls, dass im ersten Versuch der Hauptstudie die internen Negativkontrollen ausserhalb der historischen Kontrolldaten lagen und durch den Studienautor als Ausreisser bezeichnet werden und vermutlich deshalb die Studienergebnisse im Studienbericht nicht aufgezeigt wurden.

Schlussfolgerung Studienautors / der Studienautorin

SYN548764 zeigte keine Hinweise auf eine Induktion von einer erhöhten Anzahl an Mikronuklei in Zellkulturen mit menschlichen Lymphozyten und weist daher im *in vitro* Mikronukleus Test ein negatives Resultat auf.

Schlussfolgerung BLV

Unter den Bedingungen des Tests, hat SYN548764 zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung von Mikronuklei in Zellkulturen mit menschlichen Lymphozyten geführt. Die Anzahl Mikronuklei lagen ohne metabolische Aktivierung bei einer Exposition von 3 h zusammen mit der internen Kontrolle ausserhalb der oberen 95%-Kontrollgrenze der historischen Negativkontrollen. Eine analoge Verschiebung der Positivkontrolle wurde nicht beobachtet. Die Anzahl Mikronuklei der simultanen Positivkontrolle lag innerhalb der 95%-Kontrollgrenze der historischen Positivkontrollen. Es kann deshalb nicht gefolgert werden, dass das Experiment insgesamt zu höheren Anzahlen Mikronuklei geführt hätte. Der Versuch mit einer Exposition von 3h ohne metabolische Aktivierung schien nicht unter Kontrolle gewesen zu sein. Die Akzeptierbarkeit der Negativkontrolle ausserhalb der 95%-Kontrollgrenzen gemäss OECD Leitlinie wurde nicht genügend dokumentiert und lässt daher für das BLV keine Schlussfolgerung zu. Die Aussagekraft dieses Versuches ist deshalb eingeschränkt.

2.3.3 Auswertung Gene Mutation Assay In Chinese Hamster V79 Cells In Vitro

Studientitel	SYN548764 – Gene Mutation Assay in Chinese Hamster V79 Cells <i>in vitro</i> (V79/HPRT) Final Report
Referenz	Sokolowski, A. , 2019
Durchführung	22. Januar 2019 – 02 August 2019
Testlabor	Envigo CRS GmbH, in den Leppsteinswiesen 19, 64380 Rossdorf, Deutschland
Berichtsnummer	1941200
Dokumentnummer	SYN548764_10019
Leitlinie(n)	OECD Guideline For The Testing Of Chemicals (2016): <i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes, Test Guideline 476
Abweichungen von der Leitlinie	Keine
GLP	Ja
Testmaterial	SYN548764, Batchnummer MES 377/3, Reinheitsgrad 99% (w/w)

In einem *in vitro* Mutagenitätsassay wurde das Potential von SYN548764 untersucht, Mutationen (z.B. Basenpaarsubstitution, Rasterverschiebungen, kurze Deletionen und Insertionen) in V79 Zellen zu induzieren.

Material und Methoden

Für die Studie wurde entionisiertes Wasser als Lösungsmittel verwendet (10% v/v). Die Effekte von SYN548764 auf den pH und die Osmolarität des Kulturmediums wurde mittels einem Osmometer und pH-Meter geprüft.

Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem Vehikel, in diesem Fall mit entionisiertem Wasser und als Positivkontrolle ohne metabolische Aktivierung mit Etylmethansulfonat (EMS) (300, µg/ml) und mit metabolischer Aktivierung mit 7,12-dimethylbenz(a)anthrazen (DMBA) (2.3 µg/ml) exponiert.

In der statistischen Analyse wurden eine Dosiswirkungsbeziehung über eine lineare Regression analysiert und mittels des Statistikprogramms R wurden die Resultate über den t-Test paarweise mit der Negativkontrolle verglichen. Das statistische Signifikanzniveau wurde bei 5% festgelegt.

Folgende Konzentrationen an SYN548764 wurden im Rahmen dieser Studie getestet (Tabelle 31):

Tabelle 31: Übersicht zur Behandlungsdauer, +/- metabolische Aktivierung mit S9-Mix, geprüfte Konzentrationen

	Konzentrationen (µg/mL)					
Vorexperiment 4 h Exposition						
ohne S9 mix	15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 und 2000*					
mit S9 mix	15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 und 2000*					
Hauptexperiment I 4 h Exposition						
ohne S9 mix	62.5	125	250	500	1000	2000*
mit S9 mix	62.5	125	250	500	1000	2000*
Hauptexperiment IA 4 h Exposition						
Mit S9 mix	62.5	125	250	500	1000	2000*

* Maximal zu testende Konzentration in der OECD Leitlinie 476

Resultate:

Betreffend Osmolarität und pH im Zellkulturmedium wurde durch die Testsubstanz SYN548764 einzig eine Erhöhung von 23 mOsmol/kg und einer pH-Reduktion von 0.1 beobachtet.

In der Vorstudie wurde keine Präzipitation beobachtet, und keine Hinweise auf eine stark zytotoxische Wirkung beobachtet, weshalb eine maximale Konzentration von 2000 µg/ml Testsubstanz im Hauptexperiment getestet wurde.

Ohne metabolische Aktivierung wurde im paarweisen Vergleich keine statistisch signifikant erhöhte Mutationsfrequenz verglichen zur Negativkontrolle identifiziert. Anhand einer linearen Regression konnte keine Dosiswirkungsbeziehung identifiziert werden. Die Mutationsfrequenz lag zudem innerhalb der 95%-Kontrollgrenzen der historischen Negativkontrollen.

Mit metabolischer Aktivierung wurde anhand einer linearen Regression keine Dosiswirkungsbeziehung identifiziert. Weiter lag die Frequenz an Mutationen innerhalb der 95%-Kontrollgrenzen der historischen Negativkontrollen. Allerdings wurde bei der höchsten Konzentration im paarweisen Vergleich eine statistisch signifikant erhöhte Frequenz an Mutationen beobachtet.

Aufgrund des nicht eindeutig negativen Ergebnis aus dem Experiment I mit metabolischer Aktivierung wurde dieses Experiment wiederholt (Experiment IA). Die Mutationsfrequenzen lagen dieses Mal alle tiefer als die der Negativkontrollen und lagen innerhalb der 95%-Kontrollgrenzen der historischen Negativkontrollen. Weiter wurde keine Dosiswirkungsbeziehung identifiziert.

Es wurden im Hauptexperiment I und IA mit und ohne metabolische Aktivierung anhand der relativen korrigierten Klonierungseffizienz (relative RS) <50% keine zytotoxischen Effekte beobachtet. Es wurde zudem weder Präzipitation noch Phasentrennung bis zur höchsten getesteten Konzentration beobachtet.

Die Positivkontrollen wiesen mit und ohne metabolische Aktivierung eine statistisch signifikant erhöhte Frequenz an Mutationen auf, was auf eine funktionierende Testdurchführung hinweist. Die Mittelwerte der Positivkontrollen lagen innerhalb der historischen Kontrolldaten.

Tabelle 32: Resultate Hauptexperiment I mit und ohne metabolische Aktivierung

Behandlungen (4h)	Konz. µg/mL	P/ P	S9 S	relative Klonierungseffizienz I %	relative Zelldichte %	rel. angepasste Klonierungseffizienz % ^a (relative Überlebensrate RS)	MF Frequenz an mutante Kolonien / 10 ⁶ Zellen	95% Kontrollgrenzen	statistische Analyse**	
									t-Test (p-Wert)	lineare Regressionsanalyse (p-Wert)
Negativkontrolle*		-	-	100.0	100.0	100.0	11.9	Negativkontrolle: 2.8 - 30.9		
EMS)	300.0	-	-	95.3	79.6	76.3	233.6	Positivkontrolle: 21.1 – 425.5	0.000 ^s	0.595
SYN548764	625	-	-	96.3	96.2	87.3	#		#	
SYN548764	125.0	-	-	94.1	94.5	88.8	#		#	
SYN548764	250.0	-	-	93.8	91.4	90.2	16.0		0.220	
SYN548764	500.0	-	-	97.3	74.0	71.6	14.3		0.153	
SYN548764	1000.0	-	-	85.3	79.1	65.7	12.8		n.c.	
SYN548764	2000.0	-	-	83.7	84.8	70.3	15.2		0.167	
Negativkontrolle*		-	+	100.0	100.0	100.0	10.7	Negativkontrolle: 3.1 -30.7		
DMBA	2.3	-	+	106.3	94.1	100.1	101.3	Positivkontrolle: -9.2 – 385.2	0.000 ^s	0.113
SYN548764	62.5	-	+	99.6	102.3	102.9	#		#	
SYN548764	125.0	-	+	97.0	89.9	86.9	#		#	
SYN548764	250.0	-	+	94.8	88.8	84.2	14.6		0.179	
SYN548764	500.0	-	+	100.4	87.9	87.6	10.5		n.c.	
SYN548764	1000.0	-	+	81.8	97.6	79.8	11.8		0.375	

Behandlungen (4h)	Konz. µg/mL	P/ P S	S9	relative Klonierungseffizienz I %	relative Zelldichte %	rel. angepasste Klonierungseffizienz % ^a (relative Überlebensrate RS)	MF Frequenz an mutante Kolonien / 10 ⁶ Zellen	95% Kontrollgrenzen	statistische Analyse**	
									t-Test (p-Wert)	lineare Regressionsanalyse (p-Wert)
SYN548764	2000.0	-	+	78.4	104.0	81.4	19.7		0.003 ^S	

P/PS Präzipitation / Phasentrennung

* Mittelwert Berechnung basierend auf den Daten von zwei Lösungsmittelkontrollen in jeder Kultur.

** statistische Analyse basierend auf den Mittelwerten der Kulturen 1 und 2

MF Mutationsfrequenz

Kultur wurde nicht weitergezogen, da im Minimum einzig 4 Kulturen analysierbar sein müssen.

n.c. nicht berechnet da die MF unter der MF der Negativkontrolle liegt oder nicht mindestens 1 darüber lag.

S Statistisch signifikant (p < 0.05)

Tabelle 33: Resultate Hauptexperiment IA mit metabolischer Aktivierung

Behandlungen (4h)	Konz. µg/mL	P/ P S	S9	relative Klonierungseffizienz I %	relative Zelldichte %	rel. angepasste Klonierungseffizienz % ^a (relative Überlebensrate RS)	MF mutante Kolonien / 10 ⁶ Zellen	95% Kontrollgrenzen	statistische Analyse**	
									t-Test	lineare Regressionsanalyse
Negativkontrolle*		-	+	100.0	100.0	100.0	8.3	Negativkontrolle: 3.1 - 30.7		
DMBA	2.3	-	+	91.9	99.7	92.2	80.0	Positiv Kontrolle: 21.1 - 425.5	0.000	
SYN548764	62	-	+	94.8	106.6	100.	#		#	
SYN548764	125.0			90.	113.3	103	#		#	0.419
SYN548764	250.0	-	+	91.9	108.9	108.9	7.0		n.c.	
SYN548764	500.0	-	+	84.4	108.4	89.8	7.5		n.c.	
SYN548764	1000.0	-	+	84.2	117.6	97.8	5.5		n.c.	
SYN548764	2000.0	-	+	70.2	118.3	81.9	7.0		n.c.	

P/PS Präzipitation / Phasentrennung

* Mittelwert Berechnung basierend auf den Daten von zwei Lösungsmittelkontrollen in jeder Kultur.

** statistische Analyse basierend auf den Mittelwerten der Kulturen 1 und 2 MF Mutationsfrequenz

Kultur wurde nicht weitergezogen, da im Minimum einzig 4 Kulturen analysierbar sein müssen.

n.c. nicht berechnet da die MF unter der MF der Negativkontrolle liegt oder nicht mindestens 1 darüber lag.

S Statistisch signifikant (p < 0.05)

Tabelle 34: Laborinterne historische Kontrolldaten: Anzahl mutanter Kolonien pro 10⁶ Zellen nach 4h Behandlungszeit(2014 – 2018)

Ohne metabolische Aktivierung (-S9)	Parameter	Positivkontrolle EMS 150 und 300 µg/mL	Negativkontrolle (Medium, Aceton, Wasser, DMSO, Ethanol, THF, EGDE)
	Spannweite:	53.9 – 872.3	3.4 – 41.0
	Mittelwert:	223.3	16.9
	Standardabweichung:	101.1	7.0
	95% Kontrollgrenzen	21.1 - 425.5*	2.8 – 30.9
	Anzahl Studien:	199	199
Mit metabolische Aktivierung (+S9)	Parameter	Positivkontrolle DMBA 1.1 und 2.3 µg/mL	Negativkontrolle (Medium, Aceton, Wasser, DMSO, Ethanol, THF, EGDE)
	Spannweite:	55.6 – 739.9	2.4 – 40.4
	Mittelwert:	188.0	16.9
	Standardabweichung:	98.6	6.9
	95% Kontrollgrenzen	-9.2 - 385.2*	3.1 – 30.7
	Anzahl Studien:	193	193

* Errechnet durch BLV analog zur Negativkontrolle Mittelwert ± 2x SD (Annahme einer Normalverteilung)

Diskussion

Gemäss der Testrichtlinie (OECD, 2016b) wird eine Prüfsubstanz als klar positiv erachtet, falls bei einer der geprüften Versuchsbedingungen:

- mindestens eine der Testkonzentrationen verglichen mit der simultanen Negativkontrolle eine statistisch signifikante Erhöhung aufweist,
- die Erhöhung konzentrationsabhängig ist, wenn sie mit einem geeigneten Trendtest daraufhin untersucht wird,
- ein Ergebnis ausserhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegt (z.B. 95%-Kontrollgrenzen basierend auf der Poisson-Verteilung).

Werden alle diese drei Kriterien erfüllt, wird die Prüfsubstanz als mutagen im untersuchten Testsystem betrachtet. Demgegenüber gilt eine Prüfsubstanz als klar negativ, wenn in allen untersuchten Versuchsbedingungen:

- keiner der geprüften Testkonzentrationen statistisch signifikant gegenüber der simultanen Negativkontrolle erhöht ist.
- keine konzentrationsabhängige Erhöhung vorliegt, wenn sie mit einem geeigneten Trendtest daraufhin untersucht wird,
- alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen z.B. 95%-Kontrollgrenzen basierend auf der Poisson-Verteilung).

Im vorliegenden *in vitro* Mutagenitätsassay wurde keine konzentrationsabhängige Zunahme der Mutationsfrequenz mit einem geeigneten Trendtest festgestellt, weiter lagen alle Resultate innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolle. Mit metabolischer Aktivierung wurde im Experiment I eine statistisch signifikante Erhöhung der Mutationsfrequenz bei der höchsten getesteten Konzentration verglichen mit der Negativkontrolle identifiziert. Allerdings konnte diese Erhöhung im wiederholten Experiment (Experiment IA) nicht bestätigt werden.

Schlussfolgerung Firma

SYN548764 zeigte am HPRT Locus keine Hinweise auf eine Induktion von Mutationen in V79 Zellen und weist daher im *in vitro* Mutagenitätsassay ein negatives Resultat auf.

Schlussfolgerung BLV

Der zweideutige Befund aus dem ersten Experiment mit metabolischer Aktivierung liegt innerhalb der laborinternen historischen Negativkontrolle. Weiter wurde in einem zweiten Experiment (IA) bei der höchsten Dosis keine statistisch signifikante Erhöhung verglichen mit der Negativkontrolle beobachtet. Unter den Bedingungen des Tests, hat SYN548764, zu keiner biologisch relevanten dosisabhängigen statistisch signifikanten Erhöhung der Mutationsfrequenz in V79 Zellen geführt. SYN548764 erbrachte somit in diesem *in vitro* Mutagenitätsassay ein negatives Resultat.

2.3.4 SYN548764 (SYN548581, M11): Beurteilung Relevanz

Für SYN548764 konnte ein mutagenes Potential in Bakterien- und in Säugerzellen ausgeschlossen werden. Das aneugene oder klastogene Potential kann nicht abschliessend beurteilt werden. Der vorliegende *in vitro* Mikronukleusassay weist Fragen bezüglich seiner Qualität auf. Ein mögliches genotoxisches Potential kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden und daher ist SYN548764 relevant.

3. Übertragungskonzept (*Read-across*)

Basierend auf Leitlinien der EFSA, der ECHA und der OECD sowie den Empfehlungen zum Vorgehen der EFSA (ECHA (European Chemicals Agency), 2013; European Chemicals Agency (ECHA), 2017; European Food Safety Authority, 2018; OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2014) akzeptiert das BLV teils das durch die Firma vorgeschlagene Übertragungskonzept (*read-across*), um anhand toxikologischer Informationen untersuchter Substanzen strukturell ähnliche, ungeprüfte Substanzen zu charakterisieren. So hat das BLV die Grundwassermetaboliten R419492 und R471811 gestützt auf *read-across* als nicht relevant beurteilt (BLV, 2019).

In den vorgeschlagenen Übertragungskonzepten ist R417888 die Ausgangssubstanz für die *sulphonic acid pathway metabolites* und R182281 die Ausgangssubstanz für die *dechlorinated hydroxyl metabolites* (BLV, 2019). Für beide Substanzen wurden im Rahmen des rechtlichen Gehörs Daten eingereicht. Deshalb muss geprüft werden, ob die Relevanzbeurteilung der Metaboliten, welche den *sulphonic acid pathway metabolites* respektive den *dechlorinated hydroxyl metabolites* zugeordnet wurden, unter Berücksichtigung der nachgereichten Daten revidiert werden muss.

Bei den als relevant beurteilten Metaboliten des *sulphonic acid pathway*, waren fehlende Daten zur GSH-Reaktivität mit ausschlaggebend, warum die Karzinogenität dieser Metaboliten als nicht abgeklärt beurteilt wurden. Keine entsprechenden Daten wurden während des rechtlichen Gehörs eingereicht. Deshalb werden R418503 und SYN548008, ungeachtet dessen, dass R417888 nun als nicht relevant betrachtet werden kann, weiterhin als relevant erachtet.

Zu R182281 wurden im rechtlichen Gehör ausschliesslich Daten zur Gentoxizität, zu den *dechlorinated hydroxyl metabolites* SYN507900 und R611968 wurden gar keine Daten nachgereicht. Deshalb werden SYN507900 und R611968 weiterhin als relevant betrachtet. Die Vorbehalte bezüglich akuter Toxizität und Reproduktionstoxizität gegenüber einem *read-across* ausgehend von R182281 bestehen weiterhin.

Die Gruppierung der Metaboliten für den *read-across* wird in Abbildung 1 im Abschnitt 5.2 des Anhangs dargestellt. Im Abschnitt 5.3 des Anhangs werden toxikologische Daten zu Chlorothalonil und seinen Metaboliten zusammengefasst. Diese Angaben wurden für den *read-across* berücksichtigt.

4. Schlussfolgerungen und Zusammenfassung

Im *Peer-Review* der Risikobewertung im Rahmen der Bewilligungserneuerung von Chlorothalonil in der EU wurde vorgeschlagen, Chlorothalonil in die Kategorie 1B für karzinogene Wirkungen einzustufen. **Wird Chlorothalonil als Karzinogen der Kategorie 1B betrachtet, sind alle Grundwassermetaboliten von Chlorothalonil relevant, ungeachtet ihrer toxikologischen Eigenschaften.** Bis jetzt hat der EU-RMS NL bei der ECHA jedoch noch keinen Vorschlag zur Neubeurteilung der Einstufung und Kennzeichnung eingereicht.

Das BLV unterstützt die Einschätzung des *Peer Reviews* und sieht eine Einstufung in die **Kategorie 1B für karzinogene Wirkung als angemessen an.** Die EU-Kommission basiert ihren Entscheid, die Genehmigung von Chlorothalonil nicht mehr zu verlängern, u.a. auf die Einschätzung des *Peer Reviews*, dass Chlorothalonil in die Kategorie 1B für karzinogene Wirkungen eingestuft werden müsste (Europäische Kommission, 2019).

Wird der Leitfaden der Europäischen Kommission zur Relevanzbeurteilung von Grundwassermetaboliten (Europäische Kommission, 2003) angewendet und die momentan gültige Legaleinstufung von Chlorothalonil in die Kategorie 2 für karzinogene Wirkungen vorausgesetzt, und werden weiter die im Rahmen des rechtlichen Gehörs nachgereichten Daten berücksichtigt lässt sich Folgendes zusammenfassen:

R417888, R419492, R471811, und R611965 sind nicht relevante Metaboliten.

Aufgrund von Überlegungen zu strukturellen Ähnlichkeiten wurden R417888, R419492 und R471811 im *read-across* der Gruppe der *sulphonic acid pathway metabolites* eingeteilt. Wir gehen davon aus, dass diese Metaboliten ein ähnliches toxikologisches Profil aufweisen. Toxikologische Eigenschaften geprüfter Gruppenmitglieder können auf toxikologisch ungeprüfte Gruppenmitglieder übertragen werden. Aufgrund der ähnlichen Toxizität von in einer Beurteilungsgruppe zusammengefassten Metaboliten kann nicht zugelassen werden, dass jeder einzelne Metabolit davon bis zur maximal möglichen Konzentration von 10 µg/l im Grundwasser vorkommt. Da die drei Beurteilungsgruppen toxikologische Effekte in den ähnlichen Hauptzielorganen (Leber und Niere) hervorrufen, ist deren Exposition in der Summe zu beurteilen. **R417888, R419492, R471811 und R611965 dürfen deshalb in der Summe 10 µg/L im Grundwasser nicht überschreiten.**

Die Metaboliten **R418503, SYN507900, R611968, SYN548008, SYN548764, M2, M7 und M10 sind relevant.** Sie dürfen im Sinne des Zulassungsverfahrens Konzentrationen im Grundwasser von je **0.1 µg/L nicht überschreiten.**

R182281 ist ein toxikologisch relevanter Rückstand in/auf Lebensmitteln. Ein gentoxisches Potential kann für diesen Metaboliten auch unter Berücksichtigung des während des rechtlichen Gehörs eingereichten Comet-Assays nicht ausgeschlossen werden.

5. Anhang

5.1 Bibliographie

BLV, 2019: Relevanzprüfung der Grundwassermetaboliten im Rahmen der (teil-)gezielten Überprüfung der Produkte mit dem Wirkstoff Chlorothalonil, Juni 2019

ECHA (European Chemicals Agency). (2013). Grouping of substance and read-across approach, Part 1: Introductory note.

ECHA (European Chemicals Agency), (2017). Read-Across Assessment Framework (RAAF).

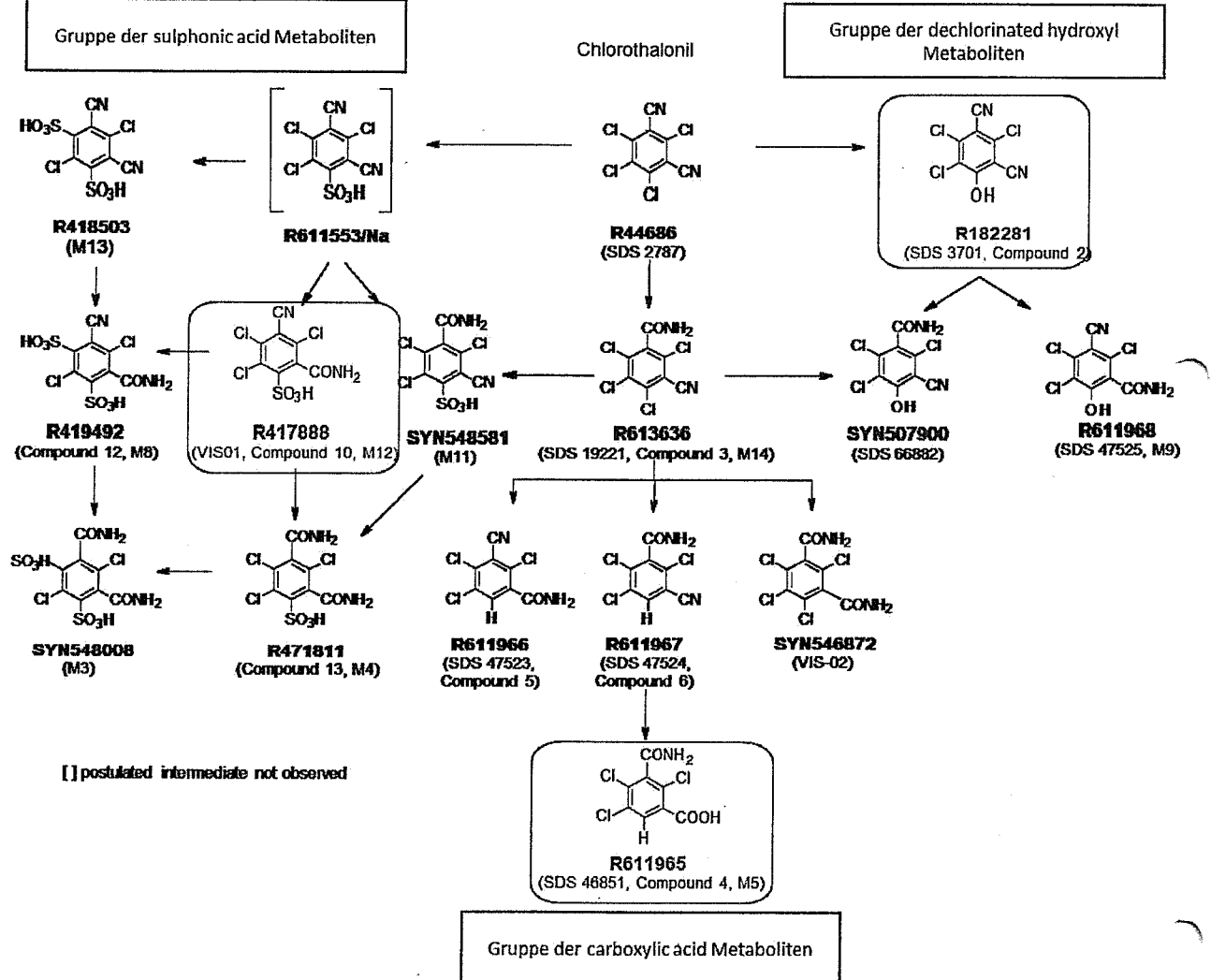
EFSA (European Food Safety Authority). (2018). Outcome of the pesticides peer review meeting on general recurring issues in mammalian toxicology. *EFSA Supporting Publications*, 15(9). doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1485

- EFSA, 2018: Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorothalonil; EFSA Journal 2018;16(1):5126
- Europäische Kommission, 2003: GUIDANCE DOCUMENT ON THE ASSESSMENT OF THE RELEVANCE OF METABOLITES IN GROUNDWATER OF SUBSTANCES REGULATED UNDER COUNCIL DIRECTIVE 91/414/EEC; Sanco/221/2000 –rev.10- final, 25 February 2003
- Europäische Kommission, 2019. Final Renewal report for the active substance chlorothalonil finalised in the Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed at its meeting on 22 March 2019 in view of the non-renewal of the approval of chlorothalonil as active substance in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009. SANTE/10186/2018 Rev 1
- Easterbrook, J., Lu, C., Sakai, Y., & Li, A. P. (2001). Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 29(2), 141-144.
- Hobbs, C.A. et al. 2015. Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Jul;786-788:172-81
- Levy, D. D., Zeiger, E., Escobar, P. A., Hakura, A., van der Leede, B.-j. M., Kato, M., Sugiyama, K.-i. (2019). Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test). *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 403074. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.004>
- Lorenzo, Y. et al. (2013). The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*. 2013 Jul;28(4):427-32.
- OECD. (1997). *Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test*.
- OECD. (1997). *Test No. 476: In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test*.
- OECD. (2010). *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*.
- OECD, 2016a: OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. *In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay*. Testguideline 489, adopted 29 July 2016
- OECD, 2016b: OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. *In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. Testguideline 487, adopted 29 July 2016
- OECD, 2016c: OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. *In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test*. Testguideline 473, adopted 29 July 2016
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). (2014). *Guidance on Grouping of Chemicals, Second Edition*. OECD Series on Testing and Assessment, No. 194. ENV/JM/MONO(2014)4.
- RAR, 2017. Revised Renewal Assessment Report (RAR) on chlorothalonil prepared by the rapporteur Member State the Netherlands in the framework of Commission Implementing Regulation (EU) No 844/2012, October 2017
- Williams, D. A. (1971). A Test for Differences between Treatment Means When Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. *Biometrics*, 27(1), 103-117. doi:10.2307/2528930
- Williams, D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. *Biometrics*, 28(2), 519-531. doi:10.2307/2556164

5.2 Gruppierung der Metaboliten für Read-across



Übersicht der Metabolisierung von Chlorothalonil im Boden. (vgl. Abbildung 1)

Abbildung 1 Gruppierung Chlorothalonil-Metaboliten für *read-across*






In Rot sind die Metaboliten aus der Metabolisierung von Chlorothalonil im Boden der *sulphonic acid* Gruppe eingefärbt, in Blau die Metaboliten der Gruppe der *dechlorinated hydroxyl* Metaboliten und in Violett die *carboxylic acid* Metaboliten.


5.3 Datenbasis für die Gruppierung der Metaboliten zwecks read-across Beurteilung


Name	Struktur	Leitsubstanz innerhalb einer Gruppe	Vorkommen	ADME Rate	Phys. Chem. Eigenschaften	Gentoxizität	Experimentelle und DEREK-vorhergesagte Toxizität und Schlussfolgerungen und Basis
Chlorothalonil			Boden, Wasser, Erntegüter, Ratte	Orale Absorption 20%	Log P = 2.94	<ul style="list-style-type: none"> - Bacteria reverse mutation assay (3 studies): negativ - Bacteria DNA-repair assay (differential killing; 1 study): positiv - Chromosome aberration assay (2 studies); positive -S9, 1 negativ +S9 (CHO cells) and 1 equivocal +S9 (human lymphocytes). - Forward-mutation assay (2 studies): negativ - Cell transformation test (1 study): negativ - Erythrocyte micronucleus test Rat (2 studies): negativ / Mouse (2 studies): negativ / Chinese hamster (1 study): negativ - Bone-marrow chromosome aberration test Rat (2 studies): negativ / Mouse (2 studies): negativ / Chinese hamster (3 studies): 2 negativ, 1 equivocal at single dosing and negativ at repeated dosing. <p>→ Gentoxisches Potential unwahrscheinlich</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Akut oral nicht toxisch → LD50 5000 mg/kg KG (Ratte/Mäuse) - Akut inhalativ toxisch Kat. 3 H330 und reizend H335 - Augenschädigend Kat. 1 H318. - Hautsensibilisierend Kat. 1A H317 - Ergebnisse aus den Kurz- und Langzeit sowie Reproduktions- und Entwicklungsstudien: →Karzinogen Kat. 1B Nierenadenome und Karzinome (ECHA momentan Kat. 2 H351) <p> ADI: 0.015 (SF von 1000) ARfD: 0.05 (SF von 100) AOEL: 0.003 (SF von 100 und 20 % orale Absorption) AAOEL: 0.01 SF von 100 und 20 % orale Absorption) </p>
R417888 (M12) 2-carbamoyl-3,5,6-		R417888	Boden, Erntegüter, Grundwasser, Ober-	Abdeckung über die	Aryl, Arylnalide, Benzami-	<ul style="list-style-type: none"> - Reverse mutation assay in bacteria → negativ - In vitro reverse mutation assay → negativ 	<ul style="list-style-type: none"> - 29 000-fach tiefere GSH-Reaktivität als Chlorothalonil. Deshalb wird angenommen, dass R417888 eine tiefere Nierentoxizität


Name	Struktur	Leitsub- stanz in- nerhalb einer Gruppe	Vorkommen	ADME Ratte	Phys. Chem. Eigen- schaften	Genotoxizität	Experimentelle und DEREK-vorhergesagte Toxizität und Schlussfolgerungen und Basis
trichloro-4- cyanoben- zene-1- sulfonic acid <chem>ClC1=C(C#N)C(C1)=C(Cl)C(S(=O)(O)=O)=C1C(N)=O</chem>			flächenge- wässer und Sedimente, Ratte	Mut- tersub- stanz Chloro- thalonil (ADME Studien) <10%. Daher toxikolo- gisch über Chloro- thalonil nicht ab- gedeckt.	de, Nitrile, Organic amide, Sulfonic acid LogP= - 1.17, LogKp=- 5.56	<ul style="list-style-type: none"> - In vitro reverse mutation assay → negativ - Salmonella Typhimurium and Escherichia Coli Reverse Mutation Assay → negativ - In vitro chromosome aberration study → negativ - In vitro chromosome aberration study → positiv (-S9), nega-tiv (+S9) - In vitro chromosome aberration study → positiv (-S9), negativ (+S9) - In vitro chromosome aberration test in human lymphocytes → unklar (-S9), negativ (+S9) - In vitro cell gene mutation assay with mouse lymphoma cells → negativ - In vitro cell gene mutation assay with mouse lymphoma cells → negativ (-S9), positive (+S9) - In vitro cell gene mutation assay with mouse lymphoma cells → negativ (-S9), unklar (+S9), - Cell Mutation Assay at the Thymidine Ki-nase Locus (TK +/-) in Mouse Lymphoma L5178Y Cells → negative - In vitro Mikronukleustes → negativ - Micronucleus test in mouse ->negativ be-treffend Klastogenität, Datenlücke betreffend Aneugenität - In vivo micronucleus test in mice → negativ betreffend Klastogenität, Datenlücke betref- 	<ul style="list-style-type: none"> und ein tieferes kanzerogenes Potenzial aufweist als Chlorohalonil. - Akut orale Toxizität (Ratte) → LD50 > 2000 mg/kg KG - Mehrere 90 - Tagestudien in der Ratte → NOAEL = 200 - DEREK alerts: <ul style="list-style-type: none"> - Karinogenität (116, Polyhalogenated aromatic)→ plausibel - Nierentoxizität (rapidprototype038 Aromatic nitrile)→ zweideutig - Hautsensibilisierung (415 activated benzene → kein alert - Alpha-2-mu-Globulin Nierentoxizität (264 Polyhalogenated benzene)→ kein alert - Photoallergenität (453 Halogenated aromatic compound)→ kein alert <p>→ Nicht relevant</p>



Name	Struktur	Leitsubstanz innerhalb einer Gruppe	Vorkommen	ADME Ratte	Phys. Chem. Eigenschaften	Gentoxizität	Experimentelle und DEREK-vorhergesagte Toxizität und Schlussfolgerungen und Basis
						fend Aneugenität - R417888 – Oral (Gavage) Proof of Exposure Study in the Mouse → 4 Stunden nach der Dosigabe konnte die Knochenmarkexposition indirekt über die Konzentration im Blut und im Plasma bestätigt werden - In vivo UDS test → negativ - In vivo Comet Assay: negativ → Gentoxisches Potential unwahrscheinlich	
R418503 (M13, R8, Compound 11, CSCA654600, SYN548708 (Na salt)) 2,5-dichloro-4,6-dicyanobenzene-1,3-disulfonic acid <chem>O=S(C1=C(C#N)C(Cl)=C(C#N)C(S(=O)(=O)=O)C1Cl)=O</chem>		R417888	Boden, Grundwasser, Oberflächengewässer und Sedimente	Im Säuremetabolismus in den ADME Studien zur Muttersubstanz Chlorothalonil nicht detektiert. Daher toxikologisch über Chloro-	Aryl, Arylhalide, Nitrile, Sulfonic acid LogP= -3.4, LogKp= -7.31	- Reverse mutation assay in bacteria → negativ - In vitro chromosome aberration assay → positiv - In vitro cell mutation assay → negativ - In vivo micronucleus test → negativ → Gentoxisches Potential unwahrscheinlich	- Keine Daten zur GSH-Reaktivität - DEREK alerts: - Karinogenität (116, Polyhalogenated aromatic) → plausibel - Nierentoxizität (rapidprototype038 Aromatic nitrile) → zweideutig - Hautsensibilisierung (415 activated benzene) → zweideutig → Relevant (Keine Informationen zur GSH-Reaktivität)


Name	Struktur	Leitsubstanz in einer Gruppe	Vorkommen	ADME Ratte	Phys. Chem. Eigenschaften	Genotoxizität	Experimentelle und DEREK-vorhergesagte Toxizität und Schlussfolgerungen und Basis
				thalonil nicht abgedeckt.			
R419492 R419492 (SYN548765, M8) 4-carbamoyl-2,5-dichloro-6-cyanobenzene-1,3-disulfonic acid O=S(C1=C(C#N)C(CI)=C(C(N)=O)C(S(=O)(O)=O)=C1C)O)=O		R417888	Boden, Grundwasser, Oberflächengewässer und Sedimente, Ratte	Abdeckung über die Muttersubstanz Chlorothalonil (ADME Studien) <10%. Daher toxikologisch über Chlorothalonil nicht abgedeckt.	Aryl, Arylhalide, Benzamide, Nitrile, Organic amide, Sulfonic acid LogP= -4.55, LogKp= -8.24	<ul style="list-style-type: none"> - Reverse mutation assay in bacteria → negativ - In vitro chromosome aberration assay → negativ - In vitro cell mutation assay in mouse lymphoma cells → negativ <p>→ Aussagekraft bezüglich Aneugentität limitiert. Ein gentoxisches Potential wurde im EFSA Peer Review als unwahrscheinlich beurteilt.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 1.4 x 10⁶-fach tiefere GSH-Reaktivität als Chlorothalonil - DEREK alerts: - Karinogenität (116, Polyhalogenated aromatic) → plausibel - Nierentoxizität (rapidprototype038 Aromatic nitrile) → zweideutig - Hautsensibilisierung (415 activated benzene) → kein alert <p>→ Nicht relevant</p>
R471811 (M4, R7, Compound 13, CSCA202566, SYN548766) Sodium 2,4-		R417888	Boden, Grundwasser, Oberflächengewässer und Sedimente	Im Säugermetabolismus in den ADME Studien zur Mut-	Aryl, Arylhalide, Benzamide, Organic amide, Sulfonic	<ul style="list-style-type: none"> - Reverse mutation assay in bacteria → negativ - In vitro chromosome aberration assay → negativ - In vitro cell mutation assay in mouse lymphoma cells → negativ 	<ul style="list-style-type: none"> - 3.3 x 10⁶-fach tiefere GSH-Reaktivität als Chlorothalonil - DEREK alerts: - Karinogenität (116, Polyhalogenated aromatic) → plausibel - Nierentoxizität (rapidprototype038 Aromatic nitrile) → kein alert

Name	Struktur	Leitsubstanz innerhalb einer Gruppe	Vorkommen	ADME Ratte	Phys. Chem. Eigenschaften	Gentoxizität	Experimentelle und DEREK-vorhergesagte Toxizität und Schlussfolgerungen und Basis
dicarbamoyl-3,5,6-trichlorobenzene-1-sulfonate <chem>O=S(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C(N)=O)C(Cl)=C1C(N)=O)([O-])[Na+]</chem>				tersubstanz Chlorothalonil nicht detektiert. Daher toxikologisch über Chlorothalonil nicht abgedeckt.	acid LogP= -3.47, LogKp= -7.3	→ Aussagekraft bezüglich Aneugenität limitiert. Ein gentoxisches Potential wurde im EFSA Peer Review als unwahrscheinlich beurteilt	- Hautsensibilisierung (415 activated benzene → kein alert) → Nicht relevant
SYN548581 (SYN548764, M11) 4-carbamoyl-2,3,5-trichloro-6-cyanobenzene-1-sulfonic acid <chem>C1c(C(N)=O)c(Cl)c(C#N)c(c1Cl)S(=O)(=O)O</chem>		R417888	Grundwasser, Oberflächengewässer und Sedimente	Im Säugermetabolismus in den ADME Studien zur Muttersubstanz Chlorothalonil nicht detektiert. Daher toxikolo-	Aryl, Arylhalide, Benzamide, Organic amide, Sulfonic acid LogP= -1.87, LogKp= -6.06	- Reverse mutation assay in bacteria → negativ - In vitro Mikronucleustest → negative (supportive) - In vitro cell mutation assay in mouse lymphoma cells → negative → Gentoxisches Potential unwahrscheinlich, kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden.	- 9000-fach tiefere GSH-Reaktivität als Chlorothalonil und R417888 3-fach tiefer als R417888 - DEREK alerts: - Karinogenität (116, Polyhalogenated aromatic) → plausibel - Nierentoxizität (rapidprototype038 Aromatic nitrile) → zweideutig - Hautsensibilisierung (415 activated benzene → kein alert) → Relevant (Gentoxisches Potential nicht gänzlich ausgeschlossen)

Name	Struktur	Leitsubstanz innerhalb einer Gruppe	Vorkommen	ADME Rats	Phys. Chem. Eigenschaften	Genotoxizität	Experimentelle und DEREK-vorgelegte Toxizität und Schlussfolgerungen und Basis
				gisch über Chlorothalonil nicht abgedeckt.			
SYN548008 (SYN548738 CSCY73582 2, M3) Sodium 2,4-dicarbamoyl-3,5,6-trichlorobenzene-1-sulfonate <chem>O=S(C1=C(Cl)C(Cl)=C(C(N)=O)C(Cl)=C1C(N)=O)([O-])[Na+]</chem>		R417888	Grundwasser, Oberflächengewässer und Sedimente	Im Säugermetabolismus in den ADME Studien zur Muttersubstanz Chlorothalonil nicht detektiert. Daher toxikologisch über Chlorothalonil nicht abgedeckt.	Aryl, Arylhalide, Benzamide, Organic amide, Sulfonic acid LogP= -6.15, LogKp= -9.48	<ul style="list-style-type: none"> - Reverse mutation assay in bacteria → negativ - In vitro chromosome aberration assay → negativ - In vitro cell mutation assay in mouse lymphoma cells → negativ <p>→ Aussagekraft bezüglich Aneugentität limitiert. Ein genotoxisches Potential wurde im EFSA Peer Review als unwahrscheinlich beurteilt.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 10200-fach tiefere GSH-Reaktivität als Chlorothalonil, 1470-fach höher als R611965 und 3-fach höher als R417888. - DEREK alerts: <ul style="list-style-type: none"> - Karinogenität (116, Polyhalogenated aromatic) → plausible - Nierentoxizität (rapidprototype038 Aromatic nitrile) → kein alert - Hautsensibilisierung (415 activated benzene → kein alert <p>→ Relevant (GSH-Reaktivität höher als bei R417888 und R611965)</p>

Name	Struktur	Leitsubstanz innerhalb einer Gruppe	Vorkommen	ADME Ratte	Phys. Chem. Eigenschaften	Gentoxizität	Experimentelle und DEREK-vorhergesagte Toxizität und Schlussfolgerungen und Basis
R182281		R182281	Boden, Erntegüter, Grundwasser, Oberflächengewässer, Sedimente, Ratten	Abdeckung über die Muttersubstanz Chlorothalonil (ADME Studien) <10%. Daher toxikologisch über Chlorothalonil nicht abgedeckt.	Aryl, Arylhalide, Nitrile, Phenol LogP= 2.87, LogKp= -2.19	<ul style="list-style-type: none"> - Bacteria reverse mutation assay: negative - Cell mutation assay (mouse lymphoma L5178Y cells): positive +/- S9 (at cytotoxic concentrations) - Gene mutation assay (Chinese hamster V79 cells): equivocal -S9, negative +S9 - Chromosome aberration assay (CHO cells): positive +/- S9. - In vivo mouse micronucleus study: negative - In vivo chromosome aberration test: negative - Dominant lethal test: negative - In vivo rat liver UDS study: negative - In vivo Comet: negative <p>→ Unklares Resultat. Ein gentoxisches Potential kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Keine Daten zu zur GSH-Reaktivität. - Langzeittoxizität Ratte, → NOAEL 3.0 mg/kg KG/Tag, keine Karzinogenität - Akute orale Toxizität → LD50: 50-300 mg/kg KG (Kat. 3. H301) - 90-Tagestudie Ratte → NOAEL 1 mg/kg KG/Tag - 1-Jahrestudie → NOAEL: 0.83 mg/kg KG/Tag - Reproduktiontoxizität Ratte: → NOAEL Entwicklung: 1.5 mg/kg KG/Tag - Entwicklungtoxizität Kaninchen: → NOAEL Muttertiere und Entwicklung 1 mg/kg KG/Tag. - Entwicklungtoxizität Ratte: → NOAEL: 5 mg/kg KG/Tag - DEREK alerts: <ul style="list-style-type: none"> - Karinogenität (116, Polyhalogenated aromatic) → plausibel - Nierentoxizität (rapidprototype038 Aromatic nitrile) → zweideutig - Hautsensibilisierung (415 activated benzene → plausibel - Alpha-2-mu-Globulin Nierentoxizität (264 Polyhalogenated benzene) → kein alert - Photoallergenität (453 Halogenated aromatic compound) → kein alert <p>→ Relevant (Gentoxisches Potential nicht</p>

Name	Struktur	Leitsubstanz innerhalb einer Gruppe	Vorkommen	ADME Ralte	Phys. Chem. Eigenschaften	Genotoxizität	Experimentelle und DEREK-vorhergesagte Toxizität und Schlussfolgerungen und Basis
							gänzlich ausgeschlossen, oral akut toxisch Kat. 3)
SYN507900 (SDS-66882, CSCC21032 3) 2,3,6-trichloro-5-cyano-4-hydroxybenzamide <chem>O=C(C1=C(C(C1)=C(C(C#N)=C1Cl)O)Cl)N</chem>		R182281	Boden, Grundwasser, Oberflächen-gewässer, Sedimente	Im Säur-germeta-bolismus in den ADME Studien zur Mut-tersubstanz Chloro-thalonil nicht de-tektiert. Daher toxikolo-gisch über Chloro-thalonil nicht ab-gedeckt.	Aryl, Aryl halide, Benzami-de, Nitrile, Organic amide, Phenol LogP= 0.57, LogKp= -3.93	<ul style="list-style-type: none"> - Reverse mutation assay in bacteria → negativ - <i>In vitro</i> chromosome aberration study → positiv - Cell mutation assay in mouse lymphoma cells → negativ - Mouse micronucleus test → negativ <p>→ Genotoxisches Potential unwahrscheinlich</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Keine Daten zur GSH-Reaktivität. - DEREK alerts: <ul style="list-style-type: none"> - Karinogenität (116, Polyhalogenated aromatic) → plausibel - Nierentoxizität (rapidprototype038 Aromatic nitrile) → zweideutig - Hautsensibilisierung (415 activated benzene) → kein alert - Alpha-2-mu-Globulin Nierentoxizität (264 Polyhalogenated benzene) → kein alert - Photoallergenität (453 Halogenated aromatic compound) → kein alert <p>→ Relevant (Keine Daten zur GSH-Reaktivität, kein Ausschluss einer möglichen akuten oralen Toxizität verglichen mit R182281)</p>
R611968 (M9, SDS-47525) 2,4,5-trichloro-3-cyano-6-hydroxy-		R182281	Erntegüter, Grundwasser,	Im Säur-germeta-bolismus in den ADME Studien	Aryl, Aryl halide, Benzami-de, Nitrile, Organic amide,	<ul style="list-style-type: none"> - Reverse mutation assay in bacteria → negativ - <i>In vitro</i> chromosome aberration assay → unklar - <i>In vitro</i> cell mutation assay in mouse lymphoma cells → negativ 	<ul style="list-style-type: none"> - 8 900-fach tiefere GSH Reaktivität als Chloro-thalonil - DEREK alerts: <ul style="list-style-type: none"> - Karinogenität (116, Polyhalogenated aromatic) → plausibel - Nierentoxizität (rapidprototype038 Ar-

Name	Struktur	Leitsubstanz innerhalb einer Gruppe	Vorkommen	ADME Ratte	Phys. Chem. Eigenschaften	Genotoxizität	Experimentelle und DEREK-vorhergesagte Toxizität und Schlussfolgerungen und Basis
benzamide <chem>O=C(N)C1=C(O)C(Cl)=C(Cl)C(C#N)=C1Cl</chem>				zur Muttersubstanz Chlorothalonil nicht detektiert. Daher toxikologisch über Chlorothalonil nicht abgedeckt.	Phenol LogP= 2.22, LogKp= -2.76	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vivo</i> micronucleus test in mice with R611968 → negativ → Genotoxisches Potential unwahrscheinlich 	<ul style="list-style-type: none"> omatic nitrile) → zweideutig - Hautsensibilisierung (415 activated benzene → plausibel - Alpha-2-mu-Globulin Nierentoxizität (264 Polyhalogenated benzene) → kein alert Photoalergenität (453 Halogenated aromatic compound) → kein alert → Relevant (Kein Ausschluss einer möglichen akuten oralen Toxizität verglichen mit R182281)
R611965 (SDS-46851, R14, M5, Compound 4) 3-carbamoyl-2,4,5-trichlorobenzoic acid <chem>O=C(O)C1=CC(Cl)=C(Cl)C(C(N)=O)=C1Cl</chem>			Boden, Erntegüter, Ratte, Grundwasser, Oberflächen-gewässer, Sedimente	Abdeckung über die Muttersubstanz Chlorothalonil (ADME Studien) <10%. Daher toxikologisch	Aryl, Arylhalide, Benzamide, Carboxylic acid, Organic amide, LogP= 0.68, LogKp= -3.87	<ul style="list-style-type: none"> - Reverse mutation assay in bacteria → negativ - <i>In vitro</i> cell mutation assay in mouse lymphoma cells → negativ - Micronucleus test in mouse → negativ - <i>In vivo</i> micronucleus test in mice → negativ - Bacterial reverse mutation assay (Ames) → negativ - Bacterial reverse mutation assay (Ames) → negativ - Cell mutation assay in mouse lymphoma L5178Y cells → negativ - UDS test with rat hepatocytes → negativ 	<ul style="list-style-type: none"> - 1.5 x 10⁷-fach tiefere GSH-Reaktivität als Chlorothalonil - Akut orale Toxizität → LD50 > 2000 mg/kg KG / > 5000 mg/kg KG - Nicht hautreizend (Kaninchen) - Kurzzeittoxizität (90 - Tagesstudie Hund) → NOAEL 50 mg/kg KG/Tag. - 90 - Tagesstudie Ratte → NOAEL 197 mg/kg KG/Tag - Langzeittoxizität Ratte → NOAEL 200 mg/kg KG/Tag - Reproduktionstoxizität Ratte → NOAEL Elterntiere 269 mg/kg KG/Tag; NOAEL Entwicklung und Reproduktion > 911 mg/kg

Name	Struktur	Leitsubstanz innerhalb einer Gruppe	Vorkommen	ADME Rate	Phys. Chem. Eigenschaften	Genotoxizität	Experimentelle und DEREK-vorhergegangene Toxizität und Schlussfolgerungen und Basis
				Über Chlorothalonil nicht abgedeckt.		<ul style="list-style-type: none"> - In vivo mouse micronucleus study → negativ → Genotoxisches Potential unwahrscheinlich 	<p>KG/Tag</p> <ul style="list-style-type: none"> - Teratogenität Kaninchen → NOAEL Muttertiere und Entwicklung < 250 mg/kg KG/Tag - Teratogenität Ratten → NOAEL Muttertiere und Entwicklung > 2000 mg/kg KG/Tag - DEREK alerts: <ul style="list-style-type: none"> - Karinogenität (116, Polyhalogenated aromatic) → plausibel - Nierentoxizität (rapidprototype038 Aromatic nitrile) → kein alertHautsensibilisierung (415 activated benzene → kein alert - Alpha-2-mu-Globulin Nierentoxizität (264 Polyhalogenated benzene) → zweideutigPhotoallergenität (453 Halogenated aromatic compound) → kein alert <p>ADI: 0.5 mg/kg KG/Tag (SF von 100) ARFD: 0.83 mg/kg KG (SF von 300)</p> <p>→ Nicht relevant</p>