

RELAZIONI STRUTTURA-ATTIVITÀ NELLO STUDIO DELLA CANCEROGENESI CHIMICA

Cecilia Bossa
Reparto di Cancrogesi Sperimentale e Computazionale

Riassunto

Il campo della cancerogenesi chimica ha visto una lunga serie di tentativi di creare modelli alternativi a quelli animali, dai saggi a breve termine di mutagenesi ai modelli teorici. Un posto particolare tra quelli teorici hanno i modelli basati sulle relazioni struttura-attività. Nella sua versione qualitativa, tale approccio ha portato alla identificazione di una varietà di sottostrutture, o gruppi funzionali legati all'induzione di mutazioni e/o cancro. Approcci più sofisticati sono le relazioni quantitative struttura-attività, che legano le proprietà tossicologiche delle molecole alle loro proprietà chimico fisiche o strutturali. Sia l'approccio qualitativo che quello quantitativo forniscono un valido contributo alla stima del rischio delle sostanze chimiche, soprattutto nella fase dell'identificazione di priorità.

Introduzione

Sotto l'acronimo (Q)SAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), si annoverano quei metodi che studiano le relazioni, qualitative o quantitative, tra le proprietà chimiche di una sostanza e la sua attività biologica. Il concetto e l'uso delle relazioni struttura-attività è diffuso nel campo della tossicologia già negli anni '80. Il riconoscimento che effetti tossici possono essere generati dall'interazione di un agente chimico con una o più biomolecole, ha portato la conoscenza della struttura o delle proprietà chimico-fisiche di una sostanza ad assumere un ruolo determinante nella comprensione della sua attività biologica.

In quest'ottica i metodi SAR, sia nel loro approccio qualitativo che quantitativo, forniscono un valido contributo per la valutazione del rischio posto da sostanze chimiche esistenti o di nuova produzione, assicurando una maggior convenienza in termini di risparmio di tempo e di costi e di benessere animale.

Negli ultimi anni, l'uso di modelli predittivi alternativi ai test sperimentali sugli animali, ha avuto un grande incremento in ambito regolatorio. Per esempio, nel nuovo sistema REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemical substances*) per la registrazione, valutazione e autorizzazione delle sostanze chimiche nell'Unione Europea, viene promosso l'uso di questi metodi, tra cui QSAR, per la predizione di proprietà chimico-fisiche e tossicologiche delle sostanze chimiche. La cancerogenesi chimica è tra le proprietà tossicologiche che richiedono la più alta attenzione. Per questo motivo è stata bersaglio di numerosi tentativi per creare modelli predittivi, che vanno dai saggi biologici a breve termine (es. i test di mutagenesi) ai modelli teorici.

La Figura 2 mostra i risultati dell'applicazione delle SA di Ashby a tre banche di dati non commerciali: i) un database contenente i dati di mutagenesi in Salmonella (4337 sostanze) collezionati da Kazius (Kazius *et al.*, 2005) a partire dal database Toxnet (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>); ii) il database ISSCAN (1153 sostanze), disponibile sul sito web dell'Istituto Superiore di Sanità (<http://www.iss.it/ampp/dati/cont.php?id=233&lang=1&tipo=7>); iii) il *Carcinogenic Potency database* (CPDB, 1547 sostanze), reperibile gratuitamente dal sito web DSSTox (<http://www.epa.gov/ncct/dsstox/index.html>). I database CPDB e ISSCAN riportano dati di mutagenesi in Salmonella e dati di cancerogenesi sui roditori, con un'ampia sovrapposizione delle sostanze in essi contenute. Nel grafico ROC (*Receiver Operating Characteristics*) viene riportata la percentuale dei veri positivi (sensibilità) sull'asse delle y, e la percentuale dei falsi positivi (1-specificità) sull'asse delle x. In un grafico ROC il risultato perfetto si colloca nell'angolo in alto a sinistra, mentre la diagonale rappresenta risultati casuali (Provost & Fawcett, 2001).

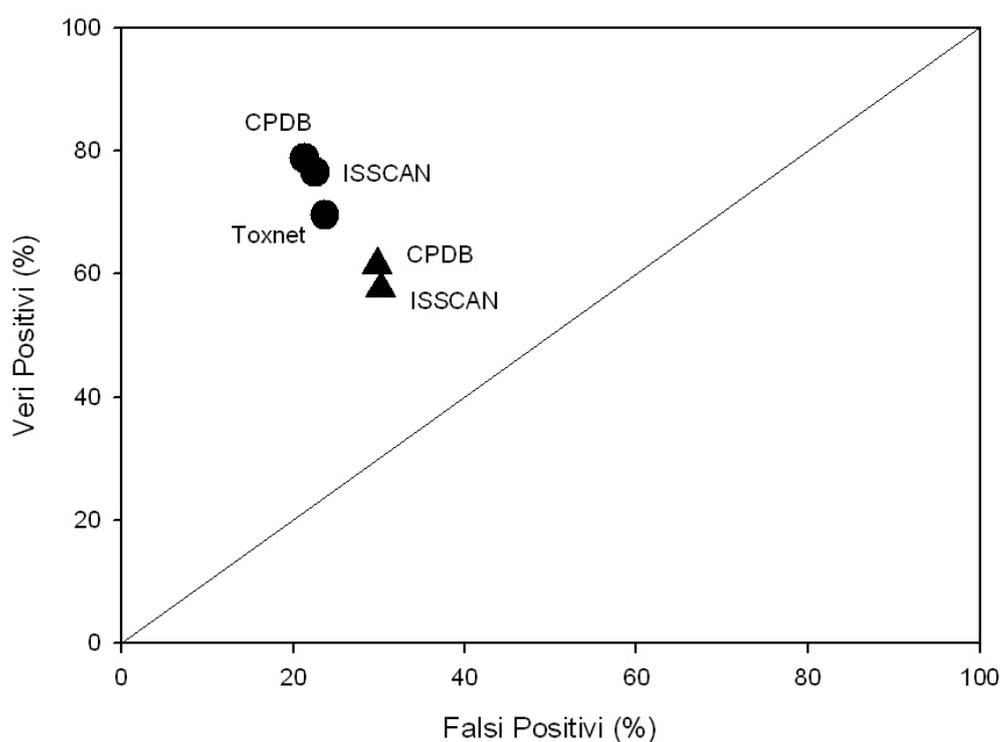


Figura 2. Accordo tra le Allerte Strutturali di Ashby e i dati di mutagenesi e cancerogenesi in vari database. Cerchi: mutagenesi; triangoli: cancerogenesi

Complessivamente l'accuratezza tra le SA di Ashby e la mutagenesi in Salmonella è tra il 73% e il 79%, mentre con la cancerogenesi nei roditori è inferiore di circa il 10%.

L'identificazione delle SA ha rappresentato un importante avanzamento scientifico, ed ha permesso, tra le altre cose, di progettare composti chimici più sicuri che non contengano SA conosciute.

L'uso delle SA è oggi molto sfruttato per la caratterizzazione "grana grossa" delle sostanze chimiche, e in particolare:

- nella identificazione di classi di sostanze;

- nella caratterizzazione preliminare del rischio;
- nella formazione di categorie (in ambito regolativo o per studi QSAR);
- nella definizione di priorità.

Modelli QSAR

Come abbiamo visto, le SA definiscono la potenzialità cancerogena o mutagena di una sostanza chimica che contenga una particolare sottostruttura reattiva.

L'approccio qualitativo delle SA ha, però, delle limitazioni, per esempio, non è possibile predire l'attività di sostanze con sottostrutture che non siano presenti nella lista di SA note. Inoltre, le SA permettono solo una limitata discriminazione all'interno di una stessa classe chimica.

Un approccio più raffinato che permette di ovviare a questi inconvenienti è dato dai metodi quantitativi QSAR. Le analisi QSAR si basano su un numero limitato di proprietà chimico-fisiche, che siano rilevanti per il processo studiato, e generano un modello matematico dei determinanti chimici dell'attività biologica. Le proprietà chimico-fisiche di interesse per l'attività biologica sono gli effetti idrofobici, elettronici e sterici (Hansch, 1991; Hansch, 1995).

Modelli QSAR sono stati generati per una serie di classi chimiche individuali (tra cui: ammine aromatiche, nitro aromatici, idrocarburi policiclici aromatici, ecc.). La maggior parte sono relativi alla mutagenesi in vitro, ma esistono anche alcuni QSAR per la cancerogenesi negli animali. I modelli QSAR per classi congeneriche di sostanze, derivati secondo l'approccio di Hansch (Hansch, 1995), forniscono i fattori chimico-fisici che determinano l'attività biologica di un composto, ed hanno dato un contributo notevole alla comprensione del meccanismo di cancerogenesi e mutagenesi.

Un importante campo di applicazione dei modelli QSAR è quello della valutazione del rischio delle sostanze chimiche. Una volta formulato, lo QSAR può essere infatti utilizzato per stimare l'attività incognita di altre sostanze, che non siano state impiegate nella derivazione del modello.

È importante notare che prima di usare un modello QSAR a scopi predittivi, la sua validità deve essere attentamente controllata.

L'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con il gruppo di Tossicologia Computazionale dell'*European Chemicals Bureau* ha effettuato una valutazione dei modelli QSAR non commerciali per la mutagenesi e la cancerogenesi (http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/QSAR/EUR_22772_EN.pdf). Quello che è emerso dall'analisi di modelli QSAR di "buona qualità" (OECD, 2004) è che, anche a partire da una buona statistica interna, il rendimento per quanto riguarda la predittività esterna può variare grandemente (Benigni, Bossa, 2008a). In particolare, modelli QSAR per la discriminazione tra sostanze attive e inattive, danno predizioni corrette per il 70%-100%, mentre modelli per la potenza di sostanze attive mostrano un'attendibilità molto inferiore.

Un sistema esperto per la predizione della tossicità

Recentemente l'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con l'*European Chemicals Bureau* di Ispra ha sviluppato un nuovo modello per la predizione dei mutageni e dei cancerogeni chimici, consistente di una lista aggiornata e migliorata di SA e di QSAR per alcune classi chimiche (Benigni & Bossa, 2008b). Questo modello è stato trasformato in un

modulo del sistema esperto Toxtree. Toxtree è disponibile liberamente sul sito: <http://ecb.jrc.it/qsar/qsartools/index.php?c=TOXTREE>. La base scientifica del nuovo modello è consultabile all'indirizzo: http://ecb.jrc.it/documents/QSAR/EUR_23241_EN.pdf.

Il funzionamento di Toxtree è volutamente semplice e richiede solo la conoscenza della struttura chimica della sostanza da studiare. Può essere applicato sia a una sostanza singola, sia a un gruppo di sostanze. Sono possibili varie risposte: a) non sono stati rilevati SA; b) la sostanza presenta SA per la cancerogenesi genotossica o non genotossica, e quindi è potenzialmente pericolosa; c) se la sostanza è una ammina aromatica o una aldeide $\alpha\beta$ -insatura, verrà applicato anche un modello QSAR per rendere più precisa la stima (Figura 3).

The screenshot shows the Toxtree v1.60 interface. The SMILES input is C1=CC=C(C=C1)C2=CC=C(C=C2)N. The structure diagram shows 4-aminobiphenyl. The Toxic Hazard panel displays the following alerts:

- Structural Alert for genotoxic carcinogenicity
- Structural Alert for nongenotoxic carcinogenicity
- No alerts for carcinogenic activity
- Potential *S. typhimurium* TA100 mutagen based on QSAR
- Unlikely to be a *S. typhimurium* TA100 mutagen based on QSAR
- Potential carcinogen based on QSAR
- Unlikely to be a carcinogen based on QSAR

The detailed explanation for the Bossa rulebase (for mutagenicity and carcinogenicity) includes:

- Acyl halides: No
- Alkyl (C<5) or benzyl ester of sulphonic o...: No
- N-methylol derivatives: No
- Monohaloalkene: No
- S or N mustard: No
- Propiolactones and propiosultones: No

Figura 3. Risultato dell'applicazione del sistema esperto Toxtree (versione 1.60) per predire la mutagenicità e la cancerogenicità di una sostanza chimica (4-amminobifenile): il sistema mette in guardia sulla presenza di una Allerta Strutturale per la cancerogenesi, per la potenziale mutagenicità in *Salmonella typhimurium* e per la potenziale cancerogenicità

Ovviamente le stime fornite da Toxtree sono indicative di potenziale tossicità e l'utente dovrà deciderne l'uso nell'ambito del particolare problema che sta affrontando, tenendo conto di ogni altra informazione disponibile. Gli usi e gli scopi possono quindi essere diversissimi.

Conclusioni

Attività a molti livelli convergono verso un maggiore uso dei metodi e concetti (Q)SAR per la prevenzione e regolamentazione del rischio chimico. In tal senso il REACH rappresenta un'innovazione notevole per l'UE, che dà conto di un atteggiamento mutato in tutto il mondo.

Al livello di grandi numeri di sostanze (es. definizione di priorità), l'uso attento di modelli (Q)SAR fornisce un supporto molto utile, contribuendo inoltre alla conoscenza dei meccanismi di interazione tra sostanze chimiche e organismi viventi. In questo contesto vi è spazio per ulteriore ricerca e miglioramenti. Ciononostante è bene ricordare che i modelli (Q)SAR non sostituiscono la sperimentazione animale ma forniscono un potente supporto scientifico. Citando le parole di Rainer Franke riguardo al ruolo di (Q)SAR nella ricerca farmaceutica, possiamo dire:

“... Essendo il processo di progettazione di un farmaco di natura molto complessa, esso richiede un'intera gamma di tecniche tra le quali i metodi QSAR giocano un ruolo importante. ... I metodi teorici hanno la capacità di *estrarre e sintetizzare informazioni dai dati per ottenere ipotesi che possono essere verificate sperimentalmente*. Nessuna scoperta improvvisa di un farmaco miracoloso, ma una *aumentata possibilità di successo dovuta a una serie di indicazioni* è un'aspettativa realistica...” (Franke, 2003).

Bibliografia

- Arcos JC, Argus MF. *Chemical induction of cancer*. New York: Academic Press; 1974.
- Ashby J, Tennant RW. Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested by the U.S.NCI/NTP. *Mutat Res* 1988;204:17-115.
- Benigni R, Bossa C. Predictivity of QSAR. *J Chem Inf Model* 2008a;48:971-80.
- Benigni R, Bossa C. Structure Alerts for carcinogenicity, and the Salmonella assay system: a novel insight through the chemical relational databases technology. *Mutat Res Revs* 2008b;659:248-261.
- Franke R, Gruska A. General introduction to QSAR. In: Benigni R (Ed.). *Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) models of mutagens and carcinogens*. Boca Raton: CRC Press; 2003. p. 1-40.
- Hansch C, Leo A. *Exploring QSAR. 1. Fundamentals and applications in chemistry and biology*. Washington, D.C.: American Chemical Society; 1995.
- Hansch C. Structure-activity relationships of chemical mutagens and carcinogens. *Scie Tot Environ* 1991;109/110:17-29.
- Kazius J, McGuire R, Bursi R. Derivation and Validation of Toxicophores for Mutagenicity Prediction. *J Med Chem* 2005;48:312-320.
- Miller EC, Miller JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer* 1981;47:1055-1064.
- OECD. *The Report from the Expert Group on (Quantitative) Structure Activity Relationship ([Q]SARs) on the Principles for the Validation of (Q)SARs*. Paris: OECD; 2004. (OECD Series on Testing and Assessment 49).
- Provost F, Fawcett T. Robust classification for imprecise environment. *Machine Learn J* 2001;42:5-11.
- Woo YT. Mechanisms of action of chemical carcinogens, and their role in Structure-Activity Relationships (SAR) analysis and risk assessment. In: Benigni R (Ed.). *Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) models of mutagens and carcinogens*. Boca Raton: CRC Press; 2003. p 41-80.