

# ÚVOD



ÚVOD ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY



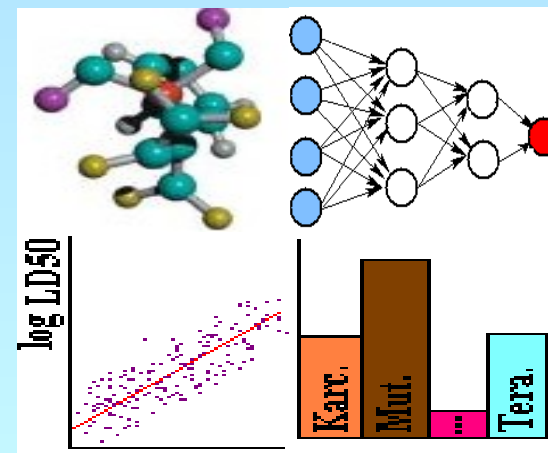
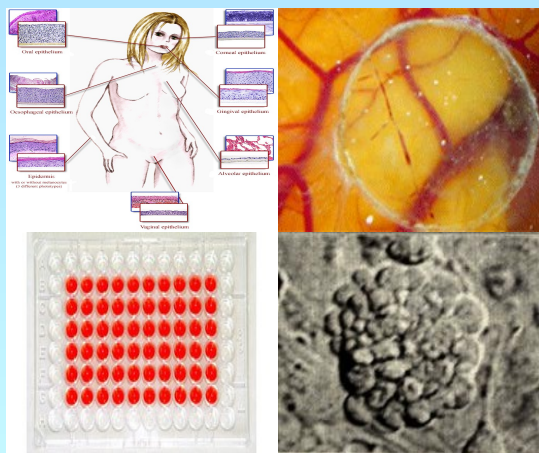
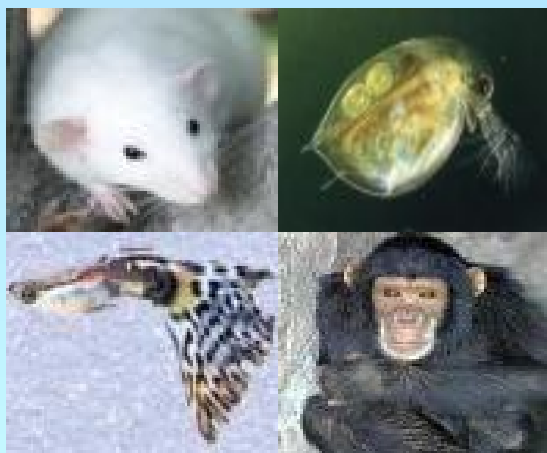
# Zkoušení nebezpečných vlastností

- Fyzikálně – chemické testy: (Rozdělovací koeficient, Bod tání, Tlak par, ...)
- Ekotoxikologické studie: (Účinky na organismy, Rozložitelnost, ...)
- Toxikologické studie: (Akutní / Chronická toxicita, Dráždivost, Mutagenita, ...)

*in – vivo*

*in – vitro*

*in – silico*

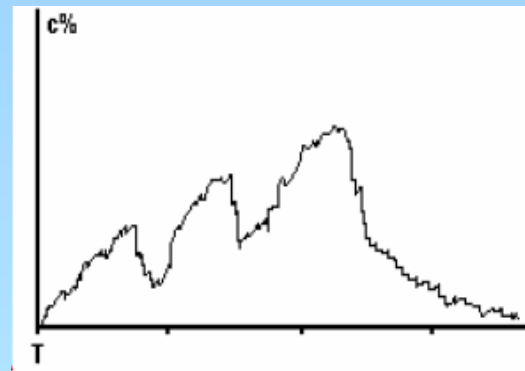
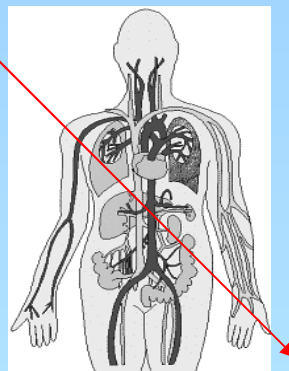
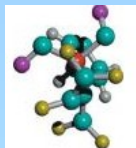
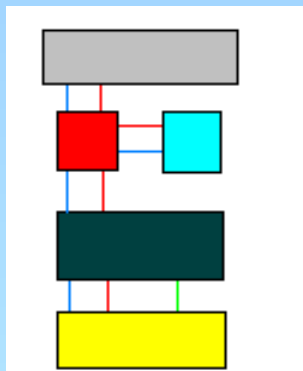
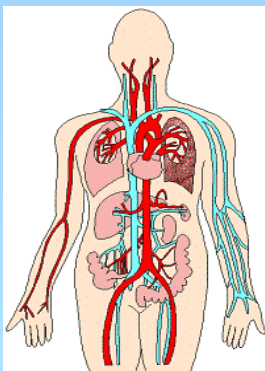


ÚVOD ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY



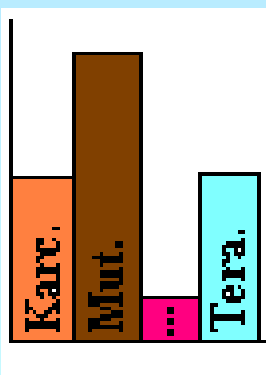
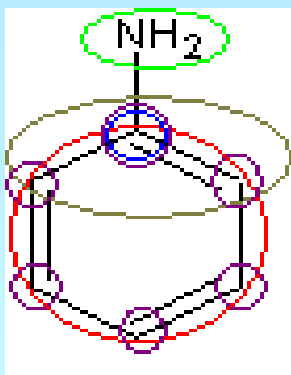
# Alternativní metody *in – silico*

## Počítačové modelování



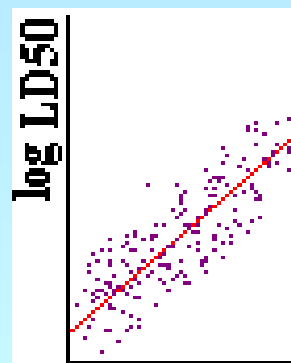
## Hodnocení podobnosti

- **Expertní (SAR)**

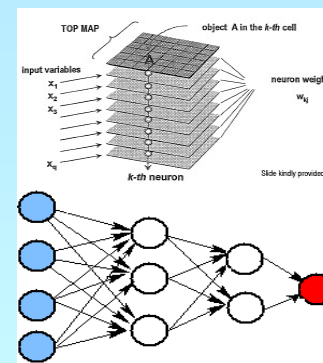


**NH<sub>2</sub>**  
**Benzen**  
**C=C-C=C**  
 ...  
 -----  
**Log P**  
**HOMO**  
 ...

- **QSAR**



- **Jiné**



**ÚVOD** ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY



# Trocha historie

- ~ 1860:

- Cros : Rozpustnost alkoholů ve vodě  $\longrightarrow$  jejich toxicita
- Crum a Brown : „Nemůže být žádná rozumná námitka...“ :  
 $Q = f(X)$

- ~ 1900:

- Mayer, Overton : „narkotický účinek spojen s přechody přes membrány“  $\Rightarrow$  korelace s *Polej-voda*
- Další autoři: různé korelace s fyz-chem vlastnostmi (povrchové napětí, bod varu,...)





# Trocha historie

• ~ 1950:

• Ferguson : termodynamika ( $\Delta G, \mu$ )  $\longrightarrow$   **$\log C = a * \log X + b$**

• Hanch :  $\Delta G = \Delta G_{\text{hydrofilní}}, \Delta G_{\text{elektronová}}, \Delta G_{\text{sterická}}, \Delta G_{\text{křížová}}$

$\Rightarrow$  **multiparametrická regrese**

• Rekker a Nys :  **$\log P = \Sigma f_i$**

• Free, Wilson :  **$Q = \Sigma a_n + a_0$**





# Trocha historie

• ~ 2000:

- **SMILES**
- Vývoj (uživatelského) **software** (např.: EPI Suite by US EPA)
- **Legislativní „uznávání“** (již i součást některých metodik)
- **Harmonizace postupů** zavádění a validace (OECD, EU)
- Součást strategie hodnocení v rámci nařízení **REACH**





# OECD

- ~ 1990: US EPA vydává freeware EPI Suite  
=> několik OECD monografií o možnostech legislativního využití
- ~ 2002: Systematická činnost OECD
  - Aktivity k vymezení rámce legislativního využitelnosti (Q)SAR
  - Definice *Setubalských principů*
  - Ustavení expertních skupin a vytyčení plánu:
    - i) Validace stávajících systémů
    - ii) Vytvoření příručky (*guidance*) pro vývoj, validaci a leg. použití
    - iii) Určení použitelného přístupu ke zveřejnění a zpřístupnění (Q)SAR modelů, databáze akceptovaných modelů





# OECD

• k 2008:

- i) Validace několika modelů, hodnocení přístupu a *Setubalských pr.*
  - ii) *Guidance document on the validation of (Q)SAR models (2007)*
  - iii) *OECD (Q)SAR TOOLBOX (2008)*
- 

+ **OECD metodiky pro zkoušení fyz-chem:**

- „..., the **partition coefficient** of the test substance may be estimated **preferably** by using a calculation method...“

- „..., **vapour pressure** can also be estimated and a recommended estimation **method is set out in the Annex.**“



**ÚVOD** ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY





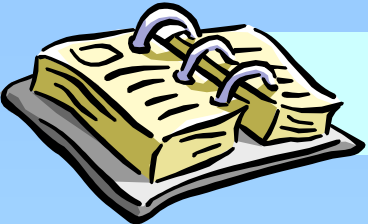
# EU

- *The Computational Toxicology Group:*
  - **Toxtree** : hodnocení „nebezpečnosti“ chemikálie rozhodovacím stromem
  - **Toxmatch** : porovnávání molekul za účelem seskupování a aplikace *read-across*
  - **DART** : kategorizace a uspořádání dat podle více než jedné proměnné.  
Vzhledem k jejich tox. či ekotox. účinku podle různých vlastností těchto látek.
  - **Danish (Q)SAR Database** : databáze (Q)SAR odhadů asi 150 000 látek.
  - **ECB Inventory of (Q)SAR Models** : databáze informací o dostupných modelech.  
Navržen standardizovaný elektronický formulář (*QMRF*) o popisovaném.

<http://ecb.jrc.it/qsar/>



ÚVOD ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY

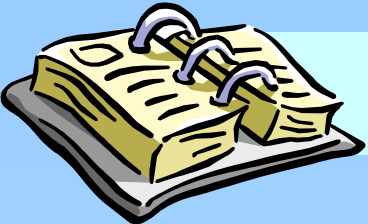


# REACH

- „... může komise předložit legislativní **návrhy na změnu požadavků** ... například **s ohledem na** alternativní zkoušky a (kvantitativní) vztahy mezi strukturou a aktivitou (**(Q)SAR**).“ (čl. 138, Přezkum)
- „... **Žadatel o registraci by měl shromáždit** veškeré existující dostupné údaje o zkouškách látky, která má být registrována, ... **informace z** alternativních zdrojů (např. údaje z **(Q)SAR**, ...), ... které mohou v některých případech nahradit výsledky zkoušek na zvířatech.“ (příloha VI, KROK 1 – SHROMAŽĎOVÁNÍ A ... INFORMACÍ)
- „...**Před provedením nových zkoušek** k určení vlastností uvedených v této příloze **se nejprve posoudí** ..., údaje z platných **(Q)SAR** a údaje odvozené ze strukturně příbuzných látek (analogický přístup).“ (přílohy VII – IX, POŽADAVKY... , všechny tonáže)



**ÚVOD** ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY



# REACH

- Výsledky získané z platných ... ((Q)SAR) mohou naznačovat přítomnost nebo nepřítomnost určité nebezpečné vlastnosti. **Výsledky (Q)SAR lze použít místo zkoušek, pokud jsou splněny tyto podmínky:**
  - výsledky jsou odvozeny z modelu (Q)SAR, jehož vědecká platnost byla potvrzena
  - látka spadá do oblasti použitelnosti modelu (Q)SAR,
  - výsledky jsou přiměřené pro účely klasifikace a označování nebo posouzení rizika
  - je poskytnuta přiměřená a spolehlivá dokumentace použité metody.  
(příloha XI : ZKOUŠKY SE NEJEVÍ VĚDECKY NEZBYTNÉ)



# PRINCIPY



ÚVOD ,**PRINCIPY** ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY



**STOP!**

**Anorganice**

**Organickým solím**

**Kovalentně vázaným kovům, komplexům**

**Směsím**



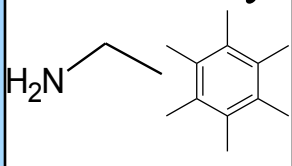
ÚVOD ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY



# Expertní (SAR) vs.

# QSAR

## Toxikofory



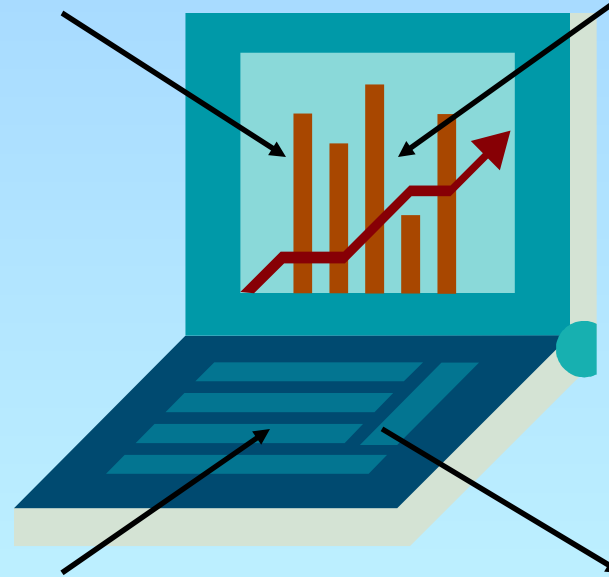
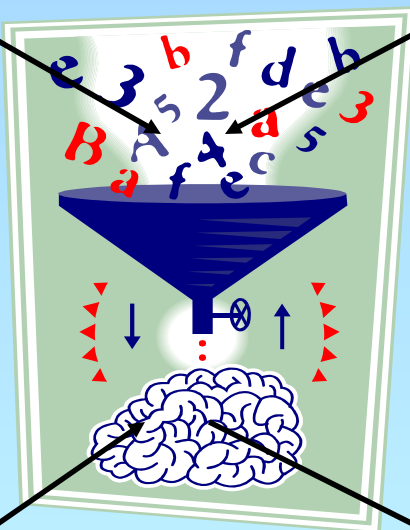
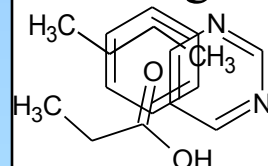
## Znalosti

Rešerše...  
Zkušenosti...

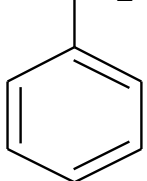
## Model

$$\log A = \sum a_i Q_i$$

## Training set

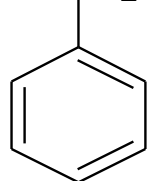


NH<sub>2</sub>



Látka  
pravděpodobně  
dráždí oko

NH<sub>2</sub>

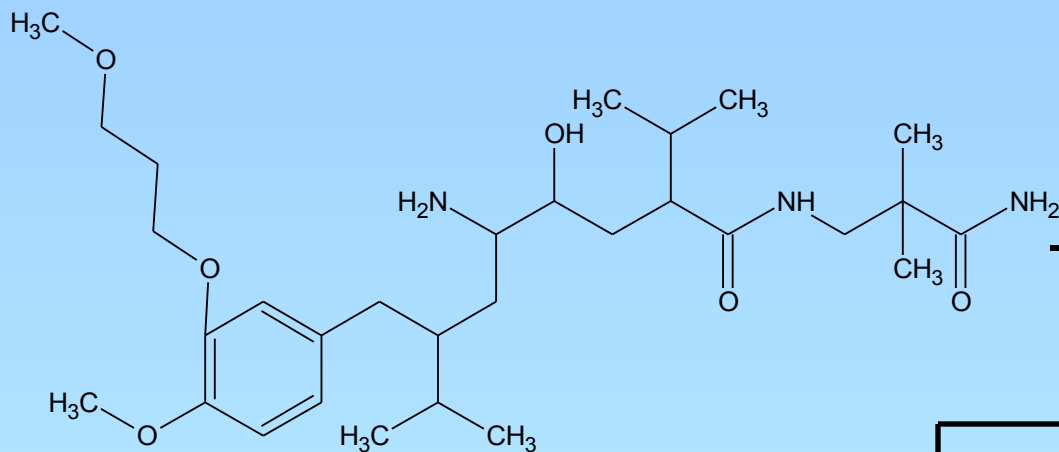


Rat Oral  
LD50 (mg/kg)  
169 – 1 900





# kód SMILES



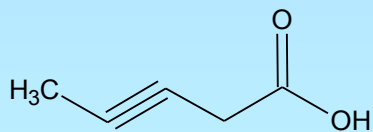
ACD/ChemSketch Freeware - [noname01.sk2]

File Edit Pages Tools Templates Options Documents ACD/Labs Help

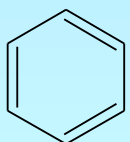
Structure Draw

- Clean Structure Ctrl+Shift+S
- Check Tautomeric Forms Ctrl+Shift+T
- 3D Structure Optimization Ctrl+Shift+3
- Show Aromaticity Ctrl+Shift+A
- Hide Aromaticity Ctrl+Shift+H
- Expand Shorthand Formulae Ctrl+Shift+F
- Remove Explicit Hydrogens Ctrl+Shift+R
- Bring Bond(s) to Front Ctrl+F
- Send Bond(s) to Back Ctrl+K
- Auto Renumbering Ctrl+Shift+N
- Clear Numbering Ctrl+Shift+L
- Generate Name from Structure Ctrl+Shift+I
- Generate SMILES Notation**
- Generate Structure from SMILES
- Calculate

c1(cc(c(cc1)OC)OCCOC)CC(C(C)C)CC(N)C(CC(C(C)C)C(NCC(C(N)=O)(C)C)=O)O



CC#CCC(=O)O



c1ccccc1

EPI v3.12

File Edit Functions BatchMode Sh

PhysProp Previous G

Enter SMILES:



Structure

File Edit Structure Help

MolWt: 78.11 C6H6



ÚVOD ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY



# Endpoint

- Jasně definovaný (toxikologický, ...) účinek, který má být hodnocen
  - Výstup (Q)SAR modelu
- 



Toxicita pro dafnie



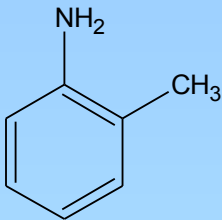
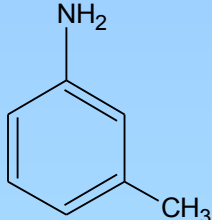
**Daphnia magna, acute immobilisation, EC50, 48h**





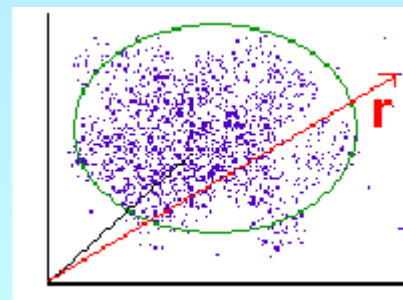
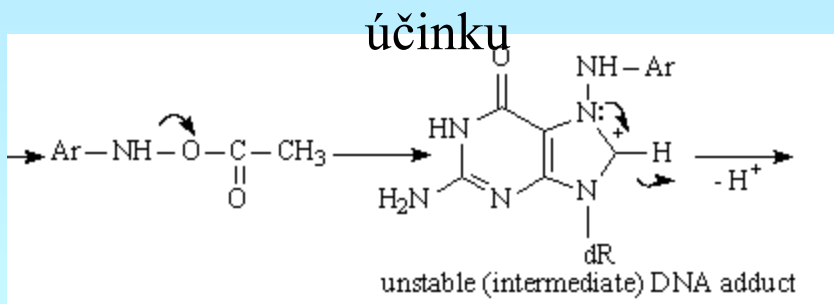


# Podobnost, „Applicability Domain“

		
SMILES (CAS#)	<chem>Nc1c(C)cccc1</chem> (95-53-4)	<chem>Nc1cc(C)ccc1</chem> (95-53-4)
MUTAGENITA KARCINOGENITA	AMES : pos Rodent : pos, věta R45	AMES : neg Rodent : neg, <del>věta R45</del>
log P, rozpustnost (kg/L)	1.9 , 17	1.4 , 15
MP/BP(°C), VP(mmHg)	-14 / 208°C , 0.20	-31 / 203 , 0.30

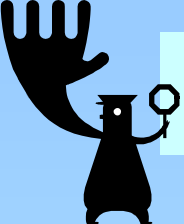
SAR : Mechanismus

QSAR : „Applicability domain“



ÚVOD ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY





# Použitelnost modelu

OECD principles

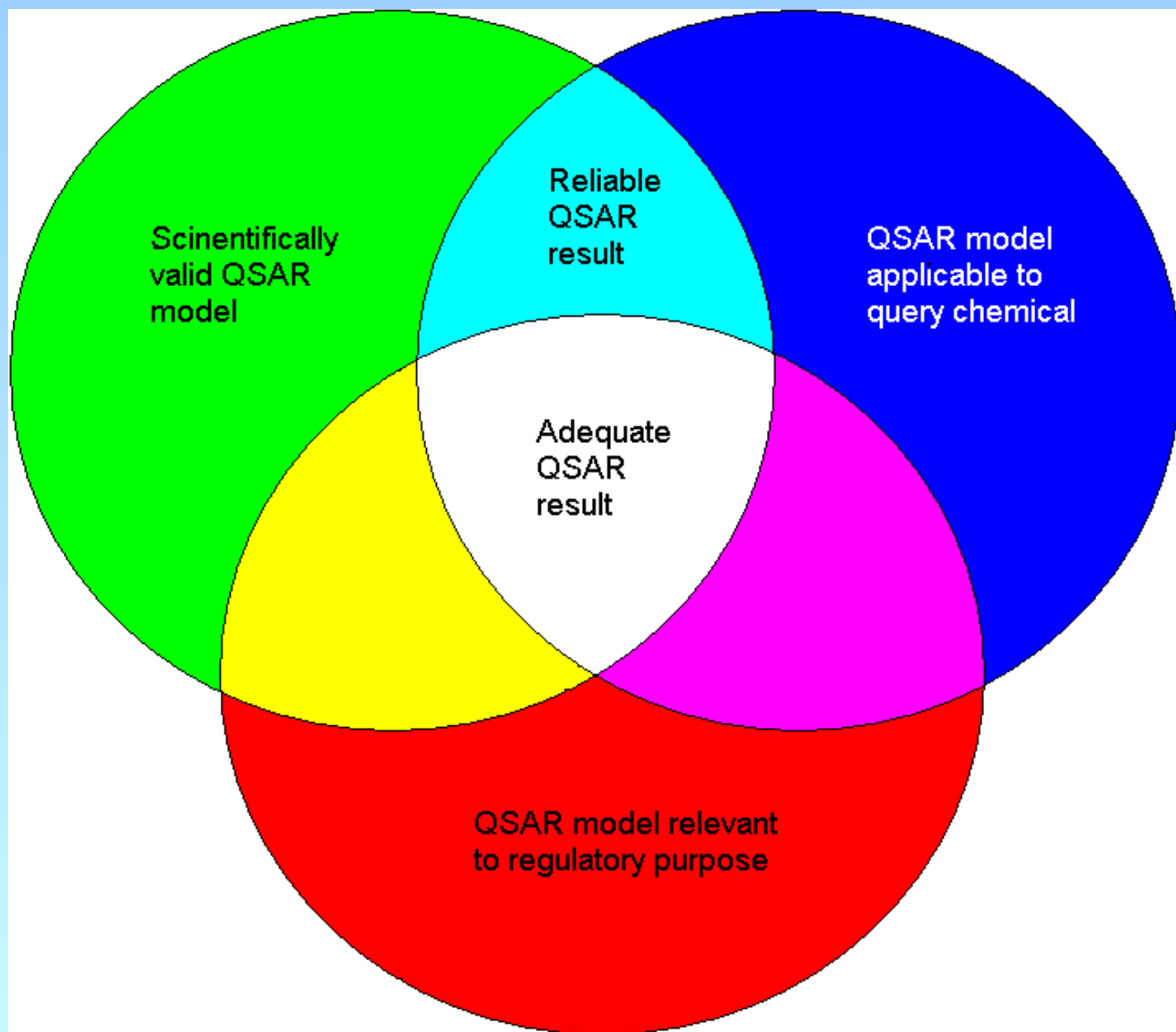
---

Scientific validity  
=  
relevance & reliability

REACH

---

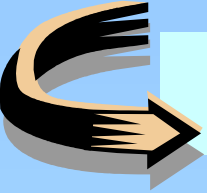
Adequacy  
=  
validity + regulatory r.



# UKÁZKY



ÚVOD ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY



# Základní možná použití (Q)SAR analýzy

- a) Výběr látek k přednostnímu testování
- b) **Předběžné zkoušky, výběr testovací strategie**
- c) Získání lepší informace o existujících datech
- d) Získání mechanistické interpretace zjištěných výsledků
- e) Získání nové informace pro hodnocení nebezpečí a rizika
- f) **Získání nové informace pro klasifikaci a označování \*)**
- g) Získání nové informace pro odhad PBT a vPvB

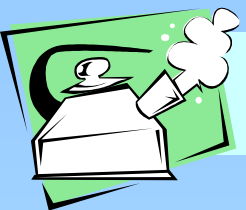
a) – d) **Obecné použití**

e) – g) **REACH-specifické použití**

**červené Využíváme na našem pracovišti**

\*) využíváme výjimečně, pokud test není technicky proveditelný





# VP dle metodiky OECD

## CALCULATION PROCEDURE – VAPOUR PRESSURE

According to (b) the vapour pressure is calculated as follows:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b RT_b} \left[ 1 - \frac{\left(3 - 2 \frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m \left(3 - 2 \frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b} \right]$$

where:

$P_{vp}$  = vapour pressure at temperature T

T = temperature of interest

$\Delta H_{vb}$  = heat of vaporization

m = empirical factor depending on the physical state at the temperature of interest

$T_b$  = normal boiling point

$\Delta Z_b$  = compressibility factor (estimated at 0,97)

Further

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F (8.75 + R \ln T_b)$$

where  $K_F$  is an empirical factor considering the polarity of the substance.

For several compound types,  $K_F$  factors are listed in reference (b).



ÚVOD ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY



# BP dle metodiky OECD

## CALCULATION PROCEDURE – BOILING POINT

According to (b) the boiling point is calculated as follows:

$$T_b = \Theta T_C \quad \Theta = 0.567 + \sum \Delta T - (\sum \Delta T)^2 \quad T_C = \frac{\exp(\beta)}{R}$$
$$\beta = \frac{(\Omega - 0.048) \ln(V_C) + \Omega \ln(P_C) + 1.255}{\Omega} \quad \Omega = (1 - \Theta)^{2/7} \quad V_C = 40 + \sum \Delta V \quad P_C = \frac{M}{(0.34 + \sum \Delta P)^2}$$

where:

$T_b$  = boiling point

$M$  = molecular weight

$R$  = universal gas constant

$\Delta P$  and  $\Delta V$  resp.  $\Delta T$  are contributors given in tables 12-12 resp. 12-6 of the 'Handbook' (b). The respective sums can be calculated manually, considering the relevant atoms, bonds and function groups of the molecule as described in detail in the 'Handbook' (b).

---

## LITERATURE

(a) K.M. Watson, Ind. Eng. Chem; 1943, vol. 35, 398.

(b) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt. Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, 1982.





# Ukázka tabulky pro výpočet VP

látka	Pvp Pa	Pvp mm Hg	Pvp atm	Tb (BP) K	T K	m -	Kf (0,97-1, -	R cal/mol.K	ln Pvp -	T/Tb -
benzen	7824,104	58,68561	0,077218	353,1	293	0,8	1		-2,56112	0,829793
DDT	2,57E-05	1,93E-07	2,54E-10	613,0	293	1,19	1,05		-22,0952	0,477977

Watson Vzorec z metodiky A.4, OECD 104

když pak m je

T/Tb > 0,6	0,36
0,6 > T/Tb > 0,5	0,8
T/Tb < 0,5	1,19
kapaliny	0,19
podm.	

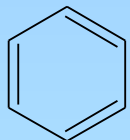
$$\begin{aligned} &= \\ &H11 * (8,75 + S1S8 * LN(E11)) / 0,97 / S1S8 * \\ &( \\ &1 - POWER(3 - 2 * F11 / E11; G11) / F11 * E11 - \\ &2 * G11 * POWER(3 - 2 * F11 / E11; G11 - 1) * LN(F11 / E11) \\ &) \end{aligned}$$



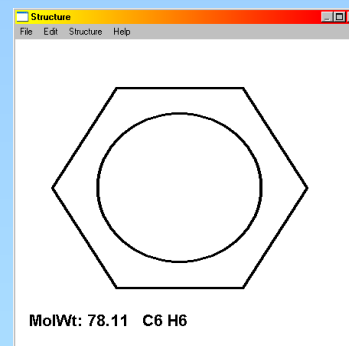
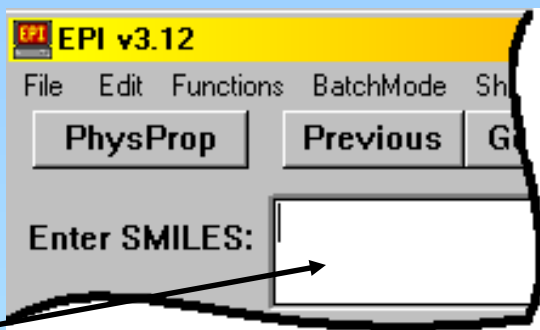




# Výpočet VP a BP v EPI SUITE



c1ccccc1



The Estimation Programs Interface (EPI) Suite™ was developed by the US Environmental Protection Agency's Office of Pollution Prevention and Toxics and Syracuse Research Corporation (SRC). It is a screening-level tool and cannot be used for all chemical substances. Like other tools, it is intended for use in screening level applications such as to quickly screen chemical release potential, and "bin" chemicals by priority for future work. Estimated values should not be used when experimental (measured) values are available.

Important information on the performance, development and application of the individual estimation programs within EPI Suite™ is included in the User's Guide.

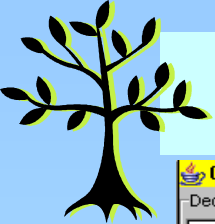
© 2000-2007 United States Environmental Protection Agency for EPI Suite™ and component programs except BioHCWIN and KOAWIN.

TYPE	NUM	BOIL DESCRIPTION	COEFF	VALUE
Group	6	CH (aromatic)	28.53	171.18
*		Equation Constant		198.18
RESULT-uncorr		BOILING POINT in deg Kelvin		369.36
RESULT- corr		BOILING POINT in deg Kelvin		375.40
		BOILING POINT in deg C		102.24

TYPE	NUM	MELT DESCRIPTION	COEFF	VALUE
Group	6	CH (aromatic)	8.13	48.78
*		Equation Constant		122.50
RESULT		MELTING POINT in deg Kelvin		171.28
		MELTING POINT in deg C		-101.88



ÚVOD ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY



# ToxTree

**Cramer rules** - Decision Tree

**Decision node:** Q1. Normal constituent of the body

**If 'NO' go to** Q.2  
**If 'YES' assign** Low (Class I)

Rule ID	Rule title
1	Normal constituent of the body

**Rule explanation**

Returns true if the query is isomorphic to one of the structures loaded from a preconfigured file of a type SDF, SMI, CSV

Is the substance a normal constituent of the body, or an optical isomer of such? This question throws into class I all normal constituents of body tissues and fluids, including normal metabolites. Hormones are excluded, as are, by implication, the metabolites of environmental and food contaminants or those resulting from disease state.

There are example molecules for each rule outcome. Select which one to display.

Yes branch  No branch

**Example with answer 'YES'**

NC1=CC(=O)NC=C1

# VÝSLEDKY



ÚVOD ,PRINCIPY ,UKÁZKY ,VÝSLEDKY

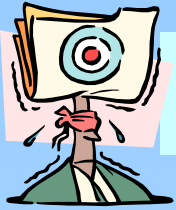


# Vliv různých faktorů na spolehlivost

Software	Vše	MW < 350	Modifikace
ACD I-lab	66%	75%	--- (málo látek)
EPI SUITE	55%	66%	Nesprávné
TOPKAT (vše)	44%	50%	Nesprávné
TOPKAT ( v OPS)	53%	61%	Nesprávné

Výpočet log P různým software a za různých podmínek





# Úspěšnost predikce různých *endpoints*

Software	Log P	Daph LC50	Sens. Kůže
<b>ACD I-lab</b>	75%	--- (není model)	--- (není model)
<b>EPI SUITE</b>	66%	33%	--- (není model)
<b>TOPKAT (v OPS)</b>	61%	71%	70%

