ABIHPEC
Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

WEBINAR

Métodos Alternativos ao uso de animais para indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

Altox
ALTERNATIVE TOXICOLOGY

Modelos *in silico* e integração de AOPs na avaliação de ingredientes cosméticos com fins regulatórios

São Paulo

2023

Overview

- **Sobre nós e nossos trabalhos**
- **Entendendo os modelos *in silico* e alguns inteligência artificial**
- **Contexto regulatório: guias e exemplos de recomendação legal de modelos *in silico***
- **Exemplos de aplicação: AOPs / NGRA / IATA / Defined Approaches**

Sobre a Altox

Fundada em **2012** e localizada na Av. Vital Brasil, 305 – Butantã, São Saulo – SP.

- Mais de **70 clientes** atendidos e inúmeros projetos de sucesso
- Pioneira nos modelos *in silico* no Brasil com fins regulatórios

Parceiro estratégico e renomado para softwares e avaliações *in silico* de segurança

Responsável pela **primeira plataforma brasileira de modelos *in silico*** validados com fins regulatórios do Brasil e América Latina, em projeto financiado pela FAPESP, a Is-Tox Platform.

Premiações de inovação e pesquisa em congressos e associações acadêmicas.

Softwares e projetos de pesquisa e inovação

- 1ª plataforma de modelos QSAR *in silico* do Brasil e América Latina → Real time

Contaminantes
Soluções em avaliação toxicológica de impurezas e contaminantes

Cosméticos
Estudos sem o uso de animais e com base na estrutura química

Novas Moléculas
Soluções em avaliação toxicológica de novas moléculas e ingredientes

Medicamentos
Soluções desenhadas para atender às legislações específicas

Agroquímicos
Relatórios de avaliação de toxicidade impurezas para IBAMA, MAPA e ANVISA

Alimentos
Avaliação toxicológica dos potenciais contaminantes neoformados (NFCs)

iS Tox Platform™
Machine-learning models for a new toxicology

IrriTest™ Pred-Oral™ Genotox-iS™

AOP-Sens™ iS-Liver™ Pred-CYP22D™

iS-Ocular™ Acute-Tox™ DevTox-iS™

BCF-Test™ Pred-Ecotox™

iS-Purge

Degradation Plot
Prediction of degradation products and pathways

NitroRisk
Risk Assessment for N-nitrosamines formation

Prioritizer
Ranking of priority for nitrosamines risk assessment of drug substances

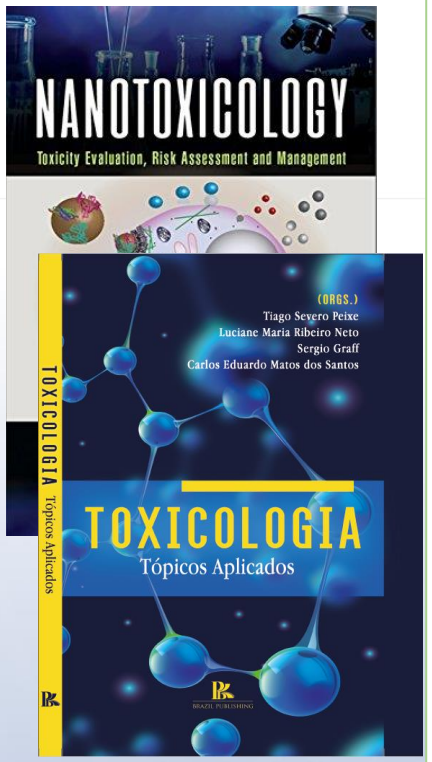
Altox
ALTERNATIVE TOXICOLOGY

eurofarma

Projeto financiado:
FAPESP
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

https://is-tox.com/our-models

ALGUMAS PUBLICAÇÕES



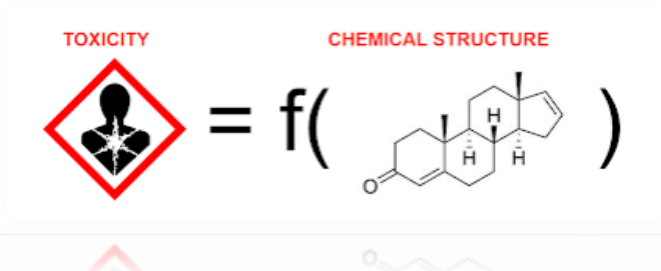
https://altox.com.br/publicacoes/

Modelos *in silico*

Fundamentos

O que são modelos *in silico*?

- Uma das **NAMs (New Approach Methodologies)** baseadas em uso de softwares / modelos computacionais

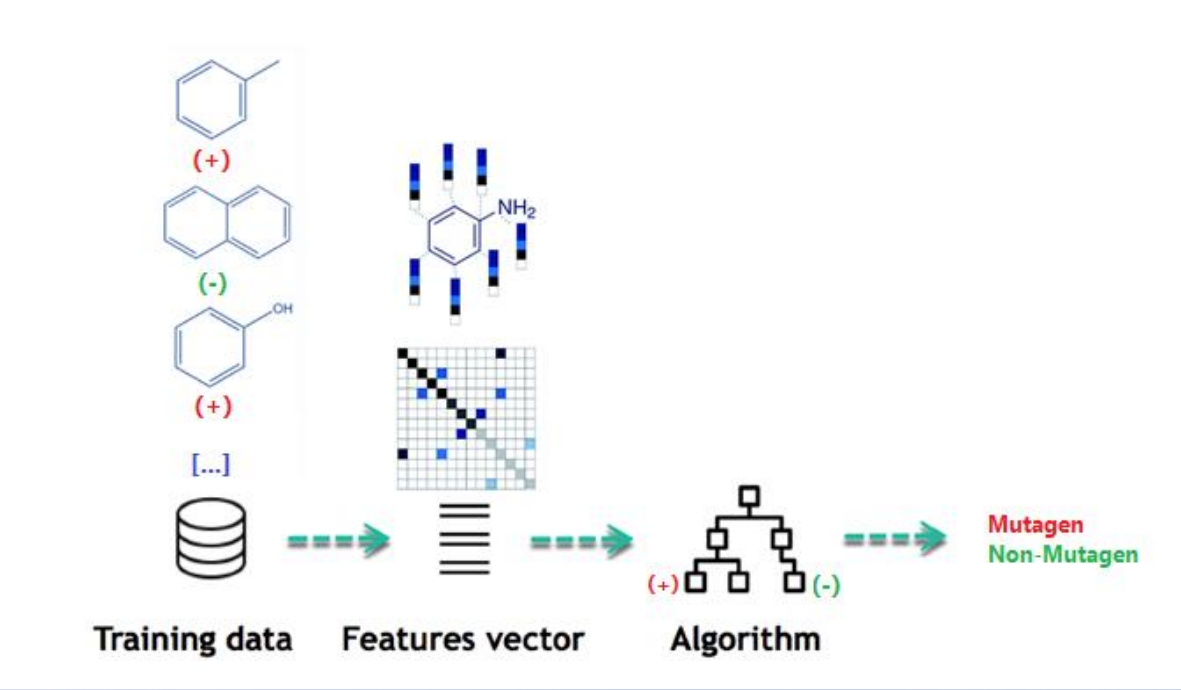


-SAR – Relações Estrutura –atividade
-QSAR – Relações Quantitativas entre Estrutura e Atividade
-(Q)SAR – Referido-se a ambos, SAR e QSAR!

- Métodos de extrapolação e interpolação baseada em similaridade estrutural ou mecanicista (Read-across, análise de tendência, formação de categorias e outros)
- Inteligência Artificial e algoritmos de machine learning (RF, redes neurais, kNN, SVM, Deep Learning etc.)

Como predizer o potencial de toxicidade?

- Dados prévios-> Identificação de padrões (relação estrutura-atividade)
- Criação de algoritmos → Predições



Critérios de validação da OECD

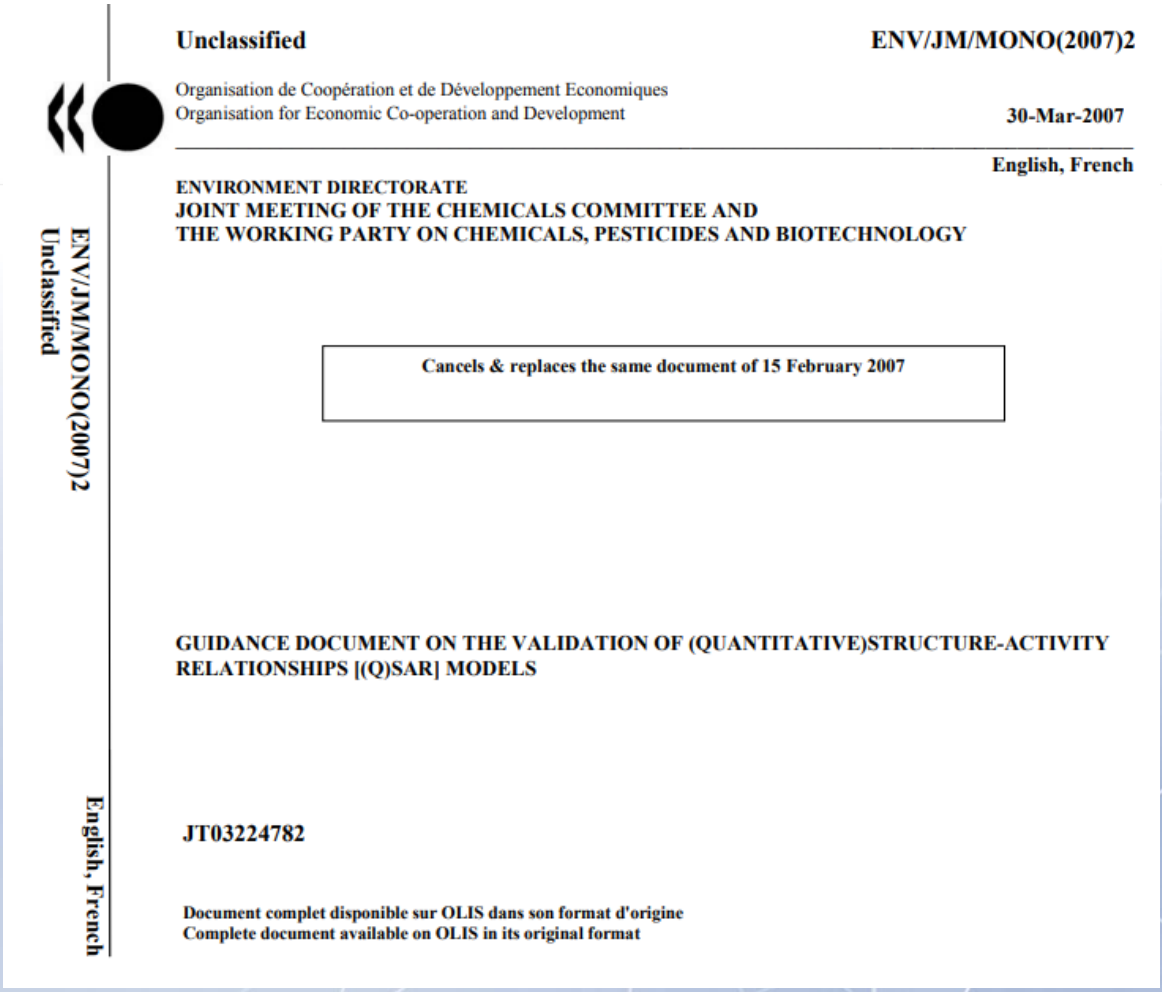
1- Um endpoint definido

2- Um algoritmo inequívoco

3- Um domínio de aplicabilidade definido

4- Medidas apropriadas de qualidade de ajustamento, robustez e preditividade

5- Uma interpretação mecanística, se possível



Unclassified ENV/JM/MONO(2007)2

Organisation de Coopération et de Développement Economiques
Organisation for Economic Co-operation and Development

30-Mar-2007

English, French

ENVIRONMENT DIRECTORATE
JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND
THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY

Cancels & replaces the same document of 15 February 2007

GUIDANCE DOCUMENT ON THE VALIDATION OF (QUANTITATIVE)STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS [(Q)SAR] MODELS

JT03224782

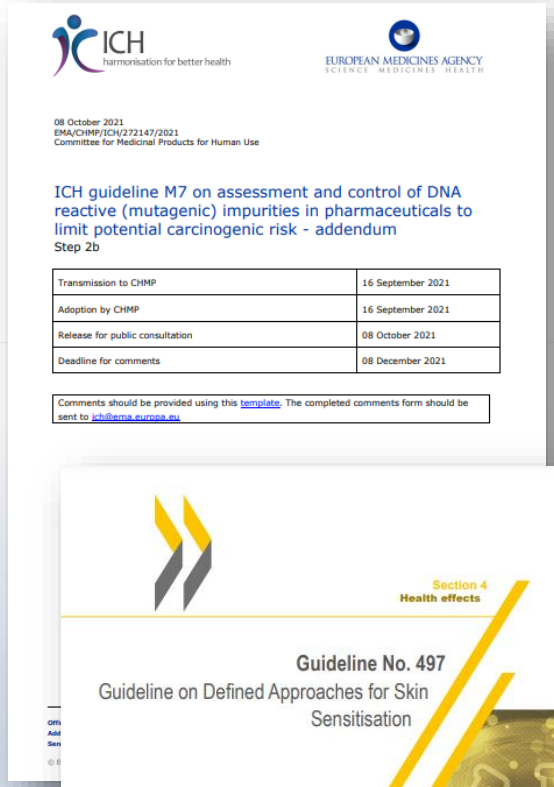
Document complet disponible sur OLIS dans son format d'origine
Complete document available on OLIS in its original format

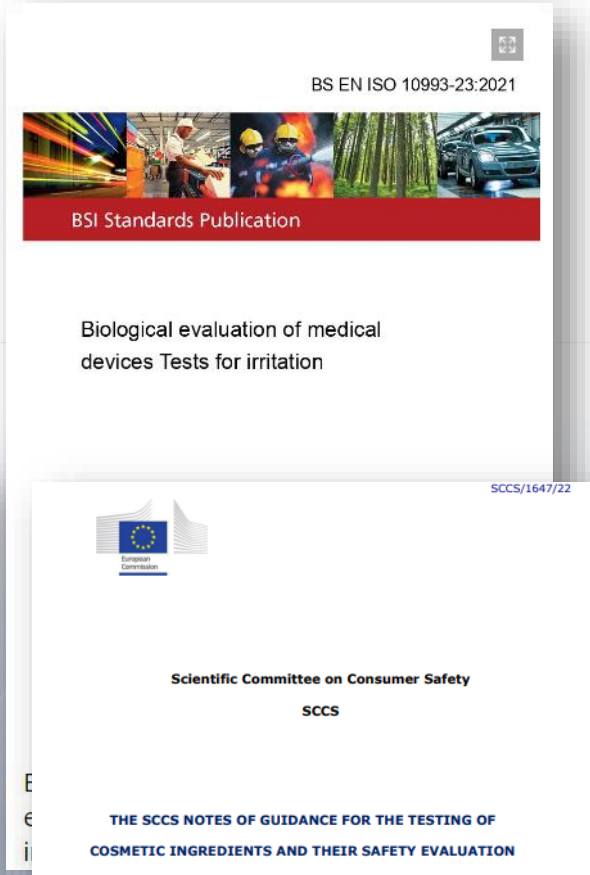
ENV/JM/MONO(2007)2
Unclassified

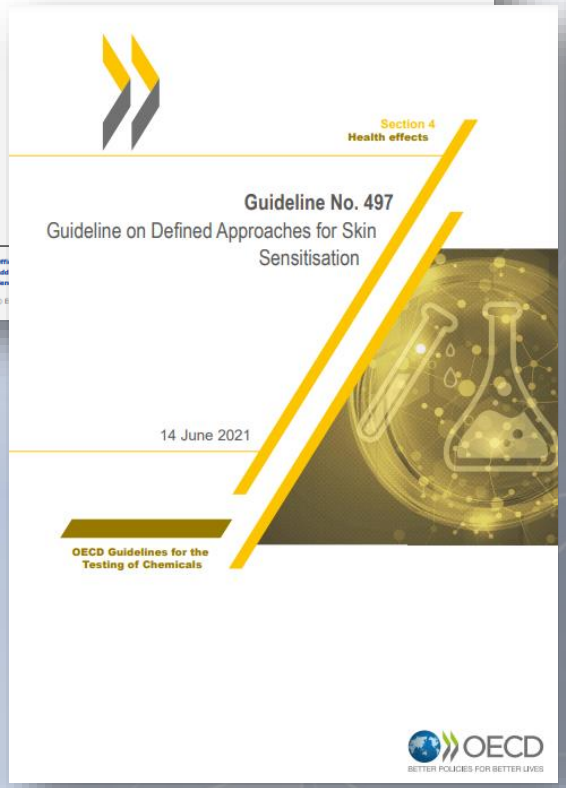
English, French

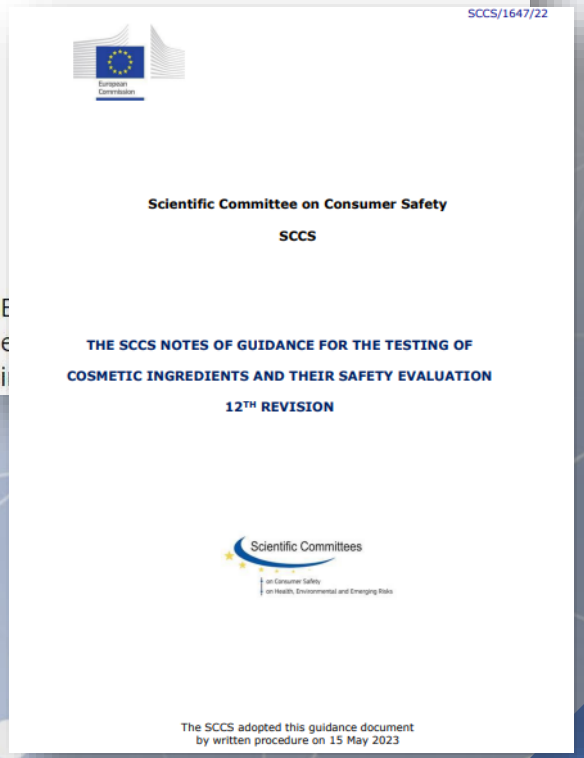
Modelos *in silico* são aceitos com fins regulatórios?

- Não apenas aceitos, mas em alguns casos exigidos
  - Isoladamente; ou,
  - Combinados com testes *in chemico, in vitro e/ou ex vivo* (New Approach Methodologies)
- Exemplos (lista não exaustiva)
- **Guideline OECD No. 497 (2021)** Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation (contextos diversos, sobretudo o cosmético)
  - Recomendável inclusão de mais métodos e modelos *in silico* validados ao invés de "softwares" (boa prática regulatória)
- **ICH M7** (contexto farmacêutico)
- **ISO 10993-23:2021** (avaliação de componentes de dispositivos médicos)
- **SCCS Notes** - Guidance for Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients (12ª rev 2023)
- **Legislações relacionadas a inventários e registros de substâncias: REACH, TSCA, DSL**
- **E outras nos setores agroquímicos, alimentos e medicamentos;**

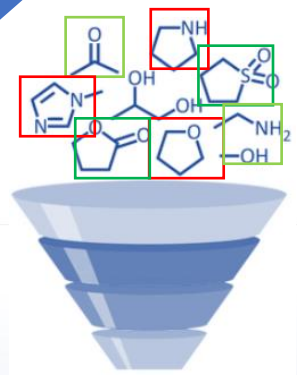


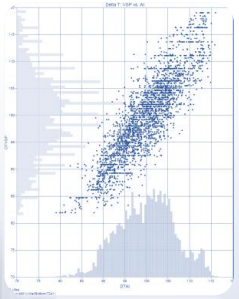






Exemplo de matriz SAR de alertas





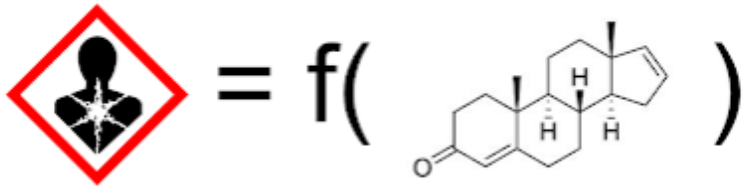
	EPs	Support	ρ	Structural Alert in ToxAlerts
MF_73		44	36.94	N-nitroso-N-alkylamides N-nitroso-N-alkylureas N-nitroso-N-alkylcarbamates
MF_0		67	27.92	Diazo
MF_1		55	22.76	Azide
MF_125		52	21.47	Aromatic and aliphatic aziridinyl derivatives
MF_156		47	12.60	Aromatic hydroxylamine ester
MF_72		27	9.09	Nitrosamine
MF_1651		178	6.79	Polycyclic aromatic hydrocarbons
MF_1841		26	6.59	Allylic halides
MF_824		48	6.01	Hydroxyl amine
MF_1667		226	5.84	Polycyclic aromatic hydrocarbons
MF_1831		36	5.33	Monohaloalkene
MF_75		162	5.19	Unsubstituted heteroatom-bonded heteroatom
MF_927		35	5.16	Aromatic N-acyl amine
MF_1298		27	4.94	Quinones
MF_920		964	4.70	Nitrosoarenes
MF_134		926	4.63	Aromatic nitro groups
MF_444		93	4.47	Nitrogen mustard

	EPs	Support	ρ	Structural Alert in ToxAlerts
MF_212		35	4.15	N mustard
MF_2188		29	4.12	Acyl halides
MF_2107		40	4.05	Alkyl ester of sulfonic and sulfuric acids
MF_34		74	3.68	Aliphatic azo
MF_1317		26	3.61	Heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons
MF_1883		308	2.33	Aliphatic and aromatic epoxides
MF_916		656	2.17	Primary aromatic amine
MF_432		50	1.83	Alkyl carbamate
MF_41		151	1.54	Aromatic azo
MF_153		51	1.33	Aliphatic nitroso
MF_169		182	1.25	Tertiary aromatic amine
MF_2197		26	1.17	Aliphatic halogens
MF_1836		59	1.17	α,β-unsaturated carbonyl
MF_1470		43	0.82	Coumarins
MF_2220		1491	0.64	Simple aldehyde
MF_2097		47	0.58	Alkyl ester of phosphonic and phosphoric acids

Modelos estatísticos - algoritmos

Modelos estatísticos (QSAR)

TOXICITY = f(CHEMICAL STRUCTURE) → **Descritores moleculares**



Toxicidade = *f* (carat. FQ e/ou estruturais)

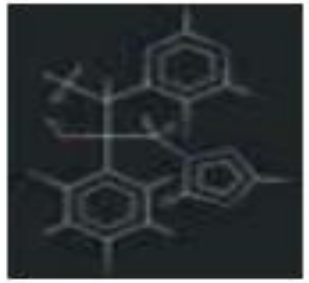
Quantitative structure-toxicity relationship (QSTR)

- Resposta contínua: IC50, EC50, DL50, CL50 etc;
- Respostas categóricas: +/-
- Classificatória (fraco, moderado, forte, extremamente forte etc.)
- Probabilística: 0 a 1 (0 – 100%)

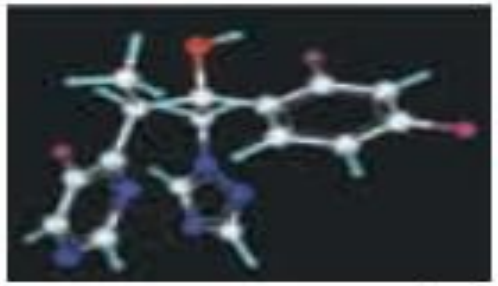
Obs: a notação (Q)SAR ao invés de QSAR, é frequentemente utilizada na literatura para descrever modelos de todas as categorias, incluindo aqueles sem relação quantitativa entre estrurura e atividade, como SAR e regras.

Descritores e formas de representação estrutural
QSAR 1-D, 2-D, 3-D e 4-D

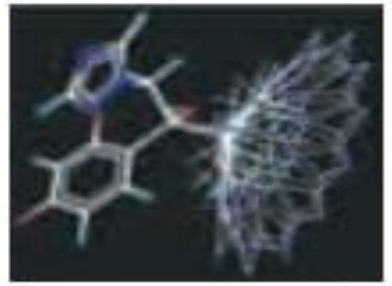
1D Representation



2D Representation



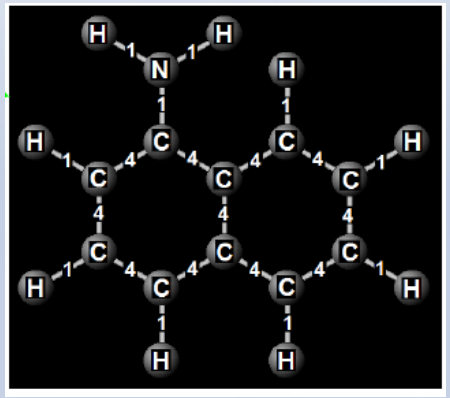
3D Representation



4D Representation

SMILES (Simplified molecular-input line-entry system)

C1(=CC=CC2=C1C=CC=C2)N



MOL File

```
16 15  0  0  0  0  0  0  0  0999 V2000
  -0.1958   -2.9667    0.0000 C   0  0  0
   0.5167   -2.5500    0.0000 C   0  0  0
   0.5125   -1.7250    0.0000 O   0  0  0
   1.2292   -2.9625    0.0000 N   0  0  3
   1.9417   -2.5458    0.0000 C   0  0  0
   2.6542   -2.9583    0.0000 C   0  0  0
   3.3667   -2.5417    0.0000 C   0  0  0
   4.0792   -2.9542    0.0000 C   0  0  0
   4.7917   -2.5375    0.0000 C   0  0  0
   5.5042   -2.9500    0.0000 C   0  0  0
   1.2250   -3.7875    0.0000 C   0  0  0
   0.8083   -4.5000    0.0000 C   0  0  0
   1.3917   -5.0833    0.0000 C   0  0  0
   0.9750   -5.7958    0.0000 C   0  0  0
   1.5583   -6.3792    0.0000 C   0  0  0
   0.9708   -6.9625    0.0000 C   0  0  0
  8  9  1  0  0  0  0
  4  5  1  0  0  0  0
  9 10  1  0  0  0  0
  2  3  2  0  0  0  0
  4 11  1  0  0  0  0
  5  6  1  0  0  0  0
 11 12  1  0  0  0  0
  1  2  1  0  0  0  0
 12 13  1  0  0  0  0
  6  7  1  0  0  0  0
 13 14  1  0  0  0  0
  2  4  1  0  0  0  0
 14 15  1  0  0  0  0
  7  8  1  0  0  0  0
 15 16  1  0  0  0  0
M  END
```

Vertices
(atomic type, coordinates etc.)

Edges
(connectivity table, label-types of bonds)

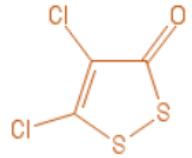
→ Formas que a máquina pode entender!

Descritores fingerprints

- Fingerprints são descritores na forma de uma lista de valores binários (0 ou 1), que podem ser gerados por diferentes Keys (MACCS Keys, ECFP etc.)
- Um conjunto de padrões estruturais podem ser checados. Por exemplo, uma estrutura **OC=CN**, pode conter:

0-bond paths:	C	O	N
1-bond paths:	OC	C=C	CN
2-bond paths:	OC=C	C=CN	
3-bond paths:	OC=CN		

Exemplo Fingerprint MACCS

MACCS Keys (conjunto de questões)		
Há menos de 3 oxigênios?	Yes (1)	Yes (1)
Há uma ligação S-S?	Not (0)	Yes (1)
Há um anel de 5 membros?	Yes (1)	Yes (1)
É pelo menos um F, Cl, Br, ou me apresentar?	Not (0)	Yes (1)
Lista de bits ou bitstring	1010	1111

Extended-Connectivity Fingerprints (ECFPs)

- É um descritor circular topológico desenhado para verificação de padrões de similaridade e caracterização de estruturas moleculare
- Alguns parâmetros podem ser estabelecidos (diâmetro, comprimento, contagem máxima etc)

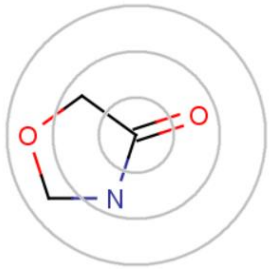


Fig. 1. Illustration of the effect of iterative updating for a selected atom in a sample molecule

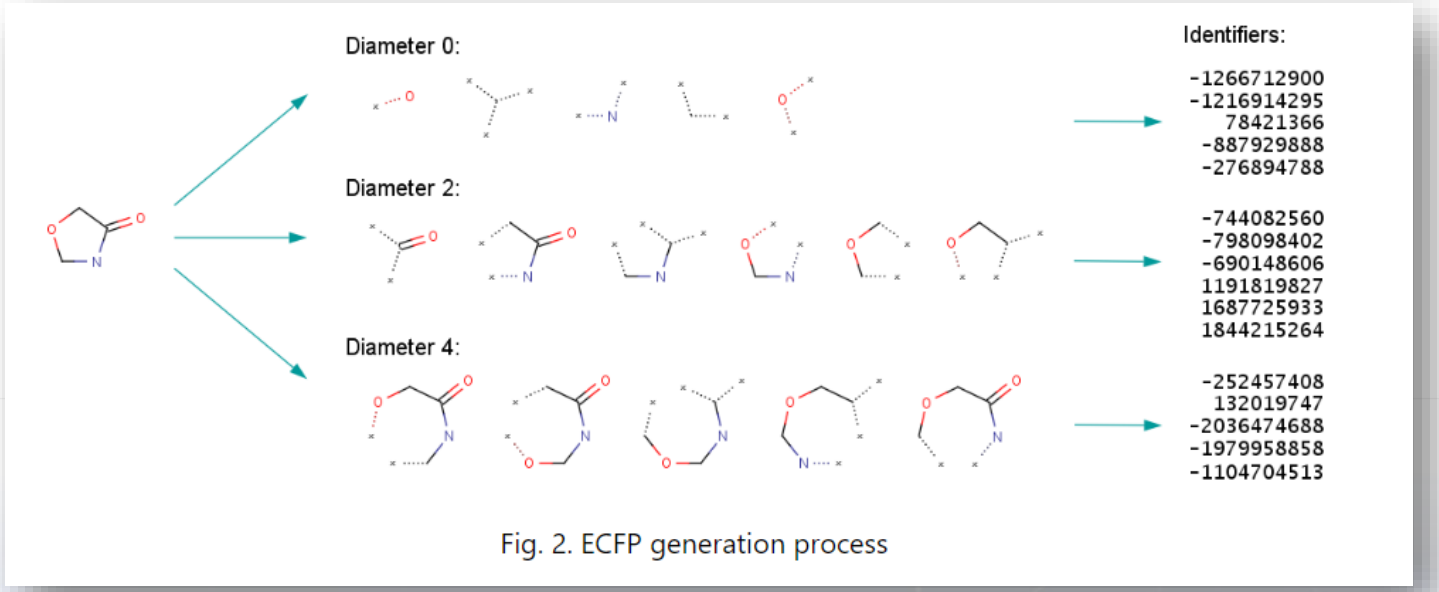


Fig. 2. ECFP generation process

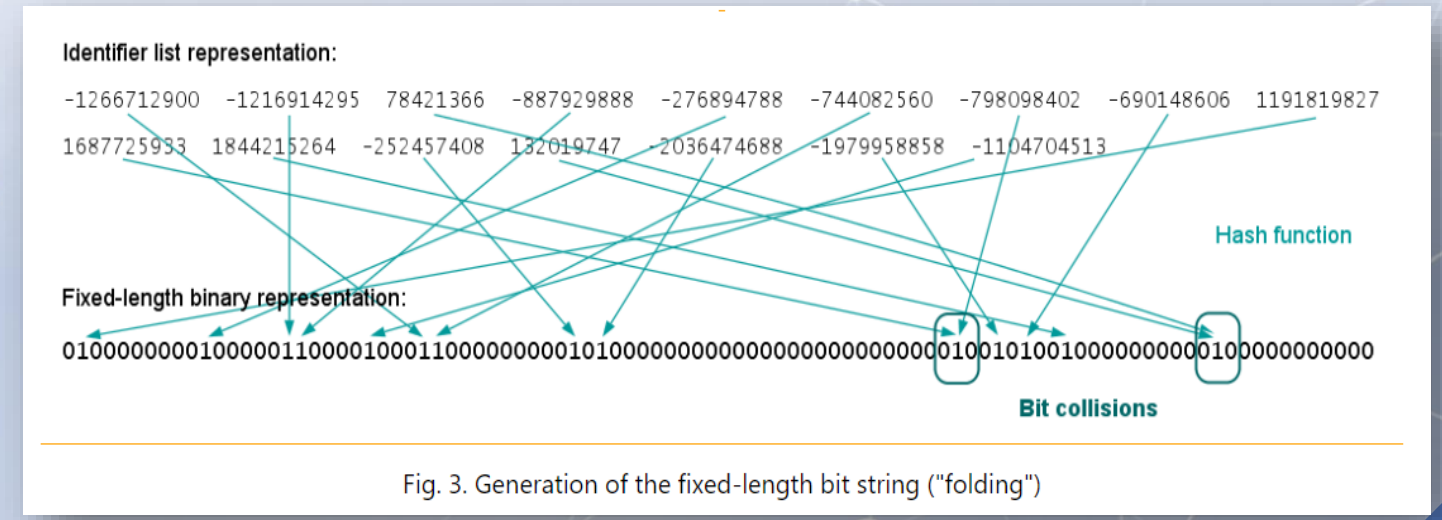
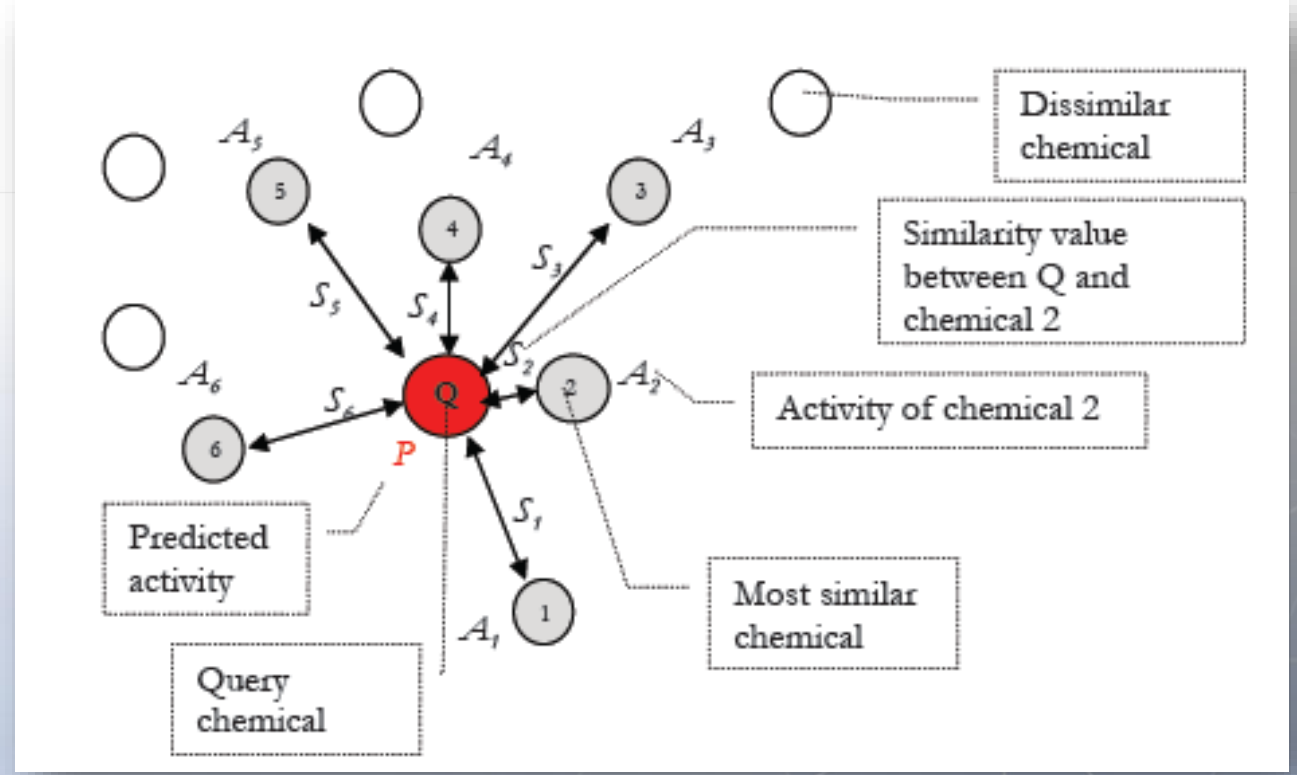


Fig. 3. Generation of the fixed-length bit string ("folding")

kNN (Nearest Neighbor)

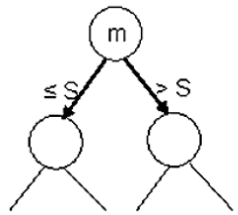
- Modelo baseado em um espaço químico reduzido com **moléculas vizinhas mais próximas**
- Premissa de que moléculas similares devem ter **atividade biológica similar**
- Quando uma nova molécula é inserida, um conjunto de moléculas estruturalmente relacionadas semelhantes é obtido no banco de dados e utilizado para classificar a nova instância de consulta
- Limitações e incertezas

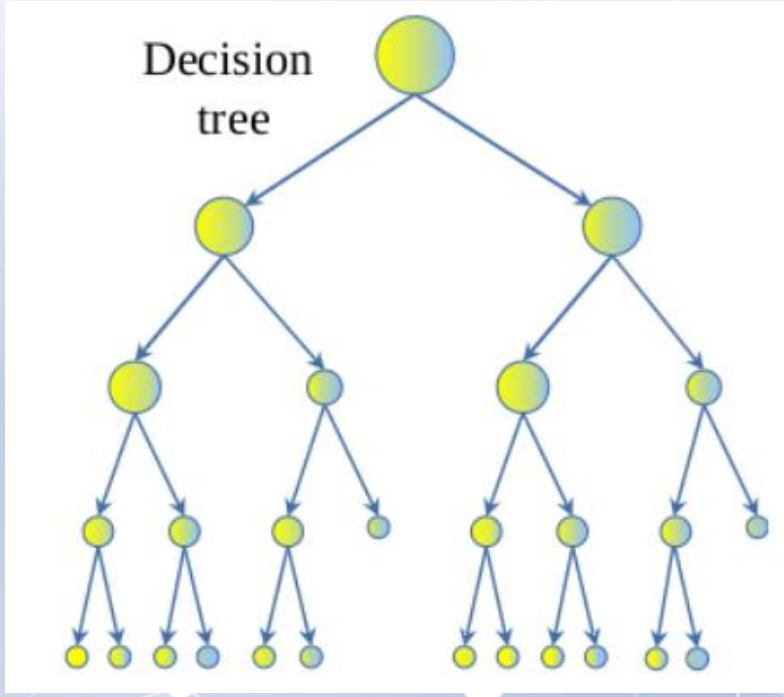


Árvores de decisão e deep decision

- CART – Classification and Regression Tree
- Procura entre todos os valores de todos os preditores a divisão em 2 grupos
  - Em classificação: garantir maior pureza em cada grupo

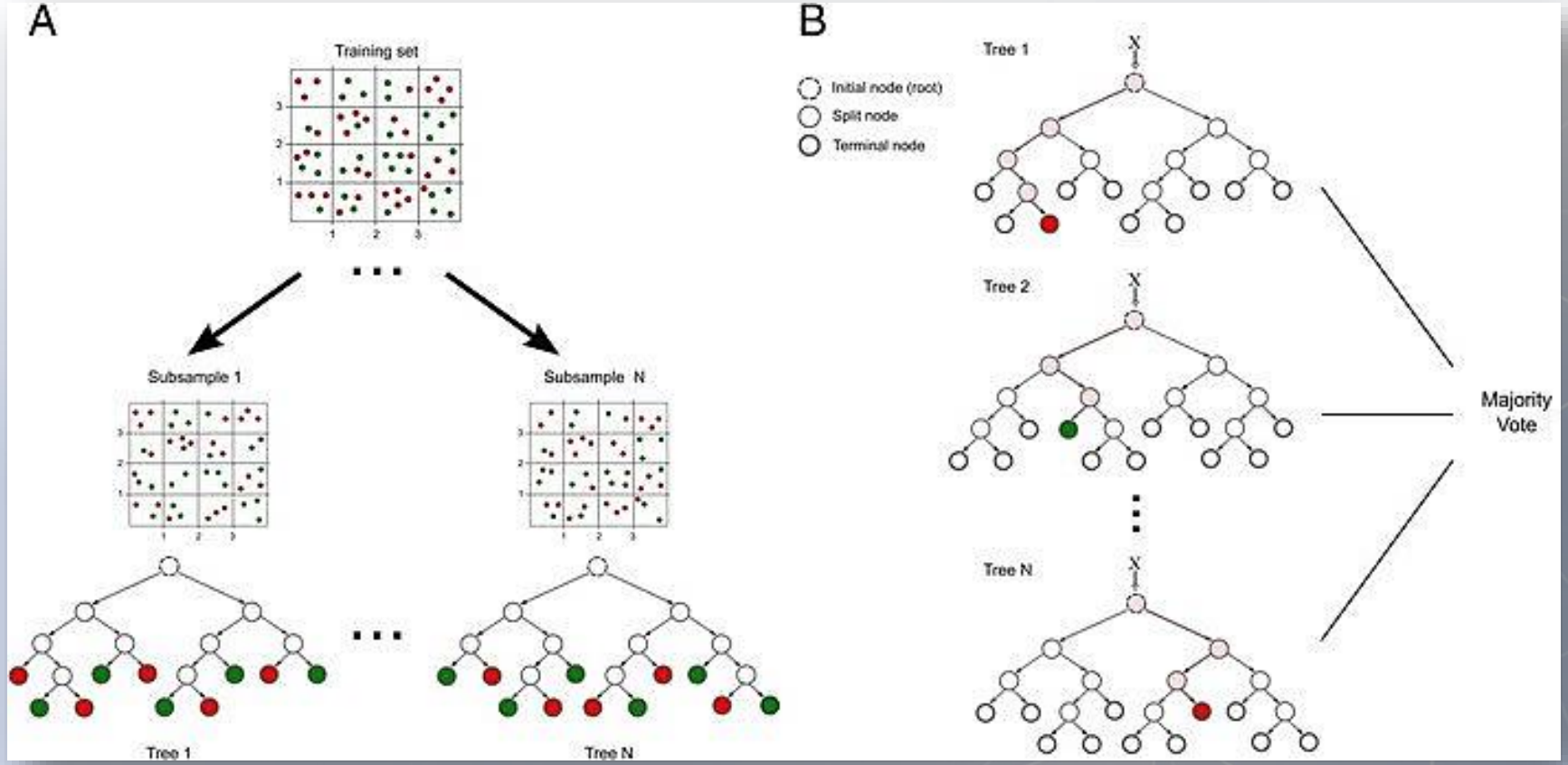
	x1	x2	...	...	...	...	xz
Chemical 1							+
Chemical 2	Chemical descriptors				Bioassay data		-
Chemical 3							+
...							-
Chemical n							+





Random forests

- Bagging (sorteio com aleatorização e reposição)
- Randomização na seleção de preditores em cada nó
- Menos variáveis em cada nó
- Predição segundo voto da maioria das árvores

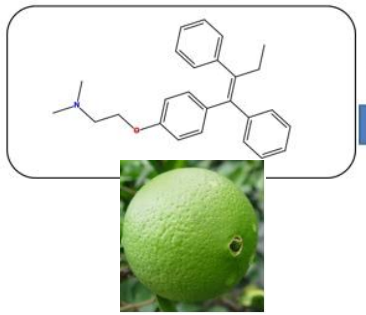


Deep Learning com laranja e limões

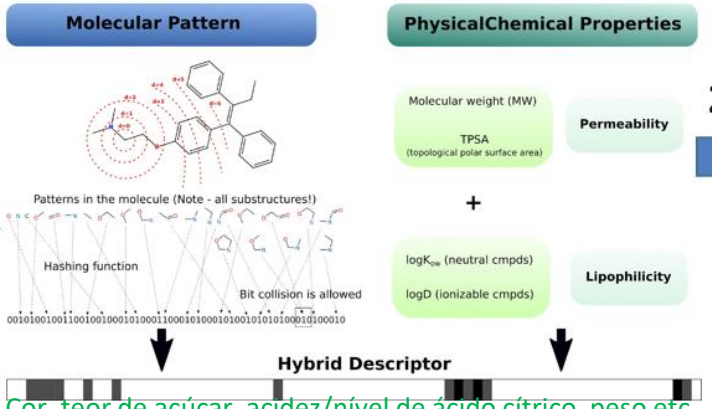
Genotox-iS™

Fingerprint Híbrido
União do fingerprint ECFP e propriedade físico-química: MW, TPSA, log_{Kow} , logD

Input Molecule



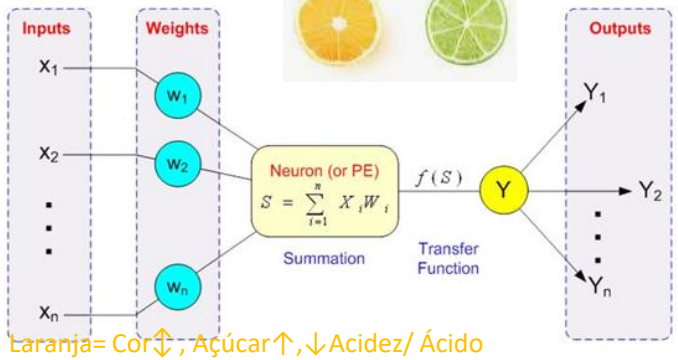
1



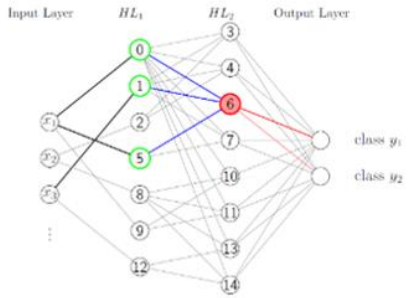
Cor, teor de açúcar, acidez/nível de ácido cítrico, peso etc.

2

deep learning (ANN)
Machine learning decision model implemented with the Hybrid fingerprint



Laranja= Cor↕ , Açúcar↑ ,↓Acidez/ Ácido cítrico, ↕peso, caipirinha↓
Limão= Cor↕ , ↓Açúcar, ↑ Acidez/ Ácido cítrico, ↕peso, ↑ caipirinha



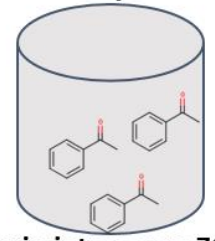
3

Laranja – Conf. 80%

Predição composta pelo voto majoritário. Exemplo para resultado mutagênico com 70% de confiança. Durante a amostragem externa (5-fold externo), 70% das amostras apontavam combinação de pesos nas camadas profundas de neurônio para decisão de potencial mutagênico.

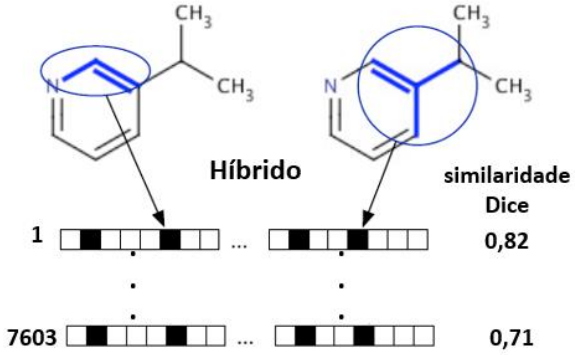
4

Domínio de aplicabilidade



quimioteca com 7603 substâncias avaliadas para mutagenicidade *in vitro*.

5



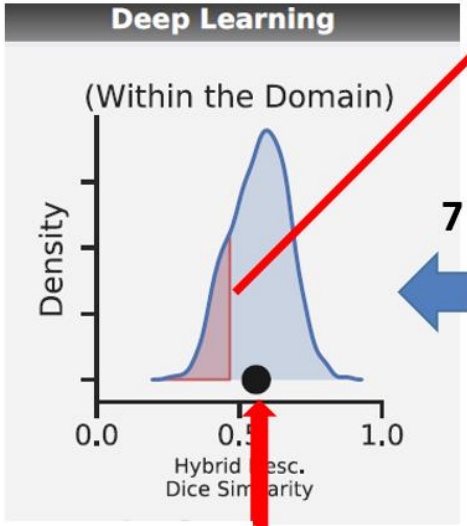
1.Cálculo da similaridade da matriz de dados contra ela mesma para gerar uma matriz quadrada.
2. cálculo da similaridade dice entre a "input molecule" e todas as substâncias da dataset.

6

$$D_c = Z\sigma_{ec} + y_{ec}$$

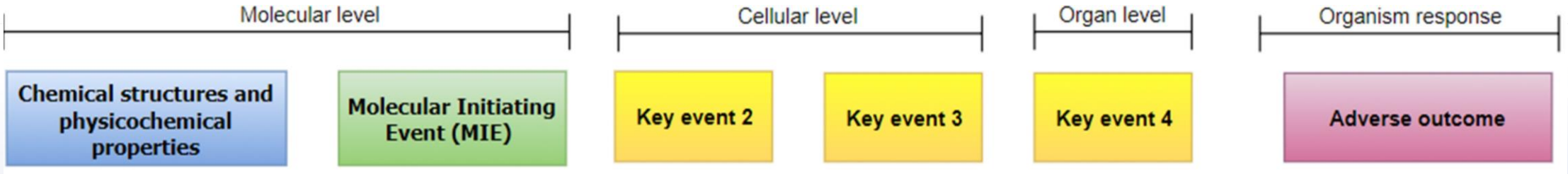
Na Equação, o y_{ec} é a média aritmética e σ_{sec} o desvio padrão das similaridade dice dos *k* vizinhos mais próximos de cada composto na série treinamento. O parâmetro empírico Z controla o nível de significância, sendo que seu valor de 1,0.
O valor de *k* ideal pode ser obtido pelo valor empírico calculado usando $n^{1/3}$ (n=dataset tamanho).

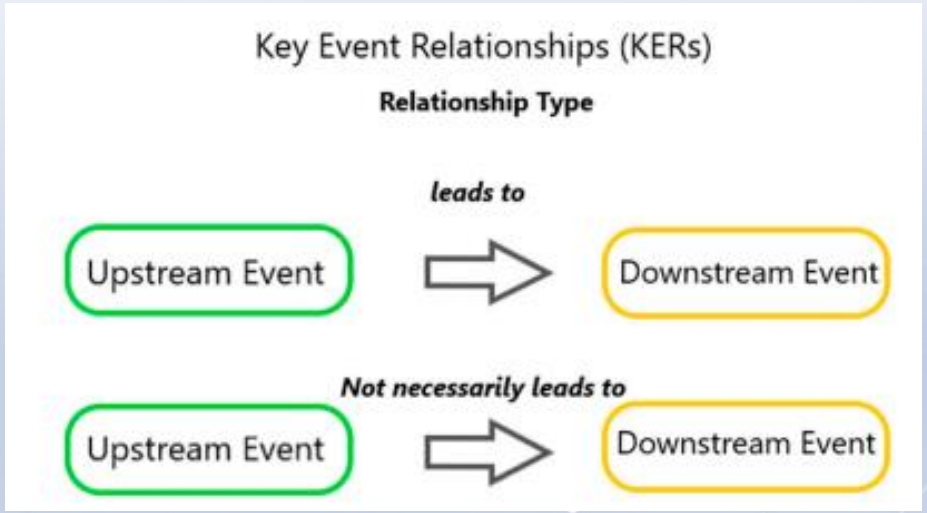
7



Adverse Outcome Pathways (AOPs)

Constructo que descreve a cadeia sequencial de eventos-chave relacionados a um desfecho toxicológico (efeito adverso)

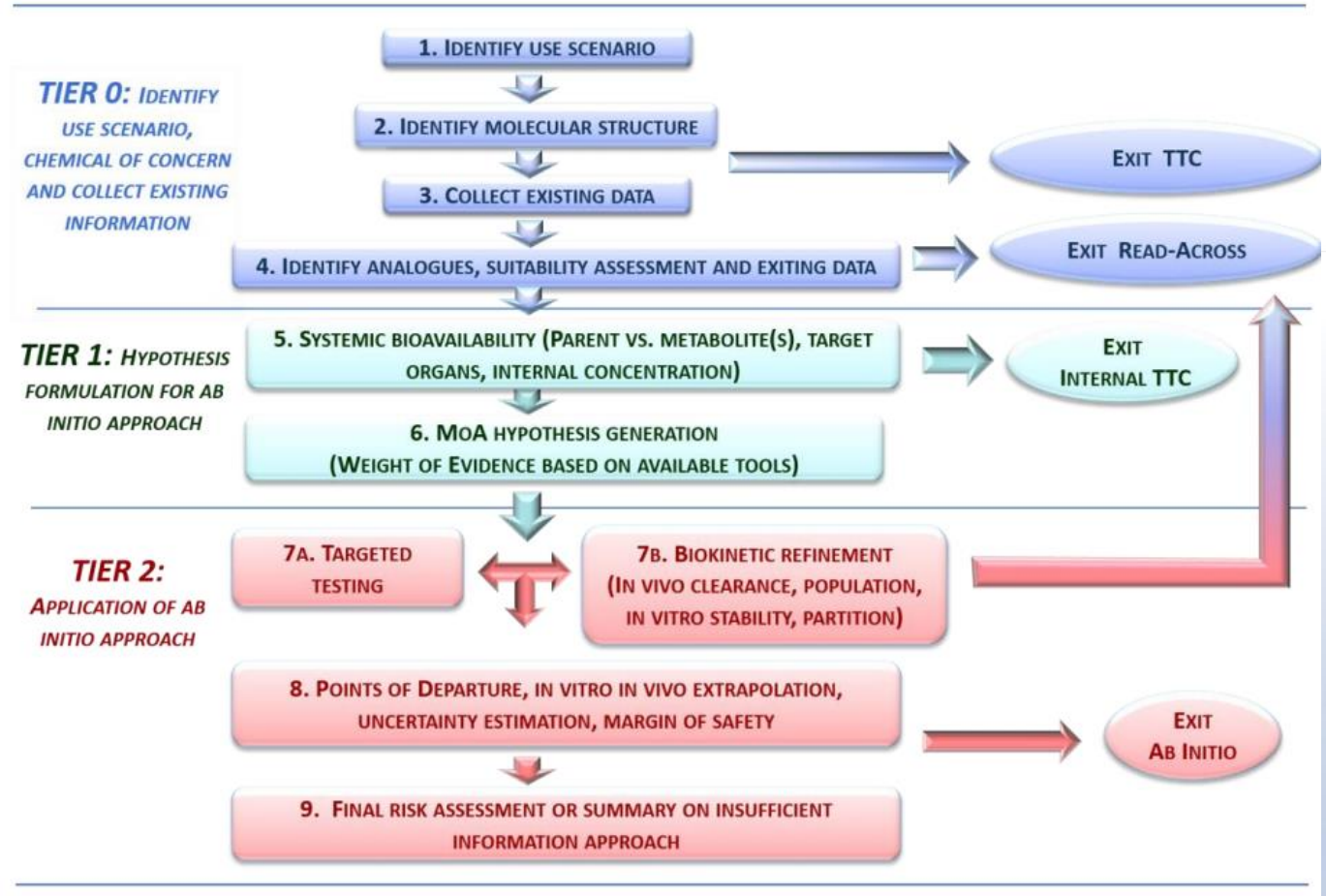




Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways (OECD, 2012)

Santos et al (2020) MDPI W. 2020, 12, 3549; doi:10.3390/w12123549

New Generation Risk Assessment (NGRA)



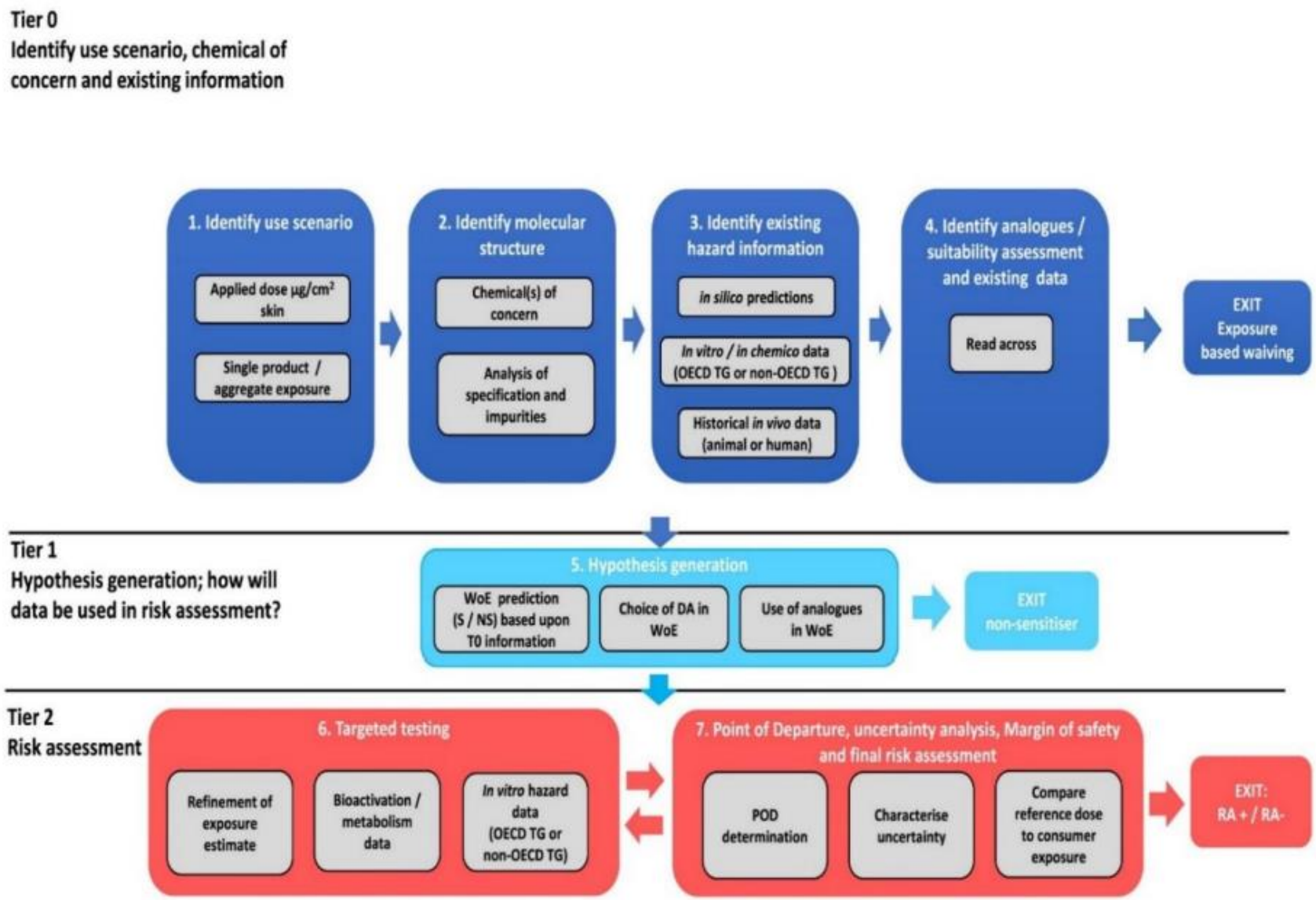
IrriTest™ Pred-Oral™ Genotox-iS™

AOP-Sens™ iS-Liver™ Pred-CYP22D™

iS-Ocular™ Acute-Tox™ DevTox-iS™

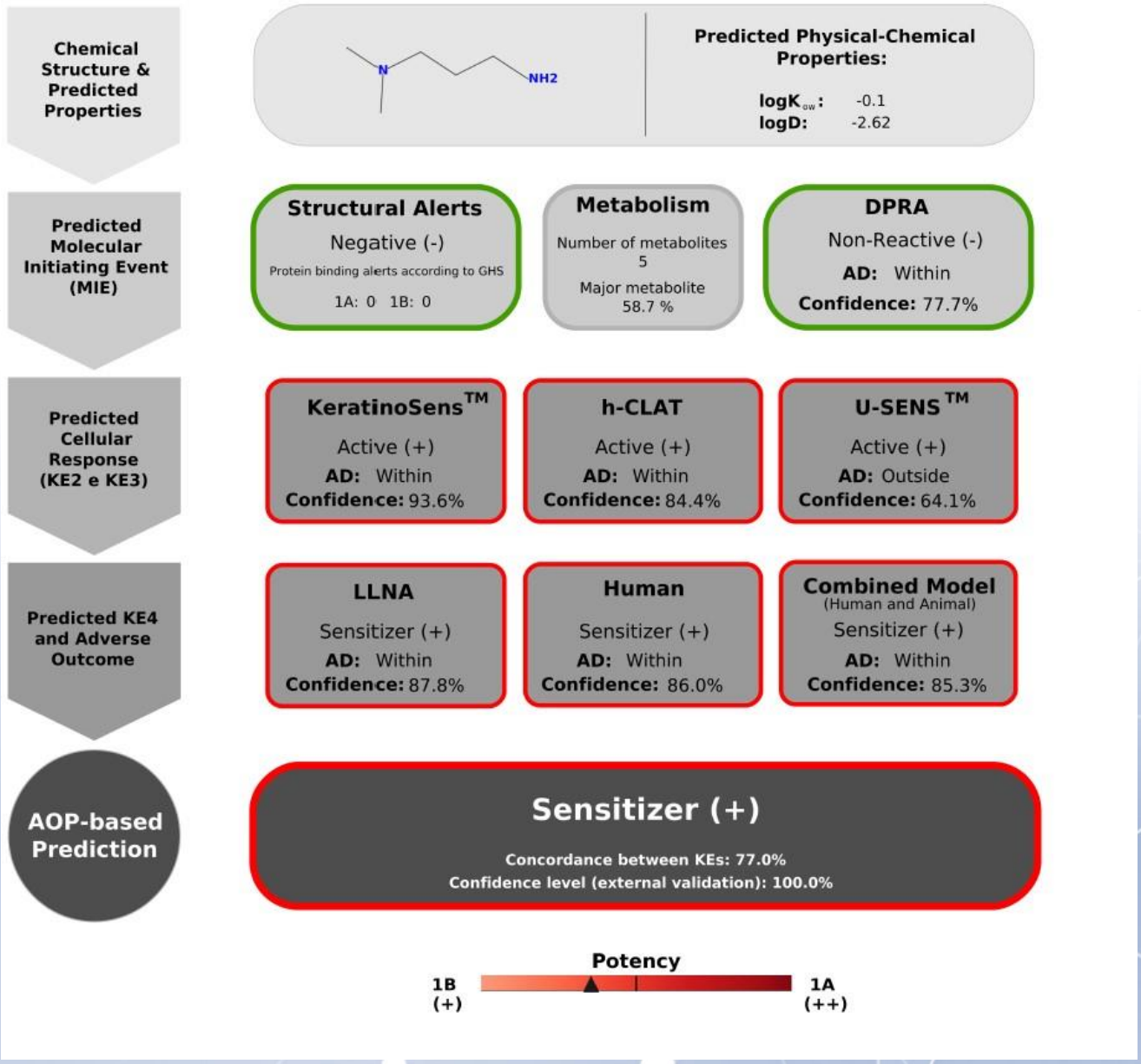
- Avaliação de características FQ, biodisponibilidade, metabolismo
- Avaliação de toxicidade sistêmica e para órgãos-alvo
- Avaliação para descartar potencial genotóxico, para proposição de limites baseados em toxicidade geral
  - TTC: Classes I, II e III
  - iTTC: 1µM

NGRA para sensibilização cutânea



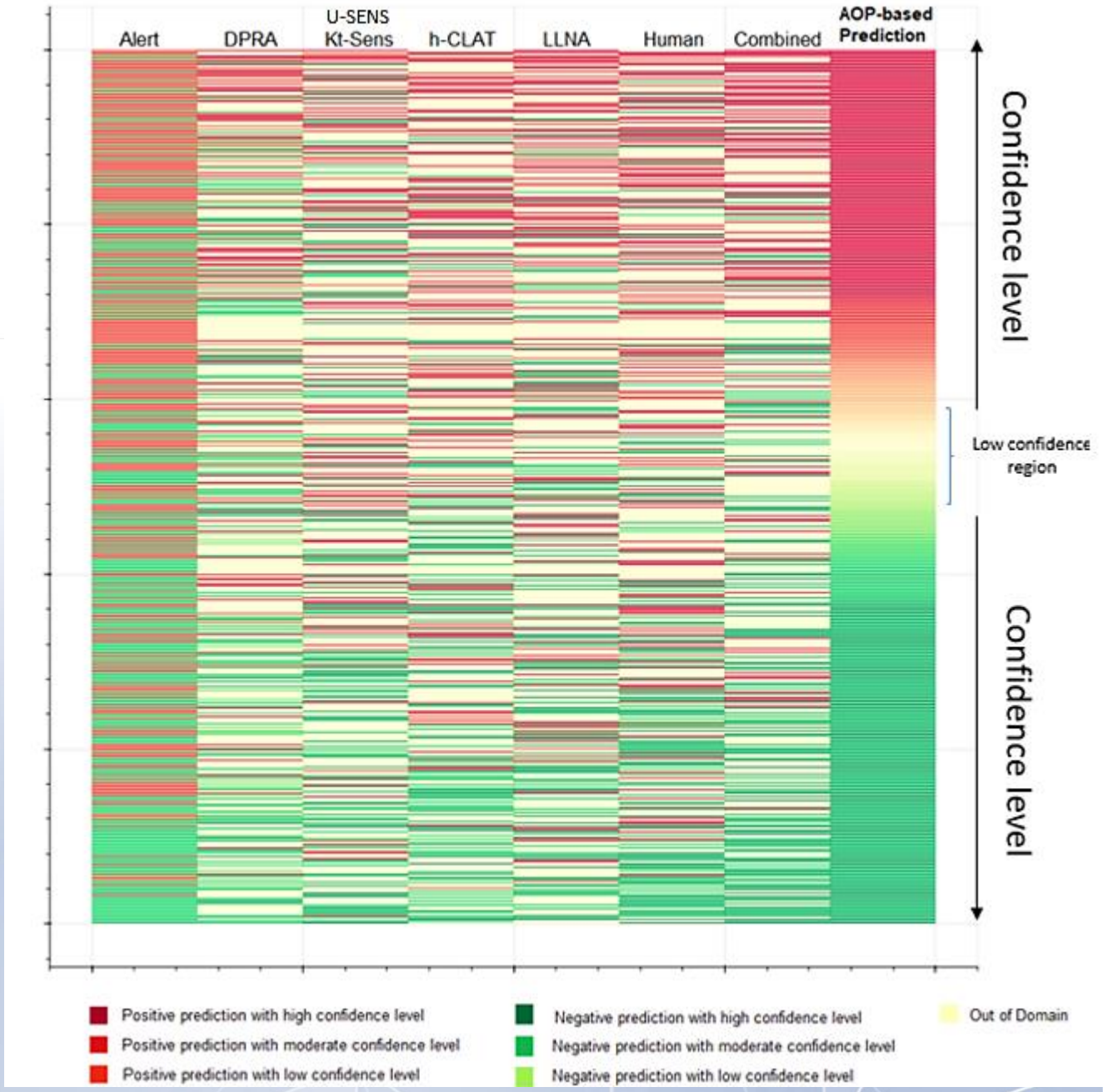
AOP-Sens™

- Modelo *in silico* "AOP-based" for NGRA e Defined approaches on skin sensitisation (DASS)
- Avaliação de dados físico-químicos
- Verificação de alertas na estrutura e nível de preocupação de metabólitos previstos (eventuais pró-haptenos)
- Predição de cada um dos eventos-chave e desfecho de sensibilização
- Estimativa do peso de evidência (WoE) através de Key Events Relationships
- Estimativa de potência de sensibilização (Classes do GHS) que podem ser utilizadas para estimativas da DST (dermal sensitization threshold)
- Dados de análogos para RAx



Avaliando o peso de evidência (WoE)

- Avaliação mecanicistica
- Avaliação da concordância e relações entre os eventos-chave
- Regiões de alta ou baixa confiança
- Avaliação de análogos similares



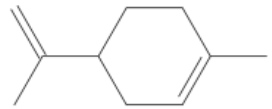
Aplicando na prática

Name:
(R)(+)Limonene

CAS:
5989-27-5

SMILES:
CC1=CCC(CC1)C(=C)C

$logK_{ow}$:
3.31

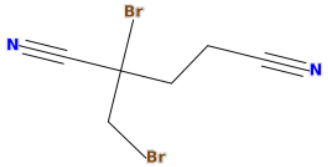


Name:
1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane (MDGN)

CAS:
35691-65-7

SMILES:
C(#N)C(Br)(CCC(#N))CBr

$logK_{ow}$:
2.34



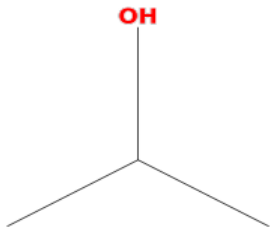
Name:
Isopropanol

CAS:
67-63-0

SMILES:
CC(C)O

$logK_{ow}$:
0.39

logD:



Perspectivas para desenvolvimento e aplicação regulatória no Brasil?

- **Diálogos e capacitação:** diálogos mais diretos, CPs e atualização das gerências de órgãos reguladores sobre estes novos métodos, práticas e abordagens;
- **Atualização regulatória:** Ausência de guias locais e normativas sobre avaliação de segurança atualizadas de acordo com avanços internacionais
- **Projetos de inovação entre empresas:** co-desenvolvimento de novos modelos *in silico, estratégias NGRA, DAs e* IATAs com foco em endpoints relevantes

Qual nível de atualização regulatória e inovação?

Nossos agradecimentos

GrupoBoticário

L'ORÉAL GROUPE

ABIHPEC
Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

Obrigado pela atenção!

carlos@altox.com.br

Altox
ALTERNATIVE TOXICOLOGY