



a cura di Silvia Cauteruccio e Monica Civera

Dipartimento di Chimica  
Università di Milano  
silvia.cauteruccio@unimi.it  
monica.civera@unimi.it

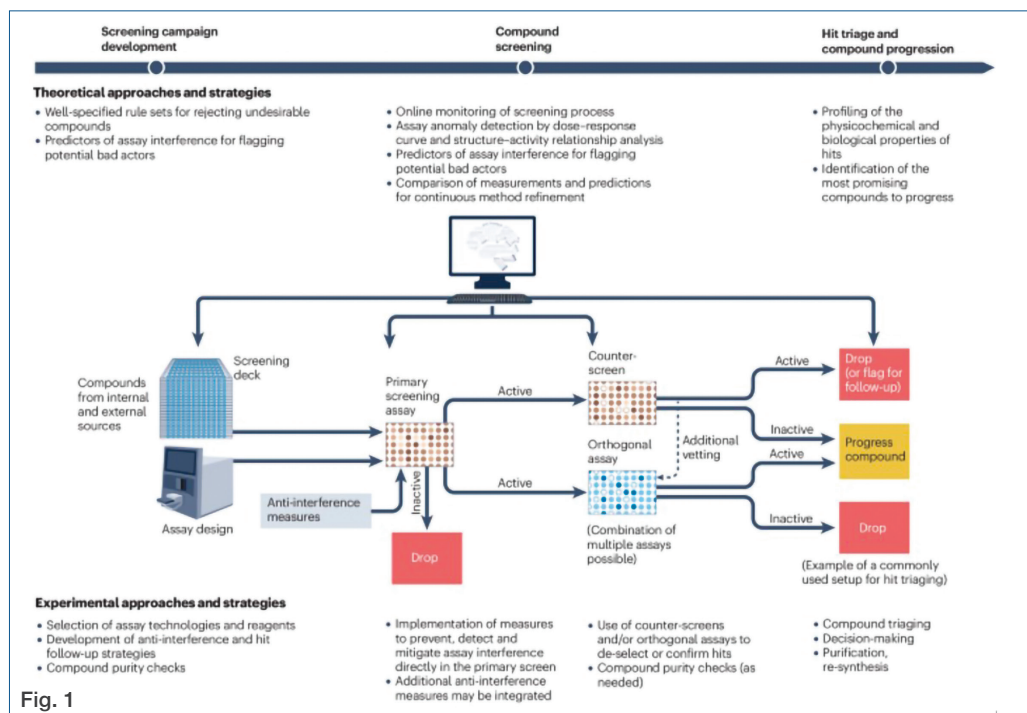
## Come evitare composti 'interferenti' nei saggi biologici applicando una strategia computazionale

Nei saggi HTS (*high-throughput screening*) sono valutati a livello sperimentale anche centinaia di migliaia di composti al giorno. Questo processo ha lo scopo di identificare potenziali *hits* per lo sviluppo di farmaci, prodotti per la cosmesi o l'industria agro-alimentare. Tuttavia, solo una piccola frazione di queste molecole 'attive' riflette una reale e specifica interazione con la macromolecola di interesse. Esiste un numero considerevole di composti, PAINS (*pan-assay interference compounds*) o CIA-Ts (*compounds interfering with an assay technology*) che possono comportarsi da falsi *hits* perché capaci di interferire con il saggio biochimico. Questi composti sono dei 'bad actors' e vanno eliminati per evitare di sprecare tempo e risorse nel loro sviluppo. Solitamente le loro caratteristiche strutturali e chimico-fisiche li rendono capaci di aggregare, chelare metalli, essere chimicamente molto reattivi, legarsi in modo promiscuo a più macromolecole, o interferire con la lettura di un segnale spettroscopico. Come riportato in un recente lavoro [L. Tan *et al.*, *Nat. Rev. Chem.*, 2024, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41570-024-00593-3>], un singolo screening biologico non è sufficiente a identificare questi composti e quindi sono necessarie altre

strategie. Dal punto di vista sperimentale si possono fare, in aggiunta al saggio primario, esperimenti 'ortogonali', ovvero misurare lo stesso effetto biologico usando tecnologie e condizioni diverse per confermare l'attività, o saggi di controllo, ovvero ripetere il saggio nelle stesse condizioni sperimentali ma senza far avvenire la reazione o evento biologico, una sorta di 'bianco' in cui il composto interferente non dovrebbe cambiare il suo responso.

Tan *et al.* riportano nel loro lavoro anche un elenco molto esaustivo dei *tools* computazionali che possono aiutare ad individuare i composti interferenti. Questa trentina di software si differenziano per come analizzano i dati biologici di collezioni di molecole disponibili in vari databases. I metodi più utilizzati sono quelli *rule-based*, ovvero che identificano molecole interferenti sulla base della presenza di alcuni elementi strutturali codificati da stringe SMARTS ottenute dall'analisi di librerie di molecole attive. Esistono diversi metodi e regole differenti che dipendono dal data set utilizzato per il *training* e la validazione del modello. Anche la similarità tra composti, ed i metodi statistici o di machine learning sono molto utilizzati. Ad esempio, HitDexter [C. York *et al.*, *J. Chem. Inf. Model.*, 2019, **59**, 1030] è una piattaforma web per la predizione di interferenze basata sull'intelligenza artificiale. I modelli sono stati 'allenati' su grandi collezioni di

molecole prese dal database PubChem Bio-Assay. In generale, gli autori raccomandano di valutare ogni tool in relazione a come il modello è stato costruito e validato, e quindi il dominio di applicabilità e, anche per gli approcci *in silico*, di combinare risultati di metodi diversi per rendere la predizione più attendibile. Sempre Tan *et al.* propongono una pipeline per integrare metodi sperimentali e computazionali in modo efficiente (Fig. 1).





### Metodologie per la rimozione e determinazione di PFAS nelle acque

I composti perfluoroalchilici, noti con l'acronimo PFAS (*perfluoroalkyl substances*), appartengono ad una famiglia di composti organici di origine sintetica caratterizzati da una catena alchilica di lunghezza variabile (C4-C16) nella quale gli atomi di idrogeno sono stati completamente (perfluoroalchilici) o parzialmente (polifluoroalchilici) sostituiti con atomi di fluoro. All'estremità di queste catene si trovano gruppi funzionali polari, generalmente carbossilati, solfonati o fosfati, che rendono i PFAS degli ottimi tensioattivi, con numerosi impieghi per la produzione di cosmetici, detergenti, schiume estinguenti e materiali per l'alimentazione. Se da un lato la notevole stabilità chimica e termica di questi composti, principalmente legata al numero di legami C-F, li rende intermedi altamente versatili in molte produzioni industriali, dall'altro però conferisce loro una particolare resistenza alla degradazione tanto da guadagnarsi il titolo di "forever chemicals", essendo stati classificati come inquinanti organici persistenti. La loro presenza è stata riscontrata a livello mondiale in matrici ambientali, quali acque e suoli, con conseguente accumulo negli organismi acquatici e terrestri, compreso l'uomo. È ormai appurato che l'esposizione ai PFAS porta ad effetti negativi sulla salute dell'uomo e degli animali, e tra questi, l'acido perfluorooctanoico (PFOA, Fig. 2a) e l'acido perfluorooctansolfonico (PFOS, Fig. 2a) sono stati ampiamente studiati e regolamentati negli ultimi due decenni in risposta alle loro pericolosità sia dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) che dall'EPA (*Environmental Protection Agency*) statunitense, limitando il loro utilizzo e i loro valori massimi soprattutto nelle acque potabili e nei prodotti alimentari fino a 4 ng/L (<https://www.epa.gov/system/files/documents/202304/PFAS%20NPDR%20>

### Public%20Presentation\_Full%20Technical%20Presentation\_3.29.23\_Final.pdf

). In questo contesto anche la ricerca accademica continua ad interessarsi attivamente a questa problematica, sviluppando tecnologie, principalmente basate su processi di adsorbimento, sempre più all'avanguardia per la loro rimozione e determinazione a basse concentrazioni [F. Xiao, *ACS EST Water*, 2024, **4**, 1191]. È stato, ad esempio, messo a punto un *metal-organic framework* (MOF, **U1**, Fig. 2b) a base di Zr(IV) con un legante perilenico (Fig. 2b) in grado di rilevare il **PFOA** fino a concentrazioni 1,7 mM in sospensioni acquose, mediante una risposta di fluorescenza altamente selettiva [L. Zang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2024, DOI: [10.1021/acsami.4c03389](https://doi.org/10.1021/acsami.4c03389)]. L'equilibrio di adsorbimento di **PFOA** nei nanopori di **U1** è determinato dalla complessazione del gruppo carbossilico di **PFOA** con il centro metallico di Zr(IV) e dalle interazioni idrofobiche che si instaurano tra la catena fluorurata di **PFOA** con il *backbone* clorurato del legante perilenico. Al contrario, è stato ottenuto uno scarso adsorbimento da parte di **U1** nei confronti di PFOS dovuto alla debole complessazione tra Zr(IV) e il gruppo solfonico di **PFOS** rispetto al gruppo carbossilico di **PFOA**. L'adsorbimento fisico di **PFOA** da diverse matrici acquose è stato realizzato anche mediante l'impiego di gel a base di polistirene sindiotattico (sPS) meso e macroporoso fino a concentrazioni <1 mg/L [S.C. Jana, *Langmuir*, 2024, DOI: [10.1021/acs.langmuir.4c00482](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c00482)]. L'adsorbimento di **PFOA** da parte di questi gel può essere attribuito alla forte affinità di **PFOA** per la superficie sPS e l'aggregazione di molecole di **PFOA** all'interfaccia solido-liquido e/o all'interno dei pori del gel. Inoltre, l'elevata area superficiale di questi gel permette di riutilizzare più volte tale sistema mantenendo alti valori di efficienza di separazione (fino al 90% dopo 5 cicli).

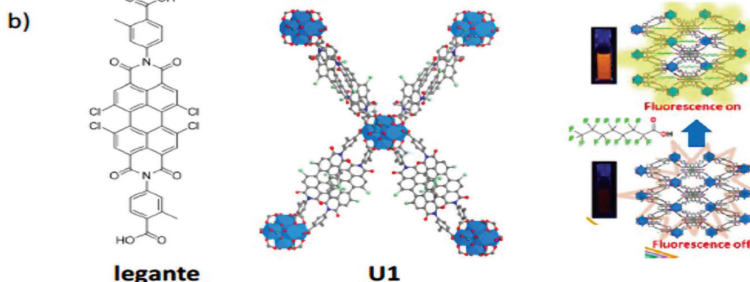
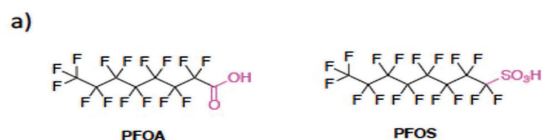


Fig. 2