

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH



TRẦN QUẾ HƯƠNG

**NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC
CÁC CẤU TRÚC PHÂN TỬ NHỎ
CÓ KHẢ NĂNG GẮN KẾT IL-6, IL-6R
VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GẮN KẾT
BẰNG CÁC PHƯƠNG PHÁP LÝ SINH**

Ngành: Hóa Dược

Mã số: 9720203

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. Hồ Chí Minh, Năm 2024

Công trình được hoàn thành tại:

Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Lê Minh Trí

Phản biện 1:

Phản biện 2

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án
cấp trường

họp tại

vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP.HCM
- Thư viện Đại học Y Dược TP.HCM

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

- 1. Que-Huong Tran**, Quoc-Thai Nguyen, Nguyen-Quynh-Huong Vo, Tan Thanh Mai, Thi-Thuy-Nga Tran, Thanh-Dao Tran, Minh-Tri Le, Dieu-Thuong Thi Trinh, Khac-Minh Thai (2022), "Structure-based 3D-Pharmacophore modeling to discover novel interleukin 6 inhibitors: An insilico screening, molecular dynamics simulations and binding free energy calculations", *Plos One*, 2022 17(4): e0266632. doi: 10.1371/journal.pone.0266632.
- 2. Que-Huong Tran**, Quoc-Thai Nguyen, Thi-Thuy Nga Tran, Thanh-Dao Tran, Minh-Tri Le, Dieu-Thuong Thi Trinh, Van-Thanh Tran, Viet-Hung Tran & Khac-Minh Thai (2022), " Identification of small molecules as potential inhibitors of interleukin 6: a multi-computational investigation". *Molecular Diversity*, 2023 (27): 2315–2330. doi.org/10.1007/s11030-022-10558-7
- 3. Que-Huong Tran**, Hoang-Nhi Cao, Dac-Nhan Nguyen, Thi-Thuy-Nga Tran, Minh-Tri Le, Quoc-Thai Nguyen, Van-Thanh Tran, Viet-Hung Tran, Khac-Minh Thai (2023), "Targeting Olokizumab-Interleukin 6 interaction interface to discover novel IL-6 inhibitors". *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2023 41(23):14003-14015. doi: 10.1080/07391102.2023.2193990.

1. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Interleukin 6 (IL6) là một cytokin đa chức năng đóng vai trò quan trọng trong các bệnh lý viêm và ung thư. Khi IL6 tương tác với thụ thể đặc hiệu IL-6R và thụ thể truyền tín gp130 dẫn đến kích hoạt các đường truyền tín hiệu xuôi dòng gây ra các bệnh lý liên quan. Vì vậy, hướng phát triển các thuốc phân tử nhỏ nhằm mục tiêu vào ức chế tương tác IL6 và các thụ thể trở thành chiến lược điều trị rất tiềm năng và cấp thiết. Với chi phí thấp, các phương pháp thiết kế thuốc *in silico* vẫn là một lựa chọn phù hợp để tìm kiếm các chất ức chế IL6 và thụ thể. Cùng với tính sẵn có của các thư viện cấu trúc như ZINC, NCI, DB và HCPLNB, luận án được thực hiện với tên đề tài “Nghiên cứu sàng lọc các cấu trúc phân tử nhỏ có khả năng gắn kết IL6, IL6R và đánh giá khả năng gắn kết bằng các phương pháp lý sinh”. Việc phát hiện được các hợp chất mới tiềm năng để phát triển thành các thuốc điều trị viêm và ung thư thể hiện tính thời sự cũng như mang lại ý nghĩa thực tiễn cao.

b. Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu của nghiên cứu là tìm kiếm được các cấu trúc phân tử nhỏ có khả năng gắn kết IL6, IL6R với các nội dung chính:

1. Sàng lọc *in silico* các chất gắn kết IL6, IL6R tại vị trí I từ các ngân hàng dữ liệu
2. Đánh giá *in vitro* các chất tiềm năng trên khả năng ức chế gắn kết phức hợp IL6/IL6R và khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL6.

3. Sàng lọc *in silico* các chất gắn kết IL6 tại vị trí IIIa từ các ngân hàng dữ liệu

c. Những đóng góp mới của nghiên cứu về mặt lý luận và thực tiễn

Dựa vào kết quả nghiên cứu, những đóng góp mới của đề tài có thể được liệt kê:

1. Xây dựng được 5 mô hình 3D-pharmacophore và 4 mô hình docking ứng dụng sàng lọc *in silico* các chất ức chế tương tác IL6/IL6R tại vị trí I và IL6/gp130 vị trí IIIa. Các mô hình đã được chứng minh tính hiệu quả và độ tin cậy bằng phân tích tương tác đầu vân tay tương tác protein-phối tử (PLIF).

2. Phát hiện được các chất mới ức chế tiềm năng tương tác IL6/IL6R và IL6/gp130 từ các ngân hàng dữ liệu ZINC15, NCI, DB bằng các mô hình pharmacophore, docking, mô phỏng MD kết hợp với dự đoán các đặc tính dược động học ADMET. Độ lớn và tính sẵn có của các ngân hàng dữ liệu này tạo tiền đề vững chắc để phát triển cho những nghiên cứu tiếp theo.

3. Hoạt tính ức chế tương tác IL6/IL6R trên *in vitro* của 13 chất tiềm năng được khảo sát bằng bộ KIT thử nghiệm ELISA cạnh tranh, xác định được IC₅₀ của 2 chất từ Drugbank (dabigatran và dacomitinib) và 1 dẫn chất flavonoid (quercetin). Hoạt tính ức chế cảm ứng tăng sinh tế bào ung thư HT-29 qua trung gian IL6 được khảo sát bằng thử nghiệm MTT, phát hiện được 4 chất từ Drugbank (dabigatran, dacomitinib, imatinib, entospletinib) và 2 dẫn chất flavonoid (quercetin và rhamnetin) từ thư viện chất nội bộ với nồng độ ức chế tăng sinh tế bào

được xác định.

4. Quy trình sàng lọc ảo được thiết lập có khả năng dự đoán tốt, được khẳng định bằng các kết quả thử nghiệm *in vitro*. Các mô hình này giải quyết cho những hạn chế của các nghiên cứu trước và cung cấp cơ sở dữ liệu đáng tin cậy cho các nghiên cứu thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc IL6, IL6R.

Các kết quả của nghiên cứu đã được công bố trên các bài báo thuộc các tạp chí quốc tế uy tín có phản biện, bao gồm tạp chí Plos One (Q1), Molecular Diversity (Q2) và Journal of Biomolecular Structure and Dynamics (Q1). Do đó, các luận điểm khoa học và kết luận trong công trình có độ tin cậy cao và có ý nghĩa về mặt khoa học.

d. Bố cục của luận án

Luận án gồm 134 trang: đặt vấn đề 2 trang, tổng quan tài liệu 33 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 19 trang, kết quả 38 trang, bàn luận 38 trang, kết luận và kiến nghị 3 trang, danh mục các công trình công bố của tác giả 1 trang. Luận án có 37 bảng, 53 hình, 200 tài liệu tham khảo gồm 200 tài liệu tiếng anh, 24 phụ lục thể hiện các kết quả và thông tin.

2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Interleukin 6 và đường truyền tín hiệu

- Cấu trúc và đặc điểm của IL6, thụ thể IL6R và gp130
- Sự tương tác giữa IL6/IL6R, gp130 và đường truyền tín hiệu của IL6 gây ra các bệnh lý liên quan

2.2. Thiết kế thuốc *in silico*

- Mô hình pharmacophore, mô hình gắn kết docking phân tử

- Đánh giá các thông số được động học ADMET
- Mô phỏng động lực học phân tử và tính toán năng lượng tự do gắn kết giữa protein và phối tử

2.3. Các phương pháp thử nghiệm lý sinh đánh giá khả năng gắn kết IL6, IL6R và phối tử

Tương tác protein-phối tử có thể được phân tích bằng các thử nghiệm liên kết khác nhau bao gồm các thử nghiệm gắn kết phối tử có đánh dấu, không đánh dấu, dựa trên hiện tượng phát quang hoặc nhiệt động học. Các kỹ thuật phổ biến nhất có thể kể đến bao gồm:

- Công nghệ truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang theo thời gian (TR-FRET)
- Quang phổ cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)
- Phép đo nhiệt lượng chuẩn độ đẳng nhiệt (ITC)
- Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA).

2.4. Thử nghiệm hoạt tính trên tế bào ung thư

Thử nghiệm so màu này dựa trên quá trình khử muối tetrazolium có màu vàng thành tinh thể formazan màu tím bởi các tế bào sống với hoạt động trao đổi chất.

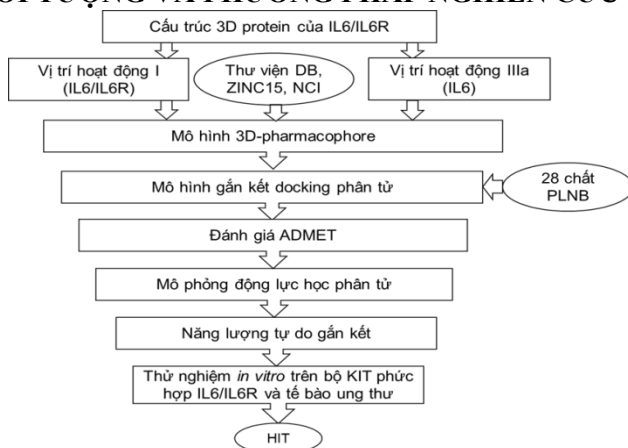
2.5. Các nghiên cứu liên quan

- Trong liệu pháp nhắm mục tiêu IL6, gp130 (tại vị trí IIIa tương tác với Leu57 và Trp157 của IL6) là mục tiêu đã được nhiều nghiên cứu quan tâm nhất. Điều này có thể được giải thích do chất ức chế gp130 có khả năng ức chế cả IL6, IL11 và một số cytokin khác thuộc họ IL6. Việc nhắm mục tiêu gp130, có thể ức chế tín hiệu của cả họ IL6 từ đó dẫn đến giảm viêm và

các rối loạn liên quan đến miễn dịch khác. Tuy nhiên, ức chế không chọn lọc trên IL6 cũng có thể gây ra nhiều tác dụng phụ.

- Trong những năm gần đây, với sự xuất hiện của đại dịch COVID-19, tương tác giữa IL6 và IL6R tại vị trí I trở thành đích nghiên cứu tiềm năng và được các nghiên cứu đặc biệt quan tâm. Đa phần các nghiên cứu *in silico* này chỉ mới dừng lại ở giai đoạn docking, chưa tiến hành phân tích chi tiết hơn tương tác linh động giữa protein và phối tử bằng phương pháp mô phỏng động lực học phân tử, điều này cũng có thể trở thành một trở ngại lớn cho các thử nghiệm *in vitro*, *in vivo*.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát

3.1. Đối tượng nghiên cứu

- Cấu trúc protein mục tiêu: đề tài chọn các mã protein có các “điểm nóng” tại vị trí tạo hoạt tính của IL6 (vị trí I và vị trí IIIa) cho nghiên cứu sàng lọc các cấu trúc phân tử có khả năng ức

chế sự tương tác giữa IL6 và các thụ thể. Đồng thời, độ phân giải của protein cũng được xem là tiêu chí quan trọng trong lựa chọn cấu trúc protein mục tiêu cho các thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc. Các protein phải có độ phân giải $<3 \text{ \AA}$ để có thể nhìn thấy rõ độ dài phân tử nước và liên kết hydro trong cấu trúc tinh thể (mã protein được chọn: 5FUC, 4ZS7 và 4CNI).

- Các tập thư viện cấu trúc phân tử nhỏ đa dạng và sẵn có như Ngân hàng thuốc (DB), ZINC15, thư viện thuốc chống ung thư quốc gia NCI, các chất PLNB sử dụng cho sàng lọc các chất tiềm năng ức chế tương tác IL6/IL6R và IL6/gp130.

- IL6 có mã UniproT P05231 và thụ thể IL6R có mã UniproT P08887 người tái tổ hợp tích hợp trong bộ KIT ức chế gắn kết IL6/IL6R được lựa chọn cho các thử nghiệm *in vitro*.

- Dòng tế bào HT-29, SW480, HepG2, Hu7, LNCaP do GS.TS. J.M. Pezzuto-Trường Đại học Long-Island, US và GS. Jeanette Maier-Trường Đại học Milan, Italia cung cấp được sử dụng cho thử nghiệm ức chế tăng sinh tế bào qua trung gian IL6.

3.2. Phương pháp nghiên cứu *in silico*

- Mô hình 3D-pharmacophore được xây dựng dựa vào các “điểm nóng” tại vị trí tương tác PPIs của IL6 và thụ thể (IL6R, gp130) bằng phần mềm MOE 2022.02.

- Dựa trên các acid amin quan trọng tại vị trí tương tác giữa IL6 và thụ thể (vị trí I và vị trí IIIa), 4 mô hình gắn kết docking phân tử tương ứng được thiết kế bằng phần mềm LeadIT2.1.8.

- Sàng lọc ảo qua các mô hình pharmacophore, mô hình docking phân tử và phân tích PLIF (MOE 2022.02) nhằm tìm

kiểm các cấu trúc phân tử nhỏ tiềm năng cho dự đoán các đặc tính dược động học ADMET (SwissADME và pkCSM).

- Mô phỏng động lực học phân tử (GROMACS 2018.1) và tính toán năng lượng tự do gắn kết (gmx_MMPBSA) trong thời gian 100 ns để đánh giá lực gắn kết của phối tử tiềm năng với protein.

3.3. Phương pháp nghiên cứu *in vitro*

- Thử nghiệm gắn kết chất ức chế vào protein IL6, IL6R, phần trăm ức chế liên kết (BI%) được xác định theo công thức:

$$BI\% = [(OD_{\text{đóichứng}} - OD_{\text{mẫu thử}}) / (OD_{\text{chứng dương}} - OD_{\text{mẫu trắng}})] \times 100$$

Màu của phản ứng thay đổi từ màu xanh sang màu vàng khi IL6 gắn với IL6R và màu vàng nhạt dần theo phần trăm ức chế gắn kết phức hợp IL6/IL6R. Phần mềm GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA) được sử dụng để xử lý số liệu, tính toán giá trị IC₅₀ và biểu diễn đồ thị.

- Thử nghiệm chất ức chế hoạt tính tăng sinh tế bào do IL6: tế bào HT-29 sau khi được kích thích tăng sinh bởi IL6 được tiếp xúc với các chất ức chế tiềm năng từ kết quả thử nghiệm *in silico*. Khi có chất ức chế gắn vào vị trí hoạt động của IL6, hoạt tính tăng sinh tế bào của IL6 sẽ bị ức chế và % tế bào sống giảm đi. Phần trăm cảm ứng tăng sinh của tế bào khi có mặt chất ức chế (TBS2) sẽ được quy đổi theo tỷ lệ tế bào HT-29 tăng sinh được hoạt hóa bởi IL6 (TBS1), và xác định thông qua công thức:

$$TBS2 = [(OD_{\text{mẫu thử}} - OD_{\text{mẫu trắng}}) / (OD_{\text{đóichứng}} - OD_{\text{mẫu trắng}})] \times TBS1$$

Khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL6 được xác định khi tỷ lệ giảm tế bào sống TBS2 so với đối

chúng TBS1 lớn hơn tỷ lệ độc tế bào được tính theo công thức:

$$(TBS1 - TBS2) > (100 - TBS3)$$

Phân tích ANOVA một chiều (GraphPad Prism 9) được áp dụng để đánh giá ý nghĩa thống kê của sự khác biệt giữa nhiều nhóm điều trị. Giá trị $P < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

4. KẾT QUẢ

4.1. Sàng lọc *in silico* các chất gắn kết IL6, IL6R từ các ngân hàng dữ liệu

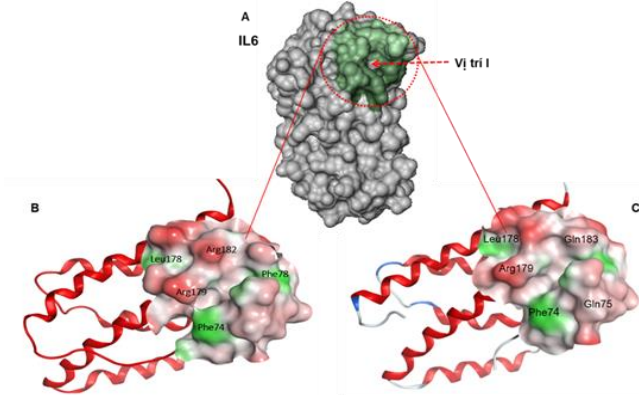
4.1.1. Mô hình 3D-pharmacophore

Mô hình 3D-pharmacophore cho các chất gắn kết IL6 và các chất gắn kết IL6R được xây dựng dựa vào tương tác PPIs của cấu trúc phức IL6/IL6R (mã PDB: 5FUC), cấu trúc phức IL6/6F82 (mã PDB: 4ZS7) tại vị trí I. Tương tác giữa các acid amin quan trọng tại vị trí này chính là cơ sở để đề tài tiến hành thiết lập các điểm đặc tính pharmacophore tương ứng cho từng mô hình. Kết quả có 2 mô hình Ph-IL6-1a và Ph-IL6-1b được xây dựng để sàng lọc các phân tử nhỏ gắn kết IL6 và 1 mô hình Ph-IL6R để sàng lọc các phân tử nhỏ gắn kết IL6R

4.1.2. Mô hình docking phân tử

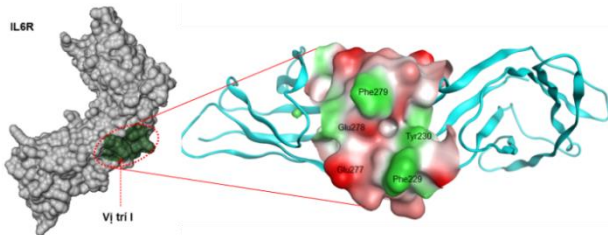
Khoang gắn kết trên IL6 được xác định dựa trên các acid amin mà IL6 tương tác với thụ thể IL6R và kháng thể 6F82. Kích thước khoang gắn kết được tinh chỉnh để che phủ tất cả các acid amin mà IL6 được chứng minh có tương tác với IL6R và kháng thể 6F82. Kết quả, đề tài đã xây dựng được 2 mô hình gắn kết docking phân tử tại vị trí I (**Hình 3.3**) trên 2 cấu trúc protein

IL6 được trích xuất từ cấu trúc phức hợp với thụ thể IL6R (D-IL6-1a) và kháng thể 6F82 (D-IL6-1b).



Hình 3.3. Mô hình gắn kết docking phân tử cho chất gắn kết IL6 tại vị trí I dựa trên tương tác với IL6R (D-IL6-1a, B) và với kháng thể 6F82 (D-IL6-1b, C).

Trên thụ thể IL6R, các acid amin quan trọng của IL6R tham gia gắn kết với IL6 bao gồm Phe229, Tyr230, Glu277, Glu278 và Phe229. Bán kính khoang gắn kết cần mở rộng trong phần mềm LeadIT 2.1.8 để bao phủ toàn bộ những acid amin này. Kết quả xây dựng được mô hình docking phân tử D-IL6R như minh họa ở **Hình 3.4**.



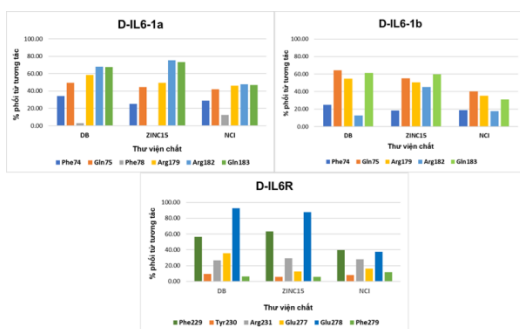
Hình 3.4. Mô hình gắn kết docking phân tử cho chất gắn kết IL6R

Các mô hình 3D-pharmacophore sau khi xây dựng được ứng dụng cho sàng lọc ba tập dữ liệu bao gồm ZINC15, NCI và DB để tìm kiếm các chất gắn kết trên IL6 và IL6R. Tiếp theo, các chất thỏa các mô hình pharmacophore và luật Lipinski cho các thuốc dùng đường uống được lựa chọn để tiến hành docking. Những chất có điểm số docking $< -20 \text{ kJ.mol}^{-1}$ được đánh giá có khả năng gắn kết mạnh với protein và được chọn cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

Tại vị trí I, đề tài sử dụng cấu trúc phức hợp IL6/IL6R và phức hợp IL6/kháng thể 6F82 bắt chước cấu trúc IL6R cho nghiên cứu. Vì vậy, những hợp chất có khả năng gắn kết tốt trên IL6 được dock chéo vào IL6R và ngược lại với mong muốn có thể tìm được những chất tối ưu gắn kết tốt đồng thời trên IL6 và IL6R. Khi phối tử gắn kết tối ưu trên cả IL6, IL6R sẽ làm tăng tần suất tiếp xúc giữa phối tử với cả hai protein trong cơ thể, từ đó có thể phong tỏa hoàn toàn tương tác giữa hai protein này và tạo điều kiện thuận lợi cho các nghiên cứu in vitro, in vivo về sau. Kết quả thu được 51 chất có khả năng docking tốt nhất trên khoang gắn kết IL6 (D-IL6-1a và D-IL6-1b) và IL6R (D-IL6R) với điểm số docking $< -20 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Việc dự đoán các thông số được động học ADMET được tiến hành cho 51 chất tiềm năng của đề tài trước khi thực hiện mô phỏng động lực học phân tử.

Từ kết quả docking, đề tài thực hiện phân tích tương tác protein-phối tử bằng công cụ PLIF trong MOE 2022.02 để quan sát sự tương tác của từng chất với các acid amin quan trọng hay còn gọi là “điểm nóng” trong khoang gắn kết. Mục đích của

quy trình phân tích PLIF nhằm đánh giá độ tin cậy của các mô hình 3D-pharmacophore và mô hình gắn kết docking phân tử thông qua tỷ lệ tương tác giữa các chất với các acid amin này. Tỷ lệ tương tác giữa các chất với các acid amin quan trọng tại khoang càng cao, chứng minh việc thiết lập các mô hình dựa trên đặc tính của các “điểm nóng” là hiệu quả và có độ tin cậy cao. Kết quả phân tích PLIF được trình bày ở các **Hình 3.6**.



Hình 3.6. Phân tích PLIF cho các chất DB, ZINC15 và NCI qua 3 mô hình gắn kết docking phân tử

4.1.3. Đánh giá các thông số dược động học ADMET

Các hợp chất được chọn từ kết quả docking phân tử được đề tài tiến hành đánh giá các thông số ADMET bằng công cụ trực tuyến SwissADME và pkCSM. Các chất được lựa chọn phải thỏa các điều kiện của thuốc phân tử nhỏ sử dụng đường uống về số nhóm liên kết cho HDB, số nhóm liên kết nhận hydro HBA, LopP, khối lượng phân tử MW, số liên kết quay RB, độ phân cực TPSA, khả năng tổng hợp hóa được SA, độ hấp thu GI cao, không phân bố qua hàng rào máu và có liều độc tính LD₅₀ nằm trong vùng an toàn.

Riêng đối với 28 chất PLNB, do các chất đã sẵn có cho thử nghiệm *in vitro* nên nghiên cứu chỉ tiến hành docking, chọn top 10 các chất có điểm số docking tốt nhất và tiến hành trực tiếp mô phỏng động lực học phân tử với IL6, IL6R.

4.1.4. Mô phỏng động lực học phân tử

Mô phỏng động lực học phân tử trên IL6 và phối tử

28 hợp chất thỏa tiêu chí ADMET từ 3 CSDL (ZINC15, DB và NCI) cùng 10 HCPLNB có kết quả docking tốt nhất được chọn tiến hành MD để đánh giá chi tiết hơn khả năng tương tác của các phối tử này với các acid amin quan trọng tại vị trí I của IL6.

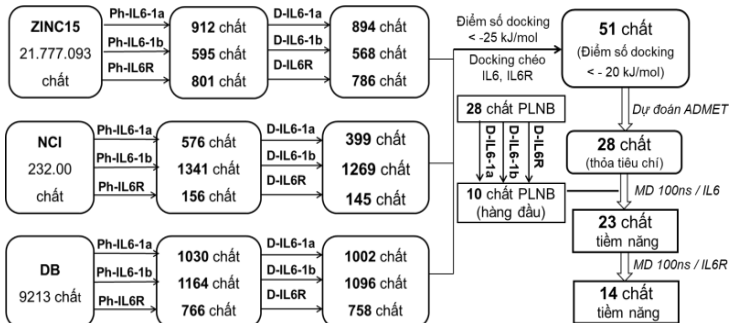
Giá trị RMSD_{protein} trong phức hợp $\leq$ apoprotein trong suốt thời gian mô phỏng MD 100 ns chứng tỏ sự tương tác với phối tử làm tăng độ ổn định cấu trúc protein. Giá trị RMSD_{phối tử} khoảng 2 Å cho thấy phối tử liên kết ổn định với protein tại khoang gắn kết. Giá trị trung bình của SASA và Rg tương tự apoprotein, như vậy phối tử hầu như không can thiệp vào sự giãn nở, cơ chế gấp cuộn và độ nén của protein. Phạm vi biến động hẹp của RMSF (< 2 Å) tại vị trí hoạt động chứng tỏ rằng tất cả các phức hợp IL6 liên kết bền.

Tỷ lệ liên kết H giữa các phối tử với các acid amin quan trọng tại khoang gắn kết của IL6 ở vị trí I bao gồm Phe74, Gln75, Phe78, Arg179, Arg182 và Gln183 được phân tích. Phối tử có tỷ lệ liên kết H $> 75\%$ với các acid amin này được coi là liên kết H mạnh và ổn định với protein. Thông qua việc so sánh các giá trị RMSD protein, RMSD phối tử, SASA, Rg, RMSF và tỷ lệ liên kết H, 23 phức hợp IL6-phối tử được chọn để tính

toán năng lượng tự do gắn kết bằng công cụ gmx_MMGBSA. Kết quả, 23 phức hợp đều mang giá trị $\Delta G_{\text{gắn kết}} < -15 \text{ kcal.mol}^{-1}$ cho thấy ái lực gắn kết tốt với protein

Mô phỏng động lực học phân tử trên IL6R và phối tử

23 hợp chất tiềm năng cho tương tác mạnh và ổn định với IL6 được tiếp tục tiến hành MD trên IL6R nhằm mục tiêu tìm kiếm các chất phù hợp cho các thử nghiệm *in vitro*. 15 hợp chất có giá trị trung bình RMSD protein, SASA và Rg tương tự apoprotein-IL6R, RMSD phối tử khoảng 2 Å, dao động RMSF tại các acid amin quan trọng tại khoang gắn kết IL6R $< 2 \text{ Å}$ và tỷ lệ liên kết H với các “điểm nóng” $> 75\%$ được chọn để tính toán năng lượng tự do gắn kết. Kết quả, hầu hết các phối tử đều thể hiện ái lực gắn kết bền với protein, ngoại trừ DB13164 chỉ đạt $\Delta G_{\text{gắn kết}} = -10,80 \pm 4,75 \text{ kcal.mol}^{-1}$ không phù hợp với tiêu chí chọn chất cho thử nghiệm *in vitro*. Cuối cùng, kết quả của toàn bộ quy trình sàng lọc *in silico* chất gắn kết IL6, IL6R tại vị trí I từ các ngân hàng dữ liệu được trình bày như **Hình 3.13**.

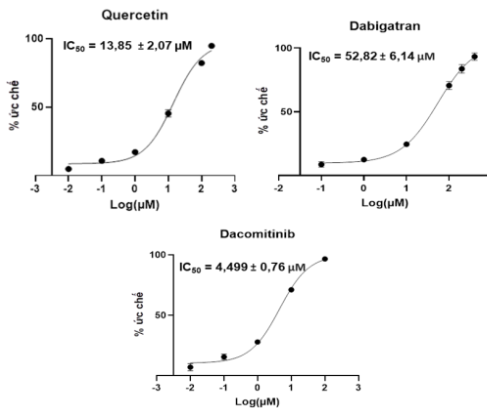


Hình 3. 13. Kết quả sàng lọc *in silico* các chất gắn kết IL6, IL6R tại vị trí I từ các ngân hàng dữ liệu

4.2. Đánh giá *in vitro* các chất tiềm năng trên khả năng ức chế gắn kết phức hợp IL6/IL6R, khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL6

4.2.1. Thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế gắn kết phức hợp IL6/IL6R

Đề tài tiến hành khảo sát khả năng ức chế gắn kết của 13 hợp chất tiềm năng từ kết quả *in silico* vào phức hợp IL6/IL6R (ngoại trừ ZINC83804241 do không tìm được nhà cung ứng). Thử nghiệm sàng lọc ban đầu được thực hiện ở nồng độ 100 μM bằng cách sử dụng bộ KIT thử nghiệm ELISA cạnh tranh ức chế gắn kết IL6/IL6R của công ty Ray BioTech. Chứng dương chi bao gồm phức hợp IL6/IL6R và chứng âm chỉ chứa dung môi được sử dụng để tính toán phần trăm ức chế của các hợp chất. Sau quá trình khảo sát ở các nồng độ khác nhau, đề tài đã xác định được giá trị IC_{50} của 3 hợp chất tiềm năng nhất bao gồm dabigatran, quercetin và dacomitinib như **Hình 3.14**.

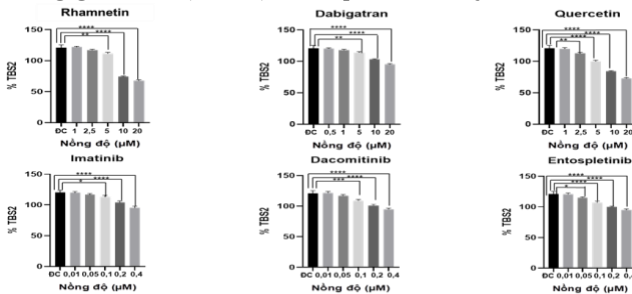


Hình 3. 14. Biểu đồ IC_{50} ức chế gắn kết phức hợp IL6/IL6R của quercetin, dabigatran và dacomitinib

4.2.2. Thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL6

Từ kết quả khảo sát tỷ lệ tăng sinh trên 5 dòng tế bào ung thư (LNCaP, HepG2, Hu7, HT-29 và SW480), tế bào HT-29 thể hiện khả năng tăng sinh mạnh nhất (> 21%) dưới tác dụng kích thích của IL6 ở nồng độ 50 ng/mL và thời gian 48 giờ (TBS1). Vì vậy, đề tài chọn dòng tế bào HT-29 gây ung thư đại tràng để khảo sát khả năng ức chế hoạt tính tăng sinh tế bào qua trung gian IL6 khi được nuôi cấy chung với 13 hợp chất tiềm năng từ nghiên cứu *in silico*.

Tương tự thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế gắn kết phức hợp IL6/IL6R, dựa trên kết quả các nồng độ đã được khảo sát, đề tài đã chọn được 6 chất ức chế tiềm năng bao gồm dabigatran, quercetin, rhamnetin, dacomitinib, entospletinib và imatinib để xác định khả năng ức chế tăng sinh tế bào HT-29 qua trung gian IL6 (TBS2). Kết quả trình bày ở **Hình 3.15**.



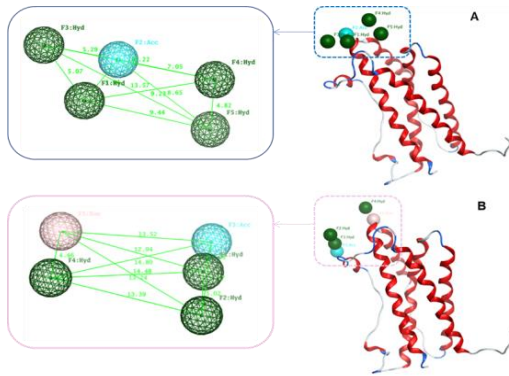
Hình 3. 15. Tỷ lệ tế bào sống (TBS2) khi có 6 chất ức chế imatinib, dacomitinib, entospletinib, dabigatran, quercetin, rhamnetin được hoạt hóa bởi IL6. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng với *P<0,05; ** P <0, 01;*** P <0,001;**** P<0,0001

Đồng thời, tỷ lệ tế bào sống (TBS3) dưới tác động của chất ức chế khi không được hoạt hóa bởi IL6 cũng được khảo sát nhằm loại trừ ảnh hưởng gây độc tế bào đến kết quả ức chế tăng sinh tế bào. Tại nồng độ chất ức chế không gây độc tế bào nhưng có khả năng ức chế tăng sinh tế bào được xác định là có tiềm năng ức chế hoạt tính IL6.

4.3. Sàng lọc *in silico* các chất gắn kết IL6 tại vị trí IIIa từ các ngân hàng dữ liệu

4.3.1. Mô hình 3D-pharmacophore

Tại vị trí IIIa, trong tương tác giữa IL6 và gp130 chỉ có các acid amin quan trọng trên IL6 được chứng minh đột biến, do đó đề tài chỉ tiến hành xây dựng mô hình 3D-pharmacophore để tìm kiếm các chất ức chế IL6. Cấu trúc tinh thể của phức hợp olokizumab/IL6 (PDB ID: 4CNI) được lựa chọn cho nghiên cứu bởi cấu trúc này mô tả rõ ràng phương thức hoạt động của olokizumab liên quan đến việc phong tỏa tối đa sự tương tác giữa IL6 và gp130. Mô hình pharmacophore được xem là tối ưu khi có từ 3-7 điểm đặc tính, do vậy nghiên cứu tiến hành thiết lập 2 mô hình 3D-pharmacophore với 5 điểm đặc tính cho mỗi mô hình dựa trên tương tác hóa học của 9 acid amin trên chuỗi nặng (H-olokizumab) và chuỗi nhẹ của olokizumab (L-olokizumab) với 7 acid amin quan trọng của IL6 (Leu57, Asn60, Ala153, Asn155, Gln156, Trp157 và Asp160). Kết quả thu được 2 mô hình cho chất gắn kết IL6 tại vị trí IIIa (Ph-IL6-3a1, Ph-IL6-3a2) như **Hình 3.17**.



Hình 3. 17. Các mô hình 3D-pharmacophore được xây dựng dựa trên PPIs với chuỗi nặng (Ph-IL6-3a1, A) và chuỗi nhẹ (Ph-IL6-3a2, B) của Olokizumab được ánh xạ trên các cấu trúc IL6.

4.3.2. Mô hình gắn kết docking phân tử

Tương tự vị trí I, tại vị trí IIIa, khoang gắn kết D-IL6-3a được tạo ra bởi công cụ FlexX bằng cách chọn 7 acid amin đóng vai trò quan trọng trong tương tác IL6/olokizumab bao gồm Leu57, Asn60, Ala153, Asn155, Gln156, Tryp157 và Asp160.

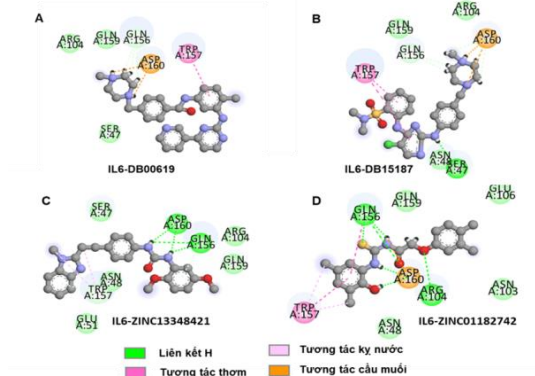
4.3.3. Đánh giá các thông số dược động học ADMET

Trước khi tiến hành mô phỏng động lực học phân tử, các hợp chất được chọn từ kết quả docking được đề tài tiến hành kiểm tra thêm về các thông số ADMET bằng công cụ trực tuyến SwissADME và pkCSM tương tự vị trí I. Các hợp chất có thông số dược động học không đáp ứng được đặc tính “giống thuốc” bị loại bỏ ở bước tiếp theo của quy trình sàng lọc.

4.4.4. Mô phỏng động lực học phân tử

Với 6 hợp chất có giá trị RMSD, RMSF, Rg và SASA ở dạng phức hợp nhỏ hơn hoặc tương tự dạng tự do, đề tài tiến hành

tính toán tỷ lệ liên kết H hình thành giữa các phối tử với protein. Kết quả tần suất chiếm đóng liên kết H kết hợp với tính toán năng lượng tự do gắn kết đã xác định được 4 chất tiềm năng cho gắn kết bền nhất với IL6 tại vị trí IIIa như **Hình 3.22**.

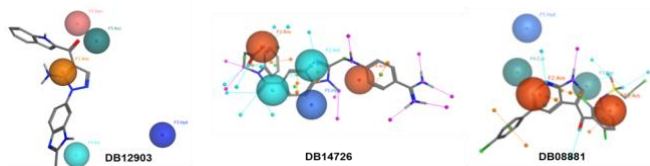


Hình 3.22. Sơ đồ tương tác chi tiết của 4 phối tử tiềm năng với các acid amin quan trọng của IL6.

5. BÀN LUẬN

5.1. Sàng lọc *in silico* các chất gắn kết IL6, IL6R tại vị trí I từ các ngân hàng dữ liệu

Tình hiệu quả và độ tin cậy của các mô hình này được xác định thông qua phân tích PLIF và sự ánh xạ cấu trúc của 3 hợp chất cho kết quả docking tốt nhất lên 3 mô hình Ph-IL6-1a, Ph-IL6-1b, Ph-IL6R được mô phỏng như **Hình 4.1**. Cấu trúc mang nhiều vòng thơm và mạch nhánh kỵ nước thể hiện rõ sự phù hợp với các điểm Hyd và Aro. Cấu trúc chứa N^+ và CO^- cho thấy sự phù hợp với các điểm Cat và Ani; các nhóm chức mang H (-OH, -NH₂) tương thích với điểm đặc tính Don và Acc.



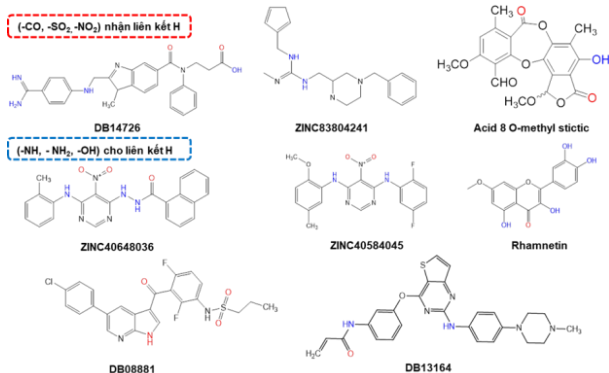
Hình 4. 1. Ảnh xạ của 3 chất tiềm năng của 3 mô hình gắn kết docking lên 3 mô hình pharmacophore

So với kết quả docking phân tử trong nghiên cứu của Zhou (2014), Sato (2022) và Sharma (2022), nghiên cứu này sàng lọc trên nguồn CSDL đầu vào lớn hơn (>20 triệu chất), sàng lọc được nhiều hợp chất tiềm năng và đa dạng về cấu trúc hơn. Kết quả docking được ghi nhận đồng thời trên cả IL6 và IL6R cho thấy khả năng tốt của các phối tử tiềm năng với hầu hết các acid amin quan trọng tại khoang gắn kết. Trong đó, quercetin là ví dụ điển hình để so sánh với nghiên cứu của Sharma. Nghiên cứu này cho thấy quercetin có thể gắn kết tốt đồng thời với 3/5 “điểm nóng” của IL6 và 4/5 “điểm nóng” của IL6R.

Hơn nữa, nghiên cứu này còn thực hiện đánh giá các đặc tính giống thuốc cho các ứng viên tiềm năng trước bước mô phỏng động lực học. Đây là bước nghiên cứu cần thiết giúp cho bước mô phỏng tốn nhiều thời gian và tài nguyên máy tính sẽ giúp tiết kiệm đáng kể chi phí nghiên cứu.

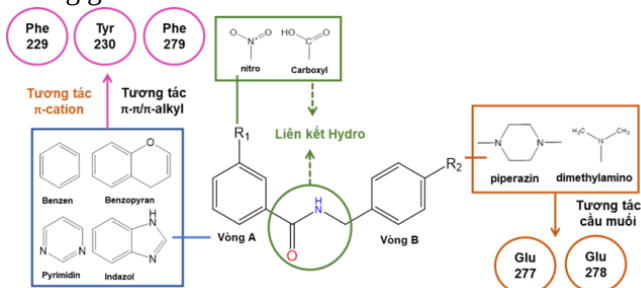
Thông qua phân tích và đánh giá các thông số động học, đề tài đã xác định được 8/23 cấu trúc tiềm năng nhất trong tương tác với IL6 (**Hình 4.4**). 8 phối tử mang nhiều nhóm chức có khả năng hình thành liên kết H với các acid amin quan trọng với tỷ lệ cao (>75%) và từ đó tạo ái lực gắn kết bền với protein mục

tiêu. Kết quả này cho thấy sự tương quan giữa các mô hình *in silico* với kết quả mô phỏng động lực học phân tử.



Hình 4. 4. Cấu trúc 2D của 8 chất gắn kết tiềm năng với IL6 tại vị trí I trong mô MD 100 ns mô phỏng

Cùng với kết quả mô phỏng MD 100 ns trên IL6R, đề tài đã xác định được 14/23 chất tiềm năng cho thử nghiệm *in vitro*. Trong đó, dựa trên cấu trúc của 4 phối tử tiềm năng nhất đề tài đã đề xuất được các nhóm chức cơ bản mà cấu trúc phối tử cần có để phối tử có thể tương tác tốt với các acid amin quan trọng tại khoang gắn kết IL6R như **Hình 4.7**.



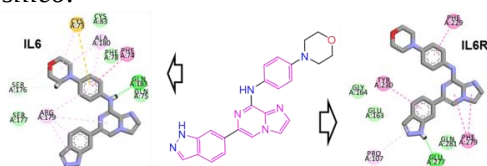
Hình 4. 7. Cấu trúc 2D của phối tử có thể cho tương tác tốt với các acid amin quan trọng tại khoang gắn kết của IL6R

4.2. Đánh giá *in vitro* các chất tiềm năng trên khả năng ức chế gắn kết phức hợp IL6/IL6R, khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL6

Kết quả thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế gắn kết phức hợp IL6/IL6R cho thấy sự tương quan với các nghiên cứu trước trên kit ELISA cạnh tranh của Krumm (2017) trên phức hợp PD-1/PD-L1 và Wang (2018) trên IL18/ectvIL-18BP. Đồng thời, so với kết quả *in silico*, kết quả gắn kết trên thử nghiệm ELISA cạnh tranh của DB14726 và quercetin không thể hiện sự bất đồng nào so với các kết quả nghiên cứu *in silico*. Chỉ có DB11963 chưa thể hiện được sự tương đồng khi chất này chỉ tạo liên kết H được với 2 acid amin thơm Phe229 và Tyr230. Tuy nhiên, $\Delta G_{\text{gắn kết}} < -21 \text{ kcal.mol}^{-1}$, điều này được giải thích do ái lực gắn kết giữa DB11963 và IL6R phần lớn được hình thành từ các loại tương tác khác như tương tác kỵ nước, tương tác thơm và tương tác cầu muối. Thêm vào đó, sự có mặt của các nhóm thế halogen như Cl, F trên vòng thơm cũng góp phần làm tăng ái lực gắn kết với các acid amin quan trọng của IL6R.

Đối với thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL6, đề tài cũng đã chứng minh được sự tương đồng giữa nghiên cứu này với các nghiên cứu *in silico* và nghiên cứu trước của 6 phối tử tiềm năng bao gồm dabigatran, quercetin, rhamnetin, entospletinib, imatinib và dacomitinib. Trong đó, entospletinib kết không hình thành liên kết H được với nhiều acid amin quan trọng và năng lượng liên kết $> -18 \text{ kcal.mol}^{-1}$ nhưng vẫn đạt kết quả *in vitro* khả quan.

Điều này có thể giải thích dựa vào cấu trúc của entos (**Hình 4.9**), phối tử này được cấu thành từ hệ thống nhiều vòng thơm liên hợp và thiếu các nhóm chức phân cực có thể tham gia liên kết H như hydroxyl (-OH) hay carbonyl (-CO). Năng lượng gắn kết của entos với IL6 và IL6R được tạo ra chủ yếu từ các tương tác thơm và kỵ nước. Sự đóng góp của các loại năng lượng này vào tổng năng lượng tự do gắn kết được chứng minh yếu hơn so với liên kết H. Nhờ vậy, khả năng cạnh tranh ức chế gắn kết IL6/IL6R của entos lên đến gần 70% ở nồng độ 200 μM . Có thể thấy rằng, kết quả đánh giá khả năng ức chế tăng sinh tế bào HT-29 qua trung gian IL6 của entos và 5 phối tử còn lại góp phần khẳng định tiềm năng dự đoán hoạt tính hiệu quả từ các mô hình *in silico*.



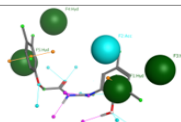
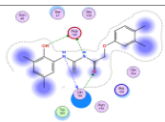
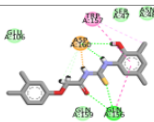
Hình 4. 9. Cấu trúc 2D và hình ảnh tương tác của entospletinib tại khoang gắn kết IL6, IL6R.

5.3. Sàng lọc *in silico* các chất gắn kết IL6 tại vị trí IIIa từ các ngân hàng dữ liệu

Tại vị trí IIIa, dựa trên cấu trúc phức hợp IL6/olokizumab, các mô hình *in silico* bao gồm pharmacophore và docking phân tử cũng được xây dựng dựa trên các “điểm nóng” trên IL6. Đánh giá các thông số dược động học ADMET được tiến hành trên các chất tiềm năng nhất được sàng lọc từ các mô hình *in silico* trước khi tiến hành mô phỏng động lực học phân tử. Thông qua

so sánh các thông số động học RMSD, RMSF, SASA và Rg, kết quả mô phỏng MD 100 ns đã phát hiện được 6 hợp chất tương tác tiềm năng nhất với IL6 tại khoang gắn kết và không gây biến dạng cấu trúc protein. Cuối cùng, việc tính toán tần suất liên kết H và năng lượng tự do gắn kết đã xác định được ZINC01183742 là phối tử tiềm năng nhất.

Đối chiếu với kết quả docking, ZINC01183742 có điểm số docking xếp thứ 38/41 các chất tiềm năng và chỉ hình thành liên kết H được với Gln156, Asp160. Khi quá trình tiếp xúc với IL6R dài hơn (100 ns), phối tử này càng thể hiện được tương tác mạnh và bền vững với các “điểm nóng”. Với cấu trúc không chứa nhiều nhóm chức phân cực, ZINC01183742 cho thấy khả năng hình thành tương tác kỵ nước rất tốt với khoang gắn kết của IL6 (**Bảng 4.10**). Điều này được minh chứng thông qua phân tích các thành phần $\Delta G_{\text{gắn kết}}$ khi tổng năng lượng bị chi phối chủ yếu bởi năng lượng van der Waals (E_{vdw}) từ các tương tác kỵ nước và năng lượng hòa tan phân cực (G_{GB}) thấp.

Mô hình 3D-pharmacophore	Mô hình docking	Mô phỏng MD
		
Ph-IL6-3a1	$\Delta G_{\text{gắn kết}} = -20,21 \text{ kJ.mol}^{-1}$	$\Delta G_{\text{gắn kết}} = -35,25 \text{ kcal.mol}^{-1}$

Bảng 4. 10. Kết quả đánh giá gắn kết ZINC01183742 với IL6 tại vị trí IIIa qua các mô hình sàng lọc *in silico*

6. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

6.1. Kết luận

Nghiên cứu này đã thực hiện được mục tiêu đặt ra ban đầu thông qua việc xây dựng các mô hình thiết kế *in silico* và đánh giá *in vitro*. Cụ thể:

- Sàng lọc *in silico* được 14 chất ức chế IL6, IL6R tiềm năng tại vị trí I từ các ngân hàng dữ liệu
- Đánh giá *in vitro* được 3 chất tiềm năng (dacomitinib, quercetin, dabigatran) trên khả năng ức chế gắn kết phức hợp IL6/IL6R và 6 chất tiềm năng (dacomitinib, entosletinib, imatinib, dabigatran, quercetin và rhamnetin) trên khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL6.
- Sàng lọc *in silico* được 4 chất ức chế IL6 tiềm năng tại vị trí IIIa từ các ngân hàng dữ liệu

6.2. Kiến nghị

Hướng phát triển tiếp theo trên IL6, IL6R và các chất ức chế rút ra từ nghiên cứu này được gợi ý:

- Mở rộng thư viện sàng lọc để tiếp tục tìm kiếm các chất mới có hoạt tính ức chế tương tác IL6 và thụ thể (IL6R và gp130).
- Phân tích chi tiết hơn các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả mô phỏng động lực học phân tử để làm rõ cơ chế gắn kết trên IL6, IL6R và các chất ức chế.
- Thử nghiệm với nhiều mô hình *in vitro* khác nhau để đánh giá khả năng ức chế tương tác IL6/IL6R và tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL6
- Dựa trên cấu trúc của các chất ức chế IL6, IL6R tiềm năng, có thể nghiên cứu thiết kế, tổng hợp và tối ưu hóa cấu trúc chất khởi nguồn tiềm năng.