

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ



TRẦN THỊ THÚY NGÀ

**SÀNG LỌC CÁC PHÂN TỬ NHỎ
CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ TƯƠNG TÁC
INTERLEUKIN-8 VÀ THỤ THỂ CXCR1/2**

Ngành: Dược lý – Dược lâm sàng

Mã số: 9720205

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh, năm 2024

Công trình được hoàn thành tại:

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
- Thư viện Đại học Y Dược TP.HCM

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

1. Tran T-T-N, Tran Q-H, Nguyen Q-T, Le M-T, Trinh D-TT, Thai K-M. Identification of potential interleukin-8 inhibitors acting on the interactive site between chemokine and CXCR2 receptor: A computational approach. *Plos one*. 2022;17(2):e0264385. doi: 10.1371/journal.pone.0264385
2. Tran TTN, Tran QH, Nguyen QT, Trinh DTT, Tran VH, Thai KM. LY3041658/interleukin-8 complex structure as targets for IL-8 small molecule inhibitors discovery using a combination of in silico methods. *SAR QSAR Environ Res*. 2022;33(10):753-778. doi: 10.1080/1062936X.2022.2132536.
3. Tran TTN, Tran QH, Duong CQ, Nguyen QT, Tran VT, Le MT, Thai KM. In silico approach to identify novel allosteric intracellular antagonist for blocking the interleukin-8/CXCR2 receptor signaling pathway. *J Biomol Struct Dyn*. 2023:1-14. doi: 10.1080/07391102.2023.2171136.

1. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Interleukin-8 có vai trò quan trọng trong hóa ứng động bạch cầu trung tính cũng như thúc đẩy sự hình thành mạch, tăng sinh, xâm lấn và di căn của các tế bào khối u, do đó liên quan mật thiết đến các bệnh lý viêm và ung thư. Vai trò IL-8 được thể hiện qua tương tác với hai thụ thể CXCR1/2, tại vị trí hoạt động (*orthosteric*) ở ngoại bào. Bên cạnh đó, một vùng gắn kết dị lập thể (*allosteric*) ở nội bào cũng đã được phát hiện đối với CXCR1/2. Vì vậy, tìm kiếm các chất gắn kết vào vị trí *orthosteric* hoặc *allosteric* dẫn đến ngăn chặn tương tác IL-8 và các thụ thể, là các chiến lược phát triển thuốc tiềm năng trong điều trị các bệnh lý kể trên. Trong gần hai thập kỷ qua, các thuốc phân tử nhỏ hay kháng thể đơn dòng với đích tác động là IL-8 và thụ thể cũng đã được nghiên cứu. Tuy nhiên các liệu pháp trên vẫn đang tồn tại một số hạn chế như chi phí cao, hiệu quả thấp hoặc dược động học kém. Đặc biệt, cho đến nay chưa có chất phân tử nhỏ ức chế IL-8/CXCR1/2 tại vị trí *orthosteric* được công bố với lý do chính đến từ việc thiếu cấu trúc thực nghiệm và thông tin tương tác trong phức hợp IL-8 và thụ thể tại vị trí này.

Cùng sự phát triển vượt bậc của lĩnh vực thiết kế thuốc có sự hỗ trợ của máy tính hiện nay (nghiên cứu *in silico*), đồng thời cấu trúc 3D với độ phân giải cao của phức hợp IL-8 và thụ thể mới được công bố trong thời gian 2020-2023 đã xác định rõ tương tác protein-protein tại các acid amin quan trọng với nghiên cứu thực nghiệm đột biến điểm, đề tài “Sàng lọc các phân tử nhỏ

có khả năng ức chế tương tác interleukin-8 và thụ thể CXCR1/2” được thực hiện.

b. Mục tiêu nghiên cứu

- (1) Sàng lọc *in silico* các cấu trúc phân tử nhỏ có khả năng ức chế tương tác IL-8/CXCR1/2 tại vị trí hoạt động (*orthosteric*).
- (2) Sàng lọc *in silico* các cấu trúc phân tử nhỏ có khả năng ức chế tương tác IL-8/CXCR2 tại vị trí dị lập thể (*allosteric*).
- (3) Đánh giá khả năng ức chế tương tác IL-8/CXCR2 và ức chế tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL-8 của các chất tiềm năng bằng thử nghiệm *in vitro*.

c. Những đóng góp mới của nghiên cứu

Đề tài đã xây dựng các mô hình sàng lọc *in silico* theo cách tiếp cận dựa trên cấu trúc protein phức hợp và thông tin tương tác tại các acid amin quan trọng ở vị trí *orthosteric* và *allosteric* trên mục tiêu IL-8 và thụ thể CXCR1/2. Qua đó, xác định 21 chất gắn kết tốt nhất trên thụ thể CXCR2 cũng như dự đoán các đặc tính dược động học và độc tính. Đánh giá hoạt tính bằng thử nghiệm *in vitro* thu được các ứng viên có khả năng ức chế gắn kết IL-8/CXCR2 và ức chế tăng sinh tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNCaP qua trung gian IL-8, làm cơ sở cho việc nghiên cứu các tác nhân điều trị ung thư hướng đích.

d. Bố cục của luận án

Luận án có 124 trang được trình bày đầy đủ các phần theo quy định, gồm Đặt vấn đề (02 trang), Tổng quan tài liệu (31 trang), Đối tượng và phương pháp nghiên cứu (20 trang), Kết quả (34 trang), Bàn luận (34 trang), Kết luận (02 trang), Kiến nghị

(01 trang). Luận án gồm 33 bảng và 57 hình, 186 tài liệu tham khảo gồm 2 tài liệu tiếng Việt và 184 tài liệu tiếng Anh, 17 phụ lục và 3 bài báo đính kèm minh họa cho kết quả quá trình thực hiện nghiên cứu.

2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Sự tương tác IL-8 và thụ thể CXCR1/2

Các nghiên cứu trước đây đã đề xuất một cơ chế tương tác giữa IL-8 với CXCR1/2 tại vị trí hoạt động gồm giữa vòng N của IL-8 với đầu N của thụ thể (vị trí 1) và giữa đầu N của IL-8 và các acid amin ở vòng ngoại bào của thụ thể (vị trí 2). Hơn nữa, thông tin tương tác tại vị trí 2 đã được xác định rõ trong công bố của các nhóm tác giả Ishimoto (IL-8/CXCR1) và Liu K (IL-8/CXCR2). Đặc biệt, các nghiên cứu trên cũng ghi nhận những acid amin quan trọng tham gia gắn kết tại vị trí này thông qua thử nghiệm đột biến điểm. Các đột biến trên Glu4, Leu5, Arg6 của IL-8, Tyr188, Arg203, Asp265 của CXCR1 và Tyr197, Arg208, Arg212, Arg278 của CXCR2 khi được thay thế bằng Ala cho thấy sự giảm ái lực gắn kết giữa IL-8 và thụ thể.

2.2. Nghiên cứu sàng lọc *in silico*

Thiết kế thuốc có sự hỗ trợ của máy tính hay còn gọi là nghiên cứu *in silico* có thể được phân loại thành thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc, phối tử và thiết kế *de novo*. Trong thời gian gần đây, số lượng cấu trúc 3D protein với độ phân giải cao công bố ngày càng nhiều nên thiết kế dựa trên cấu trúc được quan tâm và phát triển mạnh. Cách tiếp cận dựa trên cấu trúc thường bao gồm mô hình pharmacophore, docking phân tử, mô phỏng động lực

học phân tử và năng lượng gắn kết tự do.

2.3. Thử nghiệm đánh giá hoạt tính *in vitro*

2.3.1. Thử nghiệm đánh giá tương tác protein-phối tử

Trong các phương pháp đánh giá sự tương tác liên quan đến IL-8/CXCR1/2, thử nghiệm ELISA được chọn cho nghiên cứu sàng lọc hiện tại bởi ưu điểm độ nhạy cao, khả năng lặp lại tốt, không yêu cầu phức tạp hay thiết bị đắt tiền và sự sẵn có của bộ kit thương mại.

2.3.2. Thử nghiệm đánh giá hoạt tính trên tế bào ung thư

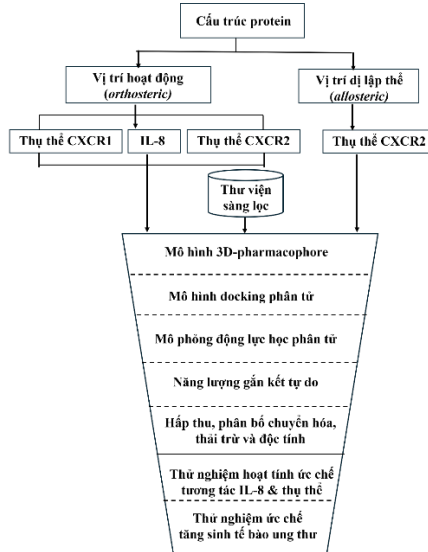
Thử nghiệm đo lường khả năng tăng sinh của tế bào ung thư với thuốc thử MTT (muối tetrazolium bromid) hiện là một trong những phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất với các ưu điểm gồm bản chất không phóng xạ, thực hiện nhanh, có giá trị định lượng và độ nhạy cao (có thể phát hiện 200 tế bào/giếng).

2.4. Các nghiên cứu liên quan đến đề tài

Phần lớn nghiên cứu *in silico* tìm kiếm các phân tử nhỏ ức chế tương tác IL-8/CXCR1/2 đã công bố theo cách tiếp cận dựa trên phối tử tại vị trí *allosteric* bởi thông tin tương tác tại vị trí *orthosteric* chưa được xác định rõ. Các chất đối kháng CXCR1/2 *allosteric* được dùng để tạo đặc tính pharmacophore và mô hình tương đồng CXCR2 nhằm dự đoán cách thức gắn kết giữa thụ thể với các chất tiềm năng trong docking phân tử. Tuy nhiên, mô hình tương đồng được ghi nhận thiếu độ chính xác so với cấu trúc NMR hoặc X-ray. Ngoài ra, ở hai nghiên cứu của các nhóm tác giả Thái Khắc Minh hay Lê Minh Trí không thực hiện mô phỏng động học phân tử để đánh giá khả năng tương tác của các phối tử

theo thời gian và trong điều kiện cấu trúc mục tiêu linh động, cũng như chưa tiến hành thử nghiệm *in vitro* để chứng minh hoạt tính sinh học thực sự của những chất tiềm năng này.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU



Hình 2.1. Tóm tắt sơ đồ nghiên cứu sàng lọc dựa trên cấu trúc

3.1. Phương pháp nghiên cứu *in silico*

Bốn cấu trúc phức hợp liên quan IL-8 và CXCR1/2, có mã PDB là 8IC0 (3,41 Å), 6LFO (3,41 Å), 6WZM (2,28 Å) và 6LFL (3,2 Å) được chọn để xây dựng mô hình pharmacophore, gắn kết docking phân tử, mô phỏng động lực học phân tử và tính năng lượng gắn kết tự do. Đồng thời, cơ sở dữ liệu gồm ngân hàng thuốc, ZINC, NCI, tập hợp chất phân lập nội bộ của Bộ môn Hóa Dược và tập chất chuẩn Viện kiểm nghiệm được sử dụng cho mục đích sàng lọc.

3.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính *in vitro*

3.2.1. Đánh giá khả năng ức chế tương tác IL-8/CXCR2

Khả năng ức chế tương tác IL-8/CXCR2 của chất thử được xác định bằng phương pháp ELISA với các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ kit thử nghiệm RayBiotech. Mẫu thử gồm hỗn hợp dung dịch chất thử và IL-8 được pha với dung dịch đệm 1X để có các nồng độ cuối của chất thử trong mỗi giếng đo là 100; 10, 1; 0,1 và 0,01 μM và của IL-8 là 1X. Song song, chuẩn bị các mẫu khác gồm mẫu trắng thử (hỗn hợp dung dịch giống mẫu thử nhưng thay chất thử bằng dung môi DMSO), mẫu chứng dương (dung dịch IL-8 1X) và mẫu trắng chứng (dung dịch đệm 1X). Phần trăm ức chế gắn kết IL-8/CXCR2 (% BI) xác định theo công thức:

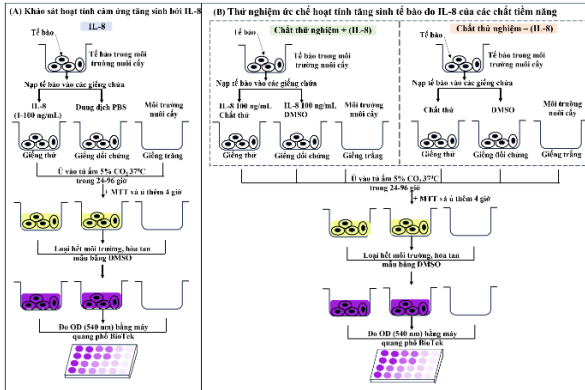
$$\% \text{ BI} = \frac{(OD_{T_{TT}} - OD_T)}{(OD_{CD} - OD_{T_{TC}})} \times 100$$

Trong đó: OD_{CD} , OD_T , $OD_{T_{TT}}$, $OD_{T_{TC}}$ lần lượt là mật độ quang của chứng dương, mẫu thử, mẫu trắng thử và mẫu trắng chứng.

Lập đồ thị tương quan giữa % BI theo nồng độ chất thử và xác định nồng độ của chất tiềm năng mà tại đó ức chế 50% khả năng gắn kết IL-8/CXCR2 (IC_{50}).

3.2.2. Đánh giá khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL-8

Nuôi cấy các dòng tế bào ung thư gồm Hela, A549, MCF-7, LNCaP, HT-29, HepG2 ở môi trường thích hợp đến mật độ 3×10^4 tế bào/mL. Nạp tế bào vào giếng, thêm IL-8 và/hoặc chất thử để có các nồng độ cuối cần khảo sát trong mỗi giếng (**Hình 2.6**).



Hình 2.6. Tóm tắt thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư do IL-8 cảm ứng

Phần trăm tế bào sống (%TBS1) khi có IL-8 được xác định:

$$\%TBS_1 = \frac{(OD_{thứ1} - OD_{trắng})}{(OD_{DC1} - OD_{trắng})} \times 100$$

Trong đó: $OD_{thứ1}$, OD_{DC1} : mật độ quang khi xử lý với IL-8, PBS và $OD_{trắng}$: mật độ quang của môi trường nuôi cấy tế bào.

Phần trăm tế bào sống khi có đồng thời IL-8 và chất thử (quy đổi theo tỷ lệ TBS1 do IL-8 cảm ứng) được xác định:

$$\%TBS_2 = \frac{(OD_{thứ2} - OD_{trắng})}{(OD_{DC2} - OD_{trắng})} \times \%TBS_1$$

Trong đó: $OD_{thứ2}$, OD_{DC2} : mật độ quang khi xử lý với IL-8 và chất thử, IL-8 và DMSO, $OD_{trắng}$: mật độ quang của môi trường.

Phần trăm tế bào sống (%TBS3) khi chỉ có chất thử (không hiện diện IL-8) được xác định thông qua công thức:

$$\%TBS_3 = \frac{(OD_{thứ3} - OD_{trắng})}{(OD_{DC3} - OD_{trắng})} \times 100$$

Trong đó, $OD_{thứ3}$, OD_{DC3} : mật độ quang khi xử lý với chất thử, DMSO và $OD_{trắng}$: mật độ quang của môi trường nuôi cấy.

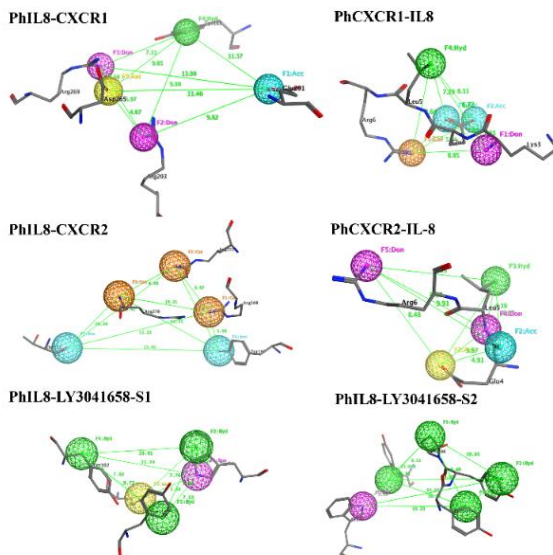
Hiệu quả ức chế tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL-8 được xác định thông qua tỷ lệ tế bào sống %TBS₂ giảm so với %TBS₁ lớn hơn tỷ lệ độc tế bào của chất thử, có nghĩa là $(\%TBS_1 - \%TBS_2) > (100 - \%TBS_3)$.

4. KẾT QUẢ

4.1. Sàng lọc *in silico* tại vị trí hoạt động (*orthosteric*)

4.1.1. Mô hình 3D-pharmacophore

Các mô hình 3D-pharmacophore đã xây dựng trong nghiên cứu được biểu diễn bằng 5 điểm đặc tính như **Hình 3.1, 3.2** và **3.3**.



Hình 3.1, 3.2 và 3.3. Các mô hình pharmacophore

Ghi chú: Hyd (xanh lá): Tương tác kỵ nước, Acc (xanh dương): Nhóm nhận liên kết hydro, Don (tím): Nhóm cho liên kết hydro, Ani (vàng): Nhóm tích điện âm, Cat (cam): Nhóm tích điện

ương. Khoảng cách giữa các điểm pharmacophore đo bằng angstrom (Å).

4.1.2. Mô hình gắn kết docking phân tử

Mô hình gắn kết docking phân tử xác định dựa trên các acid amin tham gia tương tác, với bán kính khoang gắn kết mở rộng 10 Å để bao phủ các acid amin trên và được mô tả như **Bảng 3.1**.

Bảng 3.1. Tóm tắt các mô hình docking phân tử

Mô hình docking phân tử	Khoang gắn bao phủ acid amin	Vị trí của acid amin trên protein
D-IL8-CXCR1/2	Lys3, Glu4, Leu5, Arg6, Gly31 và Pro32	Đầu N và vòng 30s của IL-8
D-IL8-LY3041658	Leu5, Arg6, Ile10, Tyr13, Ile40 và Leu49	Đầu N, vòng lặp N và sợi β 3 của IL-8
D-CXCR1-IL8	Tyr188, Arg203, Asp265, Arg269 và Glu291	Miền xuyên màng 7 và vòng ngoại bào 4 của CXCR1
D-CXCR2-IL8	Tyr197, Thr204, Arg208, Arg212, Arg278 và Thr285	Miền xuyên màng 5, 6 và vòng ngoại bào 2, 3 của CXCR2

4.1.3. Sàng lọc *in silico* qua các mô hình xây dựng

Tổng số chất thỏa mô hình pharmacophore cho các chất gắn kết trên IL-8 là 11.534 chất, trong khi đó mô hình cho các chất gắn kết trên CXCR1 và CXCR2 với số chất thỏa lần lượt là 1.636 và 1.143. Số chất dock thành công ở mỗi mô hình docking phân tử đều chiếm tỷ lệ rất cao (> 85%). Đồng thời, theo sự phân bố khoảng điểm số docking của các chất dock thành công, mô hình tìm kiếm chất gắn kết lên CXCR2 cho thấy tỷ lệ chất có điểm số

docking < -20 kJ.mol⁻¹ cao hơn so với các mô hình còn lại. Nghiên cứu tiếp tục chọn các chất có điểm số ≤ -20 kJ.mol⁻¹ và tương tác với các acid amin quan trọng trong mỗi khoang gắn kết. Theo đó, tổng số chất gắn kết tốt trên IL-8, CXCR1 và CXCR2 lần lượt là 19, 19 và 35 chất.

4.1.4. Mô phỏng động lực học phân tử và tính toán năng lượng gắn kết tự do

Mô phỏng động lực học phân tử 100 ns được tiến hành cho 35 chất có tiềm năng gắn kết trên mục tiêu CXCR2. Kết quả ghi nhận 19 chất có giá trị RMSD nhỏ hơn hoặc tương tự protein tự do, RMSF tại các acid amin quan trọng như Tyr197, Arg208, Arg212, Arg278 < 2 Å và tỷ lệ hình thành liên kết hydro $> 50\%$ với ít nhất một acid amin quan trọng của CXCR2. Như vậy, 19 chất này có khả năng tạo phức hợp ổn định và cách thức gắn kết tốt hơn tại vị trí hoạt động của CXCR2 so với các chất còn lại. Ngoài ra, năng lượng tự do gắn kết của 19 phối tử tiềm năng trên đều có giá trị âm, với $\Delta G_{\text{gắn kết}}$ dao động từ $-49,04 \pm 11,06$ đến $-13,25 \pm 5,25$ kcal.mol⁻¹.

4.1.5. Phân tích hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính (ADMET)

Trong 19 ứng viên tiềm năng sau quá trình MDs, một số chất đã được sử dụng trên lâm sàng như DB14726, DB11986, DB11963, DB08881, DB00619, cefazolin và cefixim, với tính chất dược động học và độc tính đã xác định rõ. Do vậy, nghiên cứu chỉ tiến hành dự đoán ADMET của 12 hợp chất còn lại. Phần lớn các chất có khả năng hấp thu qua đường tiêu hóa tốt (trừ

ZINC08426491, ZINC02200774, ZINC14657633, 7-ADCA) và không thâm qua hàng rào máu não (trừ chrysin 1a). Đa phần các chất được ghi nhận là cơ chất của P-gp và chất ức chế của ít nhất một trong 5 enzym CYP450 chính gồm CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 và CYP3A4. Ngoài ra, 2/12 hợp chất dự đoán gây độc tính trên gan (ZINC02200774) và độc tế bào (DB15327).

4.2. Sàng lọc *in silico* tại vị trí dị lập thể (*allosteric*)

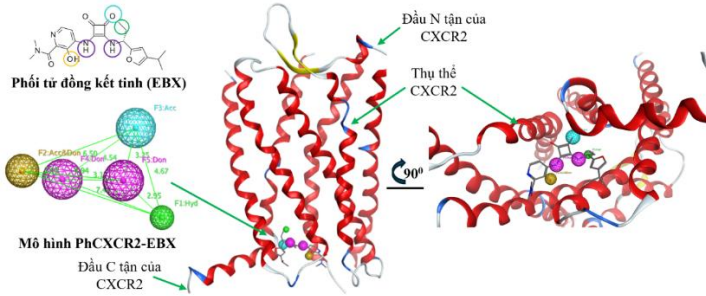
4.2.1. Mô hình 3D-pharmacophore

Mô hình pharmacophore (mô hình A) gồm năm đặc tính, đó là tương tác kỵ nước (F1), nhóm cho/nhận liên kết hydro (F2), nhóm nhận liên kết hydro (F3) và 2 nhóm cho liên kết hydro (F4, F5). Mô hình A được tiến hành đánh giá và kết quả mô tả ở **Bảng 3.7**. Sau quá trình tinh chỉnh thủ công bằng cách bổ sung các điểm thể tích loại trừ cũng như dung sai không gian của các đặc tính thu được mô hình B (PhCXCR2-EBX) với kết quả đánh giá tốt hơn (**Bảng 3.8**). Mô hình B (PhCXCR2-EBX) và sự giống hệt trên thụ thể CXCR2 như **Hình 3.21**.

Bảng 3.7 và 3.8. Kết quả đánh giá mô hình A và B

D	A	Ht	TP	FN	Se	Sp	Điểm GH	EF
Mô hình A								
296	8	52	5	47	0,625	0,837	0,19	3,56
Mô hình B								
296	8	14	4	10	0,5	0,965	0,33	10,57

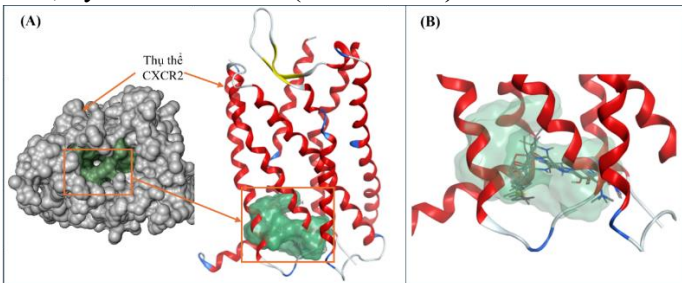
Ghi chú: D: tập chất sử dụng đánh giá mô hình, A: số chất có hoạt tính, Ht: tổng số chất sàng lọc được, TP: số chất sàng lọc có hoạt tính, FN: số chất sàng lọc không hoạt tính, Se: độ nhạy, Sp: độ đặc hiệu, GH: điểm GH, EF: hệ số làm giàu.



Hình 3.21. Mô hình B và sự giống hàng lên CXCR2

4.2.2. Mô hình gắn kết docking phân tử

Mô hình gắn kết docking phân tử D-CXCR2-EBX được xác định dựa trên các acid amin của thụ thể CXCR2 tương tác với phối tử EBX, gồm Val69, Val72, Ile73, Ser81, Thr83, Asp84, Tyr314, Lys320 và Phe321 (**Hình 3.22A**).



Hình 3.22. Mô hình gắn kết docking phân tử (A) và 10 cấu dạng redocking của EBX trong khoang gắn CXCR2 (B)

Tiến hành bước đánh giá mô hình này bằng cách docking lại (redocking) chất ức chế tham chiếu EBX vào khoang gắn kết. Kết quả ghi nhận 10 cấu dạng của phối tử nằm trọn trong khoang gắn kết (**Hình 3.22B**), điểm số docking dao động từ $-25,23$ đến

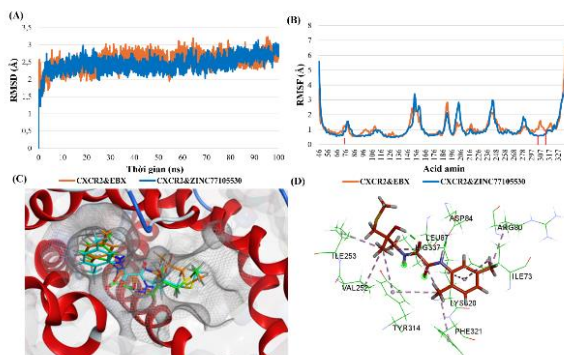
$-23,82 \text{ kJ.mol}^{-1}$ và tất cả giá trị RMSD $\leq 2 \text{ \AA}$. Cấu dạng tốt nhất là EBX1 với điểm số docking và giá trị RMSD lần lượt là $-25,23 \text{ kJ.mol}^{-1}$ và $1,658 \text{ \AA}$.

4.2.3. Sàng lọc *in silico* qua các mô hình xây dựng

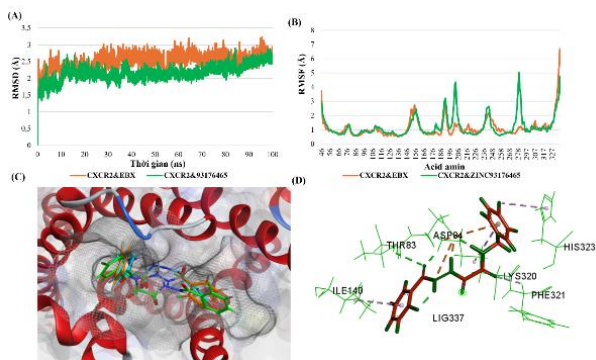
Kết quả sàng lọc thu được 9.450 chất thỏa mô hình PhCXCR2-EBX. Tiếp đến, 96,5% chất dock thành công và khoảng phân bố điểm số docking (-20 đến -10 kJ.mol^{-1}) chiếm tỷ lệ cao nhất với 67,9%. Trong đó, dựa trên kết quả “redocking” phối tử đồng kết tinh, có 108 chất với điểm số docking nhỏ hơn $-25,23 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Đặc biệt, 2 chất tiềm năng nhất, ZINC77105530 và ZINC93176465, hình thành tương tác với nhiều acid amin trong khoang gắn kết hơn EBX.

3.2.4. Mô phỏng động lực học phân tử và tính toán năng lượng gắn kết tự do

Kết quả MDs hai chất tiềm năng và phối tử tham chiếu EBX được thể hiện như **Hình 3.24** và **Hình 3.25**.



Hình 3.24. Kết quả MDs của phức CXCR2/ZINC77105530



Hình 3.25. Kết quả MDs của phức CXCR2/ZINC93176465 (A,B) RMSD và RMSF của CXCR2 trong phức với EBX và ZINC77105530 hoặc ZINC93176465, (C) Hình ảnh xếp chồng cấu dạng phối tử trong khoang CXCR2 tại thời điểm 0 ns (xanh lá), 50 ns (cam) và 100 ns (xanh dương), (D) Cấu dạng tương tác của ZINC77105530 hoặc ZINC93176465 tại 100 ns.

Thông qua RMSD, RMSF và khả năng tạo tương tác trong khoang CXCR2, các phức hợp trên cho thấy sự gắn kết ổn định theo thời gian. Bên cạnh đó, kết quả tính toán năng lượng gắn kết tự do của ba phức hợp CXCR2 với ZINC77105530, ZINC931765, EBX ghi nhận lần lượt là $-46,4 \pm 9,89 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $-36,57 \pm 4,35 \text{ kcal.mol}^{-1}$ và $-45,16 \pm 7,61 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

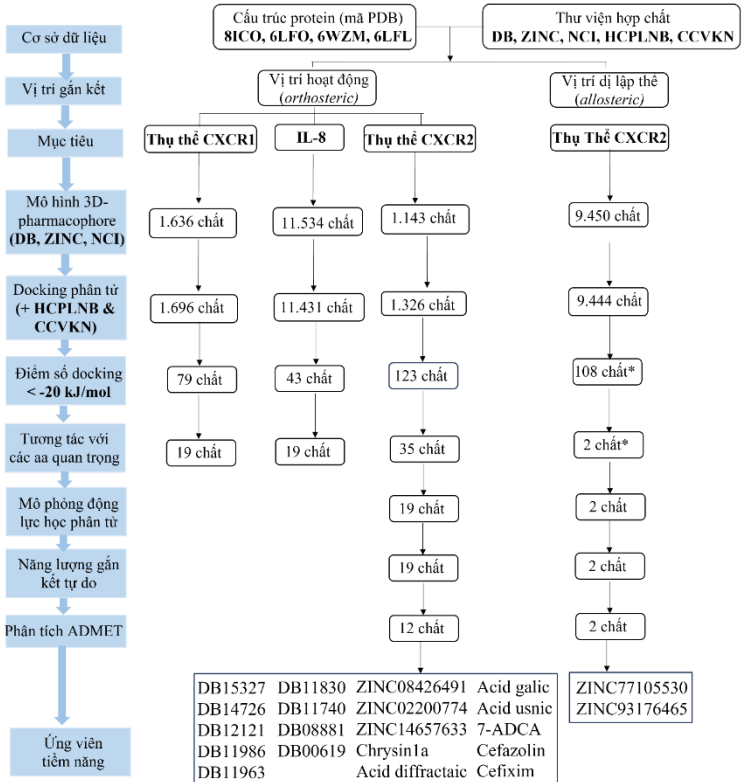
3.2.5. Phân tích ADMET

Các thông số lý hóa và đặc điểm dược động học của EBX, ZINC77105530 và ZINC931765 đều nằm trong phạm vi tối ưu, cho thấy cả hai ứng viên tiềm năng này có đặc tính giống thuốc, sinh khả dụng đường uống tốt, ít nguy cơ tương tác thuốc

và dễ tổng hợp. Ngoài ra, độc tính của các chất được thể hiện qua giá trị LD₅₀, thuộc khoảng 1.000 – 2.000 mg/kg, độc tính thấp tuy nhiên có thể gây hại khi dùng bằng đường uống.

Tóm tắt kết quả của phần nghiên cứu *in silico*

Kết quả sàng lọc *in silico* các chất tiềm năng ức chế tương tác IL-8/CXCR1/2 được tóm tắt như **Hình 3.27**.



Hình 3.27. Tóm tắt kết quả nghiên cứu sàng lọc *in silico*

Ghi chú: *chất có điểm số docking nhỏ hơn phối tử đồng kết tinh EBX (-25,23 kJ.mol⁻¹) và so sánh khả năng tương tác với EBX.

3.3. Kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính *in vitro*

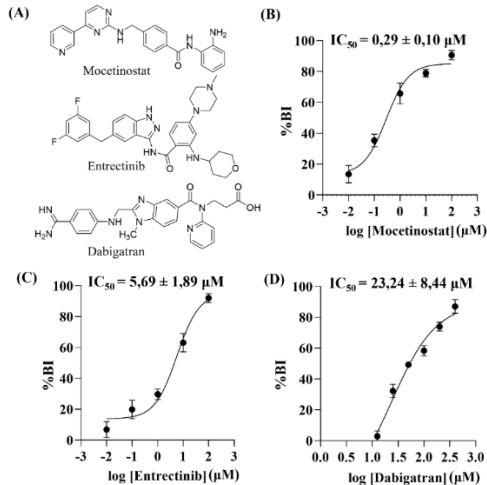
3.3.1. Đánh giá khả năng ức chế tương tác IL-8/CXCR2

Nghiên cứu chọn 16 chất tiềm năng từ sàng lọc *in silico* cho thử nghiệm đánh giá ức chế tương tác IL-8 và CXCR2 (5 chất thuộc thư viện ZINC không tìm được nhà cung cấp).

Bảng 3.13. Kết quả đánh giá ức chế tương tác IL-8/CXCR2 của các chất thử nghiệm tại nồng độ 100 μM

STT	Chất thử nghiệm	Tên khác	% ức chế tương tác IL-8/CXCR2
1	DB11986	Entrectinib	92,01 \pm 2,98
2	DB11830	Mocetinostat	90,60 \pm 3,02
3	DB14726	Dabigatran	58,39 \pm 3,38
4	Chrysin 1a	Tectohrysin	52,36 \pm 6,10
5	Cefixim	–	43,81 \pm 3,83
6	DB11740	Adavosertib	43,59 \pm 3,61
7	Acid gallic	–	35,59 \pm 1,24
8	Acid diffractaic	–	34,66 \pm 4,24
9	Acid usnic	–	30,17 \pm 2,83
10	Cefazolin	–	25,20 \pm 6,24
11	7-ADCA	Acid 7-aminodeacetoxy cephalosporanic	22,14 \pm 5,02
12	DB11963	Dacomitinib	13,88 \pm 2,50
13	DB00619	Imatinib	8,19 \pm 1,40
14	DB15327	Abivertinib	4,87 \pm 1,49
15	DB08881	Vemurafenib	2,79 \pm 3,08
16	DB12121	Entosplenib	1,70 \pm 0,45

Ba chất có tỷ lệ ức chế gắn kết IL-8/CXCR2 ở 100 μM cao nhất, được khảo sát thêm hoạt tính theo nồng độ (**Hình 3.28**).



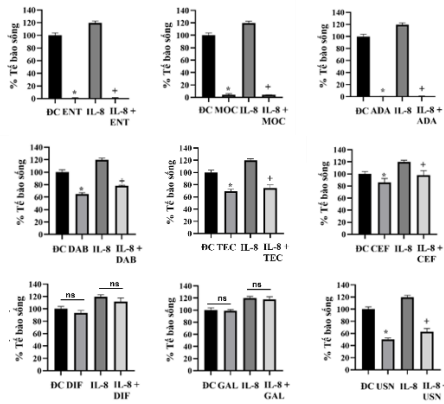
Hình 3.28. Hiệu quả ức chế tương tác IL-8/CXCR2 của ba chất tiềm năng theo nồng độ

3.3.2. Đánh giá khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư qua trung gian IL-8

Ở bước khảo sát IL-8 kích thích tăng sinh 6 dòng tế bào, nghiên cứu ghi nhận tỷ lệ tăng sinh cao nhất 19,68% trên dòng ung thư tuyến tiền liệt LNCaP với nồng độ IL-8 100 ng/mL, 72 giờ so với các tế bào còn lại, nên kết quả này được lựa chọn trong thử nghiệm tiếp theo. Đồng thời, 9 chất với tỷ lệ ức chế gắn kết IL-8/CXCR2 tốt nhất tại nồng độ 100 μM (**Bảng 3.13**) được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế tăng sinh tế bào LNCaP qua trung gian IL-8 với kết quả như mô tả ở **Hình 3.30**.

Các chất entrectinib, mocetinostat và adavosertib giảm gần như hoàn toàn số tế bào sống ở nồng độ 100 μM khi hiện

diện hay vắng mặt IL-8, thể hiện khả năng ức chế hoàn toàn sự tăng sinh cũng như gây chết tế bào xấp xỉ 100% (**Hình 3.30B, 3.30C và 3.30D**). Đồng thời, sự tăng sinh của các tế bào LNCaP do IL-8 thúc đẩy cũng đã giảm khi xử lý tế bào bằng dabigatran, tectochrysin và cefixim (**Hình 3.30A, 3.30E và 3.30I**). Tuy nhiên, việc bổ sung các chất như acid diffractaic, acid gallic và acid usnic hầu như không loại bỏ tăng sinh do IL-8 gây ra.

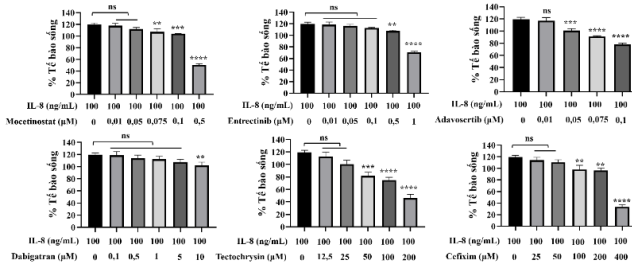


Hình 3.30. Tác động của IL-8 100 ng/mL và/hoặc các chất thử nghiệm tại nồng độ 100 μ M lên sự sống sót tế bào

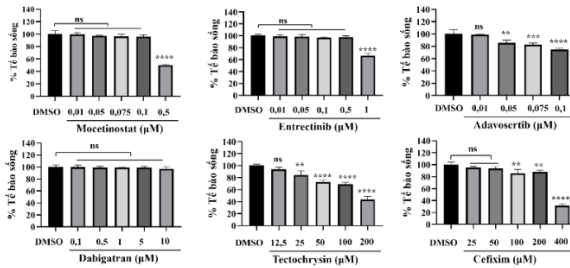
Ghi chú: ĐC: Đối chứng, DAB: Dabigatran, ENT: Entrectinib, MOC: Mocetinostat, ADA: Adavosertib, TEC: Tectochrysin, DIF: Acid diffractaic, GAL: Acid gallic, USN: Acid usnic, CEF: Cefixim. (* $p < 0,05$ so với ĐC, + $p < 0,05$ so với IL-8, ns: $p > 0,05$).

Theo đó, nghiên cứu chọn sáu chất tiềm năng nhất có tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào LNCaP để xác định thêm tác động này theo nồng độ, gồm entrectinib, mocetinostat,

adavosertib, dabigatran, tectochrysin và cefixim. Khả năng ức chế tăng sinh tế bào qua trung gian IL-8 của các chất được thể hiện như **Hình 3.31** và **Hình 3.32**.



Hình 3.31. Tỷ lệ tế bào sống do tác động IL-8 và 6 chất thử



Hình 3.32. Tỷ lệ tế bào sống do tác động của 6 chất thử nghiệm

Có thể thấy mocetinostat (0,075 – 0,1 μM), entrectinib (0,5 μM) và dabigantran (10 μM) ức chế tăng sinh tế bào LNCaP và không gây độc tế bào, trong khi adavostertib (0,05 – 0,1 μM), tectochrysin (50 – 200 μM) và cefixim (100 – 400 μM) có tác dụng chống tăng sinh đồng thời cũng gây độc tế bào.

5. BÀN LUẬN

5.1. Sàng lọc *in silico* tại vị trí hoạt động (*orthosteric*)

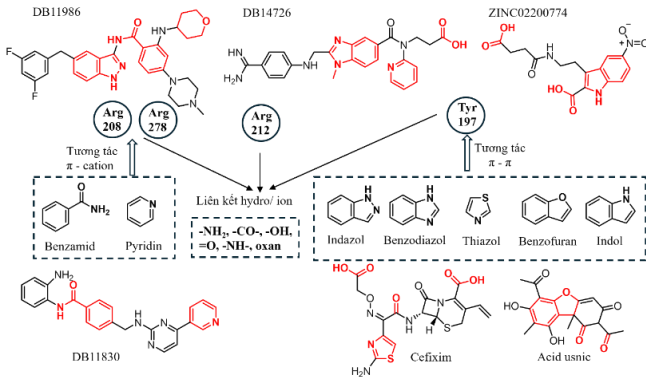
Tương tác protein-protein (PPI) là trung tâm của tất cả quá trình sinh học và là mục tiêu hấp dẫn để khám phá và phát triển

thuốc. Phân tích bề mặt tương tác cho thấy chỉ những acid amin quan trọng hay còn gọi “điểm nóng” (hot-spots) đóng góp chính cho năng lượng gắn kết. Do đó, mặc dù bề mặt PPI tương đối lớn nhưng việc thiết kế dựa trên các “điểm nóng” rất phù hợp với nhu cầu khám phá các chất phân tử nhỏ ức chế PPI với độ chọn lọc và độ đặc hiệu cao. Tương tác IL-8 và thụ thể CXCR1/2 được chứng minh có liên quan mật thiết đến bệnh lý viêm và ung thư. Để tìm kiếm các thuốc phân tử nhỏ ức chế tương tác IL-8/CXCR1/2, nghiên cứu hiện tại bước đầu xây dựng mô hình 3D-pharmacophore dựa trên cấu trúc phức và thông tin PPI với các “điểm nóng” trên bề mặt tương tác. Đây là cơ sở cần thiết cho hướng tiếp cận mới của đề tài so với các nghiên cứu trước đây về thiết kế và tổng hợp thuốc cấu trúc sinh học có nguồn gốc từ IL-8 hay CXCR1/2 để ức chế tương tác giữa chemokin và thụ thể. Theo đó, bằng cách “bắt chước” các acid amin quan trọng trên IL-8 hay thụ thể CXCR1/2, nghiên cứu đã thu được các mô hình sàng lọc hợp chất với đặc tính hóa học và không gian phù hợp để gắn kết trên mục tiêu IL-8 hoặc CXCR1/2.

Sàng lọc qua những mô hình đã xây dựng thu được các ứng viên có khả năng gắn tốt với IL-8 (19 chất) hay CXCR1 (19 chất) hoặc CXCR2 (35 chất). Kết quả này chứng minh khi đã biết vị trí mà phân tử nhỏ cần nhắm tới, việc định hướng không gian gắn hợp lý sẽ tạo điều kiện thuận lợi để sàng lọc các phối tử có khả năng liên kết hiệu quả và chọn lọc với protein mục tiêu so với docking mù như trong nghiên cứu của Boreak và cộng sự (2022).

Có sự thống nhất giữa kết quả gắn kết docking phân tử và mô

phông động lực học phân tử trong việc dự đoán 19 ứng viên có khả năng tạo phức hợp ổn định, cách thức tương tác và ái lực gắn kết tốt tại vị trí hoạt động của CXCR2. Trong đó, 6 phối tử cho thấy khả năng tương tác tốt nhất, hình thành liên kết hydro (> 50%) cũng như các liên kết khác (ion, kỵ nước) với tất cả acid amin quan trọng trên CXCR2 (Tyr197, Arg208, Arg210 và Arg278). Với 6 chất trên nghiên cứu đề xuất một số nhóm chức cần thiết trên cấu trúc của phối tử có khả năng gắn kết tốt với CXCR2 như mô tả ở **Hình 4.3**.



Hình 4. Các nhóm cấu trúc của 6 hợp chất tiềm năng

5.2. Sàng lọc *in silico* tại vị trí dị lập thể (*allosteric*)

Khác với cách tiếp cận dựa trên phối tử và mô hình tương đồng CXCR2 của các nhóm nghiên cứu trước đây như Ha (2015), Maeda (2015), Lê Minh Trí (2020) hay Thái Khắc Minh (2021), hai ứng viên tiềm năng nhất ức chế tương tác IL-8/CXCR2 tại vị trí *allosteric* trong nghiên cứu này gồm ZINC77105530 và ZINC93176465, được xác định dựa trên cấu trúc phức hợp giữa thụ thể CXCR2 và phối tử EBX, hiện là chất có hoạt tính ức chế

chọn lọc CXCR2 *allosteric* tốt nhất (IC_{50} 0,62 nM). Ưu điểm của thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc có thể xác định và lựa chọn thông tin cần thiết trên bề mặt tương tác so với thiết kế dựa trên phối tử. Theo đó, các đặc tính của mô hình sàng lọc được thiết lập thủ công tại những acid amin quan trọng trong vùng gắn kết và không phụ thuộc bởi các tính chất cố định của phối tử. Sự thống nhất trong các kết quả docking, mô phỏng động lực học phân tử cũng như năng lượng gắn kết tự do chứng minh ZINC77105530 và ZINC93176465 gắn kết tốt trong khoang CXCR2 tương tự chất tham chiếu EBX. Đồng thời, nghiên cứu ghi nhận cấu trúc oxalamid của hai hợp chất trên có liên quan đến khả năng ức chế tương tác IL-8/CXCR2 tại vị trí *allosteric*.

5.3. Thử nghiệm hoạt tính *in vitro*

5.3.1. Khả năng ức chế tương tác IL-8/CXCR2

Kết quả chứng minh entrectinib, mocetinostat và dabigatran ức chế sự tương tác IL-8/CXCR2 hiệu quả nhất trong thử nghiệm *in vitro* với IC_{50} lần lượt là $0,29 \pm 0,1 \mu\text{M}$, $5,69 \pm 1,89 \mu\text{M}$ và $23,24 \pm 8,84 \mu\text{M}$. Điều này cũng thể hiện sự tương đồng với kết quả *in silico*. Docking phân tử đã ghi nhận các chất này tham gia tương tác và chiếm vị trí chính xác cùng một khoang gắn kết tương tự mô típ ELR của IL-8 trên CXCR2. Đồng thời, ba chất trên cũng hình thành nhiều loại liên kết với các acid quan trọng của CXCR2 trong khoang như Tyr197, Arg208, Arg212 và Arg278 ở kết quả mô phỏng động lực học phân tử. Vai trò của các acid amin quan trọng này với ái lực gắn kết IL-8/CXCR2 đã

được xác nhận trong nghiên cứu của Liu K và cộng sự (2020).

5.3.2. Khả năng ức chế hoạt tính tăng sinh tế bào ung thư

Thử nghiệm trên 6 dòng tế bào cho thấy sự tăng sinh trên tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNCaP cao nhất với IL-8 100 ng/mL, trong 72 giờ. Kết quả này tương đồng với các nhóm nghiên cứu khác như Lee (2004), Araki (2007), Seaton (2008) hay Guo (2017). IL-8/CXCR1/2 thúc đẩy hoạt động của thụ thể androgen không phụ thuộc androgen được cho là cơ chế chính cho sự tăng sinh tế bào LNCaP. Một số nghiên cứu cũng chỉ ra IL-8 có thể gây tăng sinh của các tế bào ung thư tuyến tiền liệt bằng các cơ chế thay thế, gồm khả năng điều hòa sự dịch mã và biểu hiện của gen gây ung thư, cụ thể tăng biểu hiện cyclin D1 qua trung gian hoạt động kết hợp của tín hiệu Akt/mTOR và MAPK được thúc đẩy bởi IL-8 dẫn đến kích hoạt quá trình dịch mã.

Entrectinib, mocetinostat, adavosertib, dabigatran, tectochrysin và cefixim được chứng minh có khả năng ngăn chặn sự tương tác IL-8 và thụ thể, dẫn đến ức chế hoạt tính tăng sinh tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNCaP qua trung gian IL-8. Những phát hiện này có thể đóng góp vào cơ sở dữ liệu cho việc nghiên cứu và thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc hướng đến mục tiêu IL-8/CXCR1/2.

6. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

- Xác định 21 chất tiềm năng ức chế tương tác IL-8 và thụ thể dựa trên cấu trúc tại vị trí *orthosteric* và *allosteric* từ ngân hàng thuốc, ZINC, NCI, tập hợp chất phân lập nội bộ và tập chất chuẩn Viện kiểm nghiệm bằng quy trình sàng lọc *in silico*.
- Chứng minh khả năng ức chế tương tác IL-8/CXCR2 bằng thử

thực nghiệm *in vitro* cho 16 ứng viên và xác định 3 chất tiềm năng nhất là mocetinostat, entrectinib và dabigatran với giá trị IC_{50} lần lượt $0,29 \pm 0,10 \mu\text{M}$, $5,69 \pm 1,89 \mu\text{M}$ và $23,24 \pm 8,44 \mu\text{M}$.

- Xác định 3 chất ức chế tăng sinh tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNCaP và không gây độc tế bào gồm mocetinosat ($0,075 - 0,1 \mu\text{M}$), entrectinib ($0,5 \mu\text{M}$), dabigatran ($10 \mu\text{M}$) và 3 chất vừa ức chế tăng sinh vừa gây độc tế bào là adavosertib ($0,05 - 0,1 \mu\text{M}$), tectochrysin ($50 - 200 \mu\text{M}$) và cefixim ($100 - 400 \mu\text{M}$).

Qua đó, nghiên cứu đưa ra một số kiến nghị:

1. Sử dụng các mô hình đã xây dựng để sàng lọc trên những cơ sở dữ liệu khác và tìm kiếm thêm nhiều chất mới có tác dụng ức chế mục tiêu IL-8/CXCR1/2 cũng như đánh giá mô hình *in silico* tại vị trí *orthosteric* nếu có cấu trúc chất ức chế phân tử nhỏ công bố trong thời gian tới. Đồng thời, tiếp tục thực hiện MD 38 chất tiềm năng gắn kết trên IL-8/CXCR1 ở kết quả docking phân tử.
2. Mở rộng nghiên cứu ức chế sự tương tác IL-8/CXCR1 với cùng thử nghiệm ELISA để tìm kiếm các chất tiềm năng tác động kép trên CXCR1/2 hoặc sử dụng một số phương pháp đánh giá gắn kết khác phổ biến hiện nay như SPR hoặc FRET.
3. Thực hiện đánh giá hoạt tính sinh học của IL-8 cũng như những ứng viên tiềm năng sàng lọc được trên các quá trình khác của tế bào khối u như di chuyển, xâm lấn và di căn hay tiến hành các nghiên cứu về cơ chế nội bào qua trung gian IL-8/CXCR1/2 liên quan đến sự tăng sinh hay các tác dụng kể trên.