

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH



MAI THÀNH TẤN

**SÀNG LỌC *IN SILICO* VÀ *IN VITRO* CÁC CẤU TRÚC
PHÂN TỬ NHỎ CÓ KHẢ NĂNG TƯƠNG TÁC VỚI
INTERLEUKIN-33 VÀ THỤ THỂ ST2**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH, NĂM 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

MAI THÀNH TẤN

SÀNG LỌC *IN SILICO* VÀ *IN VITRO* CÁC CẤU TRÚC
PHÂN TỬ NHỎ CÓ KHẢ NĂNG TƯƠNG TÁC VỚI
INTERLEUKIN-33 VÀ THỤ THỂ ST2

NGÀNH: HÓA DƯỢC

MÃ SỐ: 9720203

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

GS. TS. THÁI KHẮC MINH

TP. HỒ CHÍ MINH, NĂM 2024

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất đến Thầy GS. TS. Thái Khắc Minh – người Thầy đã tận tình hướng dẫn tôi từ những ngày đầu tiên khi mới làm quen lĩnh vực thiết kế thuốc với sự trợ giúp của máy tính cho đến ngày hôm nay. Nhờ sự định hướng và hỗ trợ to lớn của Thầy, đề tài này mới có thể được phát triển và đạt được những kết quả như hiện tại.

Xin chân thành cảm ơn tất cả các Thầy Cô ở Hội đồng đánh giá luận án các cấp đã đọc và cho tôi những nhận xét vô cùng quý báu để hoàn thiện luận án này.

Xin chân thành cảm ơn các Thầy Cô và Anh Chị đồng nghiệp tại Bộ môn Hóa Dược, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh: Thầy GS. TS. Lê Minh Trí, Thầy GS. TS. Trần Thành Đạo, Thầy PGS. TS. Trương Phương, Cô PGS. TS. Huỳnh Thị Ngọc Phương, Cô PGS. TS. Võ Thị Cẩm Vân, Thầy TS. Trần Ngọc Châu, Chị TS. Huỳnh Nguyễn Hoài Phương, Anh TS. Tường Lâm Trường, ThS. Phan Minh Hoàng, Chị DS. Đặng Thị Hồng Chi và Chị CN. Ngô Thị Kiều Khương. Cảm ơn sự hỗ trợ và động viên của các Thầy Cô và Anh Chị đã dành cho tôi trong quá trình nghiên cứu tại Bộ môn, cũng như cho phép tôi sử dụng thư viện hợp chất nội bộ cho nghiên cứu sàng lọc ảo trong đề tài của mình.

Xin gửi lời tri ân đến Thầy TS. Nguyễn Quốc Thái và ThS. Nguyễn Kim Hưng đã cung cấp IL-33 tái tổ hợp để sử dụng cho các thử nghiệm *in vitro*. Không có sự hỗ trợ của Thầy và Hưng, đề tài này không thể nào hoàn thành một cách trọn vẹn.

Xin chân thành cảm ơn các Anh Chị tại Phòng Công nghệ sinh học Y Dược, Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh và Trung tâm Y sinh học phân tử, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. Nhờ sự hỗ trợ của Anh Chị mà thử nghiệm trên dòng tế bào của đề tài mới được triển khai và đạt được những kết quả khả quan.

Cảm ơn sự hỗ trợ của các Bạn là cựu sinh viên và sinh viên của Lab 314. Dù đi qua những chặng đường dài ngắn khác nhau, sự đồng hành của các Bạn luôn có ý nghĩa quan trọng và để lại trong tôi những kỷ niệm đẹp nhất.

Cuối cùng, xin cảm ơn Gia đình – những người thân yêu đã luôn bên cạnh và ủng hộ tôi trong quá trình thực hiện luận án.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 18 tháng 9 năm 2024

Mai Thành Tấn

LỜI CAM ĐOAN

Tôi tên là Mai Thành Tấn, là nghiên cứu sinh ngành Hóa Dược, khóa 2019–2022, xin cam đoan:

- (1) Luận án là do chính bản thân tôi thực hiện, dưới sự hướng dẫn khoa học của GS. TS. Thái Khắc Minh;
- (2) Các tài liệu tham khảo được tôi xem xét, chọn lọc kỹ lưỡng, trích dẫn và liệt kê tài liệu tham khảo đầy đủ;
- (3) Kết quả trình bày trong luận án được hoàn thành dựa trên các kết quả nghiên cứu của bản thân tôi và các kết quả của nghiên cứu này chưa được dùng cho bất cứ đề tài cùng cấp nào khác.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 25 tháng 9 năm 2024

Người hướng dẫn

Tác giả thực hiện

GS. TS. Thái Khắc Minh

Mai Thành Tấn

MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	i
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	iii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	ix
DANH MỤC CÁC SƠ ĐỒ, ĐỒ THỊ VÀ HÌNH.....	x
ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tổng quan về interleukin-33 và thụ thể ST2.....	3
1.2. Các phương pháp <i>in silico</i> trong khám phá thuốc phân tử nhỏ.....	18
1.3. Các phương pháp <i>in vitro</i> đánh giá tác động ức chế hoạt tính của IL-33/ST2	31
1.4. Tình hình nghiên cứu chất ức chế IL-33 và ST2.....	33
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.1. Thiết kế nghiên cứu	40
2.2. Đối tượng nghiên cứu.....	40
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	43
2.4. Phương pháp và công cụ đo lường, thu thập số liệu	44
2.5. Quy trình nghiên cứu.....	61
2.6. Phương pháp phân tích dữ liệu.....	63
2.7. Đạo đức trong nghiên cứu	63
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ	64
3.1. Cơ sở dữ liệu cấu trúc hóa học định hướng cho nghiên cứu sàng lọc <i>in silico</i> chất ức chế PPI.....	64
3.2. Khảo sát tương tác protein-protein của IL-33/ST2 và xác định các vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ trên mỗi protein bằng các công cụ máy tính.....	64
3.3. Mô hình sàng lọc <i>in silico</i> dựa trên cấu trúc mục tiêu IL-33 và ST2.....	79
3.4. Mô hình <i>in silico</i> dựa trên phối tử ức chế IL-33 và ST2.....	99
3.5. Thử nghiệm <i>in vitro</i> đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2	107

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	115
4.1. Cơ sở dữ liệu cấu trúc hóa học định hướng cho nghiên cứu sàng lọc <i>in silico</i> chất ức chế PPI.....	115
4.2. Khảo sát PPI của IL-33/ST2 và xác định các vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ trên mỗi protein bằng các công cụ máy tính.....	116
4.3. Mô hình sàng lọc <i>in silico</i> dựa trên cấu trúc mục tiêu IL-33 và ST2.....	130
4.4. Mô hình <i>in silico</i> dựa trên phối tử ức chế IL-33/ST2	136
4.5. Thử nghiệm <i>in vitro</i> đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2	140
NHỮNG ĐIỂM MỚI CỦA ĐỀ TÀI.....	148
KẾT LUẬN	149
KIẾN NGHỊ	151

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Từ viết đầy đủ bằng tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
1P3	Pyrimidine	
2D	Two dimensional	Hai chiều
3D	Three dimensional	Ba chiều
ACN	Acetonitrile	
ADMET	Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity	Hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính
ADN	Deoxyribonucleic acid	Acid deoxyribonucleic
AP-1	Activator protein 1	Protein hoạt hóa 1
AUC	Area under the curve	Diện tích dưới đường cong
BFE	Binding free energy	Năng lượng tự do gắn kết
BLI	Bio-layer interferometry	Giao thoa kế lớp sinh học
BMMC	Bone marrow-derived mast cells	Tế bào mast có nguồn gốc từ tủy xương
BNZ	Benzene	
CADD	Computer-aided drug design	Thiết kế thuốc với sự trợ giúp của máy tính
CCL	CC-chemokine ligand	Phối tử CC-chemokin
CD4	Cluster of differentiation 4	Cụm biệt hóa 4
CD8	Cluster of differentiation 8	Cụm biệt hóa 8
CM	Consensus Model	Mô hình đồng thuận
CMD	Cosolvent molecular dynamics	Động lực học phân tử đồng dung môi
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease	Bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính
CPU	Central processing unit	Đơn vị xử lý trung tâm
CSP	Chemical shift perturbations	Độ biến đổi dịch chuyển hóa học
CXCL2	CXC chemokine ligand	Phối tử CXC chemokin
DCCM	Dynamical cross-correlation matrix	Ma trận tương quan chéo động lực học
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Môi trường Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	Dimethyl sulfoxide	
dsDNA	Double-Stranded DNA	Sợi kép ADN

Từ viết tắt	Từ viết đầy đủ bằng tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
DUD	Directory of useful decoys	Danh mục hợp chất mỗi nhử hữu ích
EF	Enrichment factor	Hệ số làm giàu
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	Thử nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với enzym
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	Kinase được điều hòa bởi tín hiệu ngoại bào
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh thai bò
FcεR1	High-affinity receptor for the Fc region of immunoglobulin E	Thụ thể có ái lực cao với vùng Fc của globulin miễn dịch E
FSMC	Fetal skin-derived mast cells	Tế bào mast có nguồn gốc từ da của thai nhi
GH	Güner–Henry score	Điểm số Güner–Henry
GVHD	Graft-versus-host disease	Bệnh mảnh ghép chống chủ
HEK	Human embryonic kidney	Tế bào thận phôi thai người
hIL-33	Human interleukin-33	Interleukin-33 ở người
HMC	Human mast cell	Tế bào mast của người
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy	Phổ tương tác dị nhân qua một nối
HTMD	High-Throughput Molecular Dynamics	Động lực học Phân tử Thông lượng cao
HTRF	Homogeneous Time Resolved Fluorescence	Huỳnh quang phân giải thời gian đồng nhất
HTS	High-throughput screening	Sàng lọc thông lượng cao
IC ₅₀	Half-maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế 50%
IFN	Interferon	
Ig	Immunoglobulin	Globulin miễn dịch
IL	Interleukin	
IL-1RAcP	Interleukin-1 receptor accessory protein	Protein hỗ trợ của thụ thể interleukin-1
IL-33 _{FL}	IL-33 full-length	IL-33 có chiều dài đầy đủ
ILC2	Group 2 innate lymphoid cells	Tế bào bạch huyết bẩm sinh nhóm 2
IPA	Isopropanol	
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinases	Kinase hỗ trợ thụ thể IL-1R

Từ viết tắt	Từ viết đầy đủ bằng tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
ITC	Isothermal Titration Calorimetry	Chuẩn độ nhiệt lượng đẳng nhiệt
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Hiệp hội Quốc tế về Hóa học cơ bản và ứng dụng
JNK	c-Jun N-terminal kinase	Kinase N-tận c-Jun
K _D	Dissociation constant	Hằng số phân ly
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1	Protein liên kết với ECH giống Kelch 1
K _i	Inhibitory constant	Hằng số ức chế
LBP	Ligand-based pharmacophore	Pharmacophore dựa trên phối tử
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Protein kinase được kích hoạt bởi mitogen
mARN	Messenger RNA	ARN thông tin
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1	Protein hóa hướng động tế bào đơn nhân-1
MD	Molecular dynamics	Động lực học phân tử
mIL33R-Fc	Mouse soluble IL-33 receptor fused with human IgG1 Fc domain	Thụ thể IL-33R của chuột dung hợp với miền hằng định của globulin miễn dịch gamma-1
MixMD	Mixed-solvent molecular dynamics	Động lực học phân tử với hỗn hợp dung môi
MM-GBSA	Molecular mechanics – Generalized Born surface area	Cơ học Phân tử – Diện tích bề mặt Born Tổng quát
MM-PBSA	Molecular mechanics Poisson – Boltzmann surface area	Cơ học Phân tử – Diện tích bề mặt Poisson-Boltzmann
MS	Multiple sclerosis	Đa xơ cứng
MTS	((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)	
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	
MyD88	Myeloid differentiation primary-response protein 88	Protein đáp trả sơ cấp với sự biệt hóa tế bào dòng tủy 88
NCI	National Cancer Institute	Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B	Yếu tố nhân tăng cường chuỗi nhẹ kappa của các tế bào B hoạt động

Từ viết tắt	Từ viết đầy đủ bằng tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
NF-HEV	Nuclear Factor - High Endothelial Venules	Yếu tố nhân của tiểu tĩnh mạch giàu nội mô
NMA	<i>N</i> -methylacetamide	
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
NoMA	Normal Mode Analysis	Phân tích Chế độ Bình thường
NRF2	Nuclear factor erythroid 2–related factor 2	Yếu tố 2 liên quan yếu tố hạt nhân erythroid 2
NST		Nhiễm sắc thể
OD	Optical density	Mật độ quang
OECD	The Organization for Economic Cooperation and Development	Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế
OSA	Obstructive sleep apnea	Ngưng thở khi ngủ do tắc nghẽn
PAINS	Pan-assay interference compounds	Các hợp chất gây nhiễu liên thử nghiệm
PC	Predictiveness curves	Đường cong dự đoán
PCA	Principal component analysis	Phân tích thành phần chính
PDB	Protein Data Bank	Ngân hàng Dữ liệu Protein
PDBe-KB	The Protein Data Bank in Europe-Knowledge Base	Ngân hàng Dữ liệu Protein tại Châu Âu – Cơ sở tri thức
PH4	Pharmacophore	
PLD	Phospholipase D	
PPI	Protein-protein interaction	Tương tác protein-protein
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship	Mối liên quan định lượng giữa cấu trúc và tác động
RA	Rheumatoid arthritis	Viêm khớp dạng thấp
R _g	Radius of gyration	Bán kính quay
RMS	Root Mean Square	Căn bậc hai trung bình bình phương
RMSD	Root Mean Square Deviation	Căn bậc hai trung bình bình phương độ lệch
RMSF	Root Mean Square Fluctuation	Căn bậc hai trung bình bình phương độ dao động
ROC	Receiver Operating Characteristic	Đặc trưng của bộ nhận tín hiệu
ROCS	Rapid Overlay of Chemical Structures	Sự chồng phủ nhanh các cấu trúc hóa học

Từ viết tắt	Từ viết đầy đủ bằng tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
SAR	Structure-Activity Relationship	Mối liên quan giữa cấu trúc và tác động
SASA	Solvent Accessible Surface Area	Diện tích bề mặt tiếp cận dung môi
SAXS	Small-angle X-ray scattering	Tán xạ tia X góc nhỏ
SBP	Structure-based pharmacophore	Pharmacophore dựa trên cấu trúc mục tiêu
Se	Sensity	Độ nhạy
SEAP	Secreted embryonic alkaline phosphatase	Phosphatase kiềm tiết ra bởi phôi
SLE	Systemic lupus erythematosus	Lupus ban đỏ hệ thống
SMILES	Simplified molecular-input line-entry system	Hệ thống nhập liệu đơn giản dạng dòng cho phân tử
SMPPII	Small-molecule protein-protein interaction inhibitor	Chất phân tử nhỏ ức chế tương tác protein-protein
Sp	Specificity	Độ đặc hiệu
SPHK	Sphingosine kinase	
SPR	Surface plasmon resonance	Phổ cộng hưởng plasmon bề mặt
SSc	Systemic sclerosis	Xơ cứng bì hệ thống
sST2	Soluble ST2	Thụ thể ST2 dạng hòa tan
ST2	Suppression of tumorigenicity 2	Ức chế khối u 2
ST2 ^{ECD}	ST2 ectodomain	Miền ngoại bào của thụ thể ST2
ST2L	Transmembrane ST2 receptor form	Thụ thể ST2 dạng xuyên màng
SVM	Support Vector Machine	Máy vector hỗ trợ
TG	Total gain	Tổng mức thu được
T _H	T helper cell	Tế bào T hỗ trợ
THP-1	Tohoku Hospital Pediatrics-1	Dòng tế bào đơn nhân được phân lập từ máu ngoại biên của bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu đơn nhân cấp tính
TIR	Toll-interleukin-1 receptor	Thụ thể IL-1 chứa protein Toll
TNF	Tumor necrosis factor	Yếu tố hoại tử khối u
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor associated factor 6	Thụ thể yếu tố hoại tử khối u liên quan yếu tố 6

Từ viết tắt	Từ viết đầy đủ bằng tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
t-SNE	t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding	Phép nhúng láng giềng ngẫu nhiên phân bố t
VdW	<i>Van der Waals</i>	
Ya	Yield of actives	Tỉ suất hoạt tính

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Sự phân loại, thụ thể, đồng thụ thể và chức năng chính của các cytokin họ IL-1.....	4
Bảng 1.2. Ma trận nhầm lẫn của sàng lọc ảo trong thiết kế thuốc.....	20
Bảng 1.3. Các chỉ số đánh giá mô hình QSAR hồi quy	24
Bảng 2.1. Các cơ sở dữ liệu hóa học định hướng PPI được sử dụng cho quá trình sàng lọc ảo tìm kiếm chất ức chế IL-33/ST2.....	42
Bảng 3.1. Phân tích tương tác protein-protein giữa IL-33 và ST2 trong cấu trúc tinh thể.....	66
Bảng 3.2. PPI giữa IL-33/ST2 được khảo sát qua mô phỏng MD, với tần suất biểu hiện của các loại tương tác được tính toán trên dữ liệu 50 ns cuối của 5 quỹ đạo MD độc lập	67
Bảng 3.3. Các acid amin điểm nóng trên hai bề mặt tương tác của IL-33 và ST2 được đề xuất dựa trên kết quả mô phỏng MD và quét đột biến alanin	70
Bảng 3.4. Các túi gắn kết được phát hiện và xếp hạng bởi các công cụ tính toán dựa trên cấu trúc tĩnh tại vị trí PPI của IL-33/ST2.....	72
Bảng 3.5. Đánh giá các mô hình pharmacophore dựa trên phối tử ức chế ST2, với tập decoy được tạo bằng DUDE-Z.....	104
Bảng 3.6. Các mô hình QSAR-HB dự đoán hoạt tính ức chế IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33 sử dụng thông số mô tả phân tử 2D	106
Bảng 3.7. Kết quả sàng lọc thư viện hợp chất nội bộ qua các mô hình pharmacophore	107
Bảng 3.8. Các hợp chất được lựa chọn để đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2 <i>in vitro</i>	109

DANH MỤC CÁC SƠ ĐỒ, ĐỒ THỊ VÀ HÌNH

Hình 1.1. Các thành phần cấu trúc gen mã hóa và protein của IL-33	6
Hình 1.2. Tác động cytokin của IL-33	7
Hình 1.3. Cấu trúc không gian ba chiều của các dạng IL-33	9
Hình 1.4. Cấu trúc của thụ thể ST2	10
Hình 1.5. Sự tương tác của IL-33 với các thụ thể để thể hiện hoạt tính cytokin.....	12
Hình 1.6. Mô hình pharmacophore trong thiết kế thuốc với sự trợ giúp của máy tính	19
Hình 1.7. Một ví dụ về truy vấn ROCS.....	22
Hình 1.8. Nguyên tắc cơ bản của mô phỏng gắn kết phân tử.....	25
Hình 1.9. Nguyên tắc cơ bản của mô phỏng động lực học phân tử	27
Hình 1.10. Chu kỳ nhiệt động trong tính toán năng lượng tự do gắn kết của phức hợp protein–phối tử	30
Hình 1.11. Một số phân tử nhỏ có khả năng gắn kết và ức chế IL-33/ST2	36
Hình 2.1. Hướng tiếp cận sàng lọc <i>in silico</i> chất ức chế tương tác IL-33/ST2	40
Hình 2.2. Khung cấu trúc của các hợp chất đã được báo cáo có tác động ức chế IL-33/ST2 được sử dụng cho xây dựng mô hình <i>in silico</i> dựa trên phối tử.....	41
Hình 2.3. Hai phương pháp xây dựng mô hình pharmacophore dựa trên PPI	49
Hình 2.4. Quy trình xây dựng truy vấn ROCS và ứng dụng trong sàng lọc ảo	52
Hình 2.5. Quy trình xây dựng, đánh giá và ứng dụng mô hình pharmacophore dựa trên phối tử ức chế hoạt tính IL-33/ST2.....	53
Hình 2.6. Quy trình xây dựng mô hình QSAR dự đoán chất ức chế IL-33/ST2.....	55
Hình 2.7. Quy trình thực hiện thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33.....	58
Hình 2.8. Quy trình nghiên cứu tìm kiếm chất ức chế tương tác IL-33/ST2	62
Hình 3.1. Sự đóng góp của các acid amin điểm nóng trong PPI IL-33/ST2 được tính toán từ quá trình phân rã năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA dựa trên mô phỏng MD	68
Hình 3.2. Kết quả đồng thuận từ quá trình quét alanin trên cấu trúc IL-33 và ST2 sử dụng các máy chủ DrugScore ^{PPI} , BUDE Alanine Scan, MutaBind2 và PIIMS	69

Hình 3.3. Phức hợp của các cytokin họ IL-1 với thụ thể của chúng và sự minh họa của các vị trí gắn kết thực nghiệm của phối tử phân tử nhỏ trên các cytokin này	71
Hình 3.4. Các vị trí gắn kết tiềm năng trên IL-33 được xác định bởi mô phỏng MixMD.....	73
Hình 3.5. Kết quả mô phỏng MD thời gian dài 5 μ s cho phức hợp IL-33 và hợp chất 7c	76
Hình 3.6. Xác định vị trí gắn kết trên thụ thể ST2 với mô phỏng MixMD và NoMA	78
Hình 3.7. Mô hình gắn kết phân tử cho IL-33 tại hai vị trí của PPI với thụ thể ST2	79
Hình 3.8. Các mô hình mô phỏng gắn kết phân tử trên ST2.....	81
Hình 3.9. Các mô hình pharmacophore cho chất gắn kết IL-33 tại vị trí 1.....	82
Hình 3.10. Kết quả mô phỏng gắn kết phân tử của các chất thỏa mãn các mô hình pharmacophore trên vị trí 1 tại bề mặt PPI của IL-33.....	83
Hình 3.11. Sự tương tác của DB00158 và DB00642 với IL-33 trong mô phỏng MD 50 ns	85
Hình 3.12. Các mô hình pharmacophore cho sàng lọc chất ức chế ST2 tại vị trí 1.	86
Hình 3.13. Năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA giữa ST2 và các phối tử được khảo sát.	87
Hình 3.14. Phân tích quỹ đạo mô phỏng MD 100 ns và tính toán năng lượng tự do gắn kết của 4 hợp chất tiềm năng trên ST2	88
Hình 3.15. Tần suất hình thành tương tác giữa ST2 và 4 phối tử được khảo sát.....	89
Hình 3.16. Mô hình pharmacophore PH4-IL33-S2-1 tìm kiếm chất ức chế IL-33 tại vị trí 2	90
Hình 3.17. Các hợp chất dẫn đầu thu được từ quá trình sàng lọc ảo chất ức chế IL-33 tại vị trí 2 của PPI dựa trên mô hình pharmacophore PH4-IL33-S2-M1.....	92
Hình 3.18. Phân tích quỹ đạo mô phỏng MD 100 ns và tính toán năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA của các chất tiềm năng được sàng lọc từ mô hình PH4-IL33-S2-M1.	94
Hình 3.19. Mô hình pharmacophore dựa trên cấu trúc phức hợp IL-33/7c	95
Hình 3.20. Các hợp chất dẫn đầu thu được từ quá trình sàng lọc ảo chất ức chế IL-33 tại vị trí 2 của PPI dựa trên mô hình pharmacophore PH4-IL33-S2-M2.....	97

Hình 3.21. Phân tích quỹ đạo mô phỏng MD 100 ns và tính toán năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA của các chất tiềm năng được sàng lọc từ mô hình PH4-IL33-S2-M2.	98
Hình 3.22. Các truy vấn ROCS cho chất ức chế IL-33 được tạo từ cấu trúc của hợp chất 7c	100
Hình 3.23. Các hợp chất dẫn đầu thu được từ quá trình sàng lọc ảo chất ức chế IL-33 tại vị trí 2 của PPI dựa trên mô hình tương đồng hình dạng 3D ROCS-iIL33-6....	102
Hình 3.24. Phân tích quỹ đạo mô phỏng MD 100 ns và tính toán năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA của các chất tiềm năng được sàng lọc từ mô hình ROCS-iIL33-6.....	103
Hình 3.25. Mô hình pharmacophore PH4-LB-iST2 dựa trên phối tử ức chế ST2 được đánh giá bằng các tập môi nhử khác nhau và tập không hoạt tính thực nghiệm	105
Hình 3.26. Sự phân bố điểm số gắn kết của các hợp chất trong thư viện nội bộ với IL-33 và ST2 tại các vị trí trong mô phỏng gắn kết phân tử với Autodock Vina...	108
Hình 3.27. Đánh giá mô hình thử nghiệm <i>in vitro</i> khảo sát tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33.....	110
Hình 3.28. Tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên tế bào HB của các hoạt chất hóa được và dẫn chất morpholinalkoxychalcon từ thư viện hợp chất nội bộ	111
Hình 3.29. Tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên tế bào HB một số dẫn chất quercetin.....	112
Hình 3.30. Tỷ lệ sống của tế bào HB khi được xử lý với các hợp chất ở nồng độ 100 μ M trong thử nghiệm MTT (các mẫu chứng: môi trường (MT), H ₂ O ₂ 5mM, DMSO 0,2%)	113
Hình 3.31. Sự hình thành phức hợp giữa hợp chất T821 và IL-33 được xác định bởi cơ chế tắt quang tính trong thử nghiệm sử dụng quang phổ huỳnh quang	114
Hình 4.1. Quá trình xác định acid amin điểm nóng của PPI bằng các công cụ máy tính.....	117
Hình 4.2. Sự dự đoán túi ẩn tại vị trí 2 của IL-33 từ mô phỏng MD dài với phối tử thực nghiệm 7c , mô phỏng MixMD và PocketMiner	126
Hình 4.3. Các dẫn chất folat cung cấp kiểu cấu trúc tiềm năng có thể gắn kết với các acid amin điểm nóng mang tính acid của IL-33 tại vị trí 1 của giao diện PPI.....	132

Hình 4.4. Cấu trúc của các chất ức chế ST2 thực nghiệm (iST2-1, iST2-1a và 32) và các chất gắn kết tiềm năng được sàng lọc từ đề tài (ZINC08911140 và ZINC40658091)	133
Hình 4.5. So sánh kết quả sàng lọc ảo của các mô hình pharmacophore PH4-IL33-S2-M1, PH4-IL33-S2-M2 và truy vấn tương đồng hình dạng 3 chiều ROCS-iIL33-6	136
Hình 4.6. Sự diễn giải cơ học đối với mô hình QSAR-HB	139
Hình 4.7. Cấu trúc hóa học, dự đoán <i>in silico</i> và hoạt tính <i>in vitro</i> ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HB của một số dẫn chất quercetin.....	144
Hình 4.8. Các hợp chất không thể hiện hoạt tính trong thử nghiệm trên tế bào HB	146

ĐẶT VẤN ĐỀ

Interleukin (IL)-33 được phát hiện từ năm 2003 và là thành viên thứ 11 của họ cytokin IL-1. IL-33 đóng vai trò quan trọng trong sự cân bằng và sửa chữa nội mô, tham gia vào các phản ứng miễn dịch loại 2, quá trình viêm, dị ứng, nhiễm trùng và ung thư. Được giải phóng khi có sự tổn thương mô hoặc tế bào, IL-33 hoạt động bằng cách gắn kết với thụ thể ức chế khối u 2 (suppression of tumorigenicity 2 – ST2) biểu hiện trên bề mặt các tế bào đích, đặc biệt là các tế bào miễn dịch. Sự gắn kết giữa IL-33 và ST2 là một tương tác protein-protein (PPI). Phức hợp IL-33/ST2 tiếp tục liên kết với đồng thụ thể IL-1RAcP để kích hoạt đường truyền tín hiệu phụ thuộc protein đáp trả sơ cấp với sự biệt hóa tế bào dòng tủy 88 (Myeloid differentiation primary response 88 – MyD88) bên trong tế bào đích và gây ra các đáp ứng sinh học.¹

Trong 20 năm được nghiên cứu, sự đóng góp của IL-33 vào cơ chế sinh bệnh học của các bệnh lý viêm như hen suyễn, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), viêm khớp và viêm ruột đã được chứng minh.²⁻⁴ Bên cạnh đó, protein này còn có liên quan đến các bệnh tự miễn như viêm khớp dạng thấp, viêm ruột tự miễn, lupus ban đỏ và xơ cứng bì hệ thống;^{5,6} các bệnh lý thần kinh trung ương như bệnh Alzheimer và đa xơ cứng.^{7,8} Con đường IL-33/ST2 cũng liên quan đến nhồi máu cơ tim, suy tim và bệnh mảnh ghép chống chủ.⁹⁻¹¹ Mọi liên quan của IL-33/ST2 đến những bệnh lý kể trên đã được chứng minh qua các thử nghiệm lâm sàng hoặc trên mô hình chuột loại bỏ gen. Từ đó, IL-33 và thụ thể ST2 không chỉ trở thành các dấu ấn sinh học dùng trong chẩn đoán và theo dõi các bệnh viêm và tự miễn,¹² mà còn được xem là mục tiêu tác động tiềm năng để phát triển các thuốc điều trị những bệnh lý liên quan. Thống kê năm 2019 của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) cho thấy hen suyễn ảnh hưởng đến 262 triệu người và gây ra 455.000 ca tử vong, trong khi COPD là nguyên nhân gây tử vong hàng thứ 3 trên thế giới với 3,23 triệu ca. Mặc dù ít gặp hơn, nhưng các bệnh tự miễn như viêm khớp dạng thấp gây ảnh hưởng đến 18 triệu người và lupus ban đỏ hệ thống có tỉ lệ lưu hành lên đến 3,4 triệu ca.^{13,14} Với những gánh nặng y tế như vậy, việc tìm kiếm các tác nhân trị liệu mới và hiệu quả hơn cho các bệnh lý này là cần thiết. Ức chế hoạt tính cytokin của IL-33 là một trong những hướng nghiên cứu tiềm năng, mở ra cơ hội điều trị các bệnh viêm và tự miễn với một cơ chế mới.

Trong những năm gần đây, IL-33 và ST2 đã trở thành các protein mục tiêu hấp dẫn và được quan tâm nghiên cứu. Hiện nay, các ứng viên được đưa vào thử nghiệm lâm sàng đều là những tác nhân sinh học, gồm kháng thể đơn dòng trung hòa IL-33 như torudokimab, itepekimab, tozorakimab và kháng thể kháng ST2 như astegolimab, melrilimab.¹⁵⁻¹⁹ Mặc dù thể hiện ái lực cao với IL-33/ST2, kháng thể đơn dòng vẫn là những liệu pháp đắt tiền, phải sử dụng bằng đường tiêm, yêu cầu đặc

biệt về điều kiện bảo quản và các phản ứng phụ trên miễn dịch. Ngược lại, thuốc phân tử nhỏ có các ưu điểm về sinh khả dụng đường uống, tính chất dược động học dễ điều chỉnh, dễ phân liều và bảo quản. Các tác nhân này có thể tổng hợp lượng lớn và từ đó góp phần giảm chi phí điều trị. Mặc dù một số hợp chất phân tử nhỏ ức chế IL-33 và ST2 đã được báo cáo,²⁰⁻²⁴ việc tìm kiếm các hợp chất mới gắn kết ái lực cao và chọn lọc với các mục tiêu này vẫn là một nhu cầu cấp thiết.

Là những mục tiêu PPI, IL-33 và ST2 liên kết với nhau tại những bề mặt nông và rộng, đặt ra các thách thức cho quá trình tìm kiếm chất ức chế phân tử nhỏ. Khám phá thuốc mới là một quá trình tiêu tốn nhiều thời gian và chi phí, đặc biệt với những mục tiêu khó khăn như PPI. Với sự phát triển của khoa học máy tính, quá trình này đã được thúc đẩy một cách mạnh mẽ. Dù vậy, các nghiên cứu *in silico* trên IL-33/ST2 vẫn còn hạn chế, chủ yếu là những nghiên cứu sàng lọc ảo sử dụng phương pháp gắn kết phân tử vào các vị trí giả định trên IL-33 của Kim và cộng sự (2016), Adamu và cộng sự (2021), Le và cộng sự (2023) và trên ST2 của Ramadan và cộng sự (2018).^{20,22,25,26} Cho đến nay, vẫn chưa có nghiên cứu sàng lọc ảo nào được thực hiện dựa trên sự đánh giá toàn diện các vị trí gắn kết trên IL-33 và ST2. Bên cạnh đó, mặc dù một số phân tử nhỏ ức chế IL-33/ST2 đã được báo cáo, vẫn chưa có một công bố nào về các mô hình *in silico* dựa trên phối tử. Nhằm đóng góp những tiến bộ mới trong lĩnh vực này, đề tài được thực hiện với mục tiêu **sàng lọc *in silico* và *in vitro* các cấu trúc phân tử nhỏ có khả năng tương tác với IL-33 và thụ thể ST2**. Trong đó, việc tìm kiếm chất ức chế được thực hiện theo cả hướng dựa trên cấu trúc mục tiêu lẫn dựa trên phối tử. Cụ thể, các nội dung nghiên cứu sau đây được thực hiện:

1. Xây dựng cơ sở dữ liệu cấu trúc hóa học định hướng cho nghiên cứu sàng lọc *in silico* chất ức chế PPI
2. Khảo sát tương tác protein-protein của IL-33/ST2 và xác định các vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ trên mỗi protein bằng các công cụ máy tính
3. Xây dựng các mô hình sàng lọc *in silico* dựa trên cấu trúc mục tiêu IL-33 và ST2, bao gồm mô hình pharmacophore, gắn kết phân tử, mô phỏng động lực học phân tử và tính toán năng lượng tự do gắn kết
4. Xây dựng các mô hình *in silico* dựa trên các phối tử đã biết của IL-33 và ST2, bao gồm truy vấn tương đồng hình dạng phân tử 3 chiều, mô hình pharmacophore và mô hình mối liên quan định lượng giữa cấu trúc và tác động (QSAR)
5. Thử nghiệm *in vitro* đánh giá hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 của các chất được sàng lọc từ nghiên cứu *in silico*.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về interleukin-33 và thụ thể ST2

1.1.1. Cytokin, interleukin và họ interleukin-1

Cytokin là các protein có trọng lượng phân tử thấp, được tiết ra từ tế bào, hỗ trợ cho sự giao tiếp giữa tế bào với tế bào nhằm đáp ứng với một số kích thích. Thuật ngữ “cytokin” là sự kết hợp của hai từ Hy Lạp, “cyto” có nghĩa là tế bào và “kinos” có nghĩa là sự chuyển động. Cytokin kích thích sự di chuyển của tế bào đến các vị trí viêm, nhiễm trùng và chấn thương.^{27,28} Chúng có thể truyền nhiều tín hiệu sống còn khác nhau, bao gồm tăng sinh, biệt hóa và hoạt động chức năng của tế bào. Vì vậy, đây được xem là nhóm tác nhân quan trọng trong sự điều hòa hoặc thay đổi các phản ứng của hệ miễn dịch.^{29,30} Mức độ cao bất thường hoặc sự sai sót trong quá trình truyền tín hiệu của cytokin có thể thúc đẩy nhiều bệnh lý khác nhau như bệnh tự miễn, rối loạn viêm và ung thư. Việc nghiên cứu các cytokin và thụ thể của chúng sẽ góp phần thúc đẩy quá trình khám phá và phát triển của các thuốc mới để mở rộng tác nhân điều trị cho các nhóm bệnh lý kể trên.^{28,31}

Là một loại cytokin, interleukin (IL) ban đầu được cho là chỉ biểu hiện bởi các tế bào bạch cầu, nhưng sau đó đã được phát hiện cũng được sản xuất bởi nhiều loại tế bào khác trong cơ thể. IL đóng vai trò quan trọng trong sự kích hoạt và biệt hóa, cũng như thúc đẩy sự tăng sinh, trưởng thành, di cư và bám dính của các tế bào miễn dịch. Kể từ khi IL-1 được phát hiện lần đầu tiên năm 1977, hiện nay đã có hơn 40 loại IL được khám phá.³² IL-1 là một trong những họ IL lớn nhất với 11 cytokin thành viên, được phân loại thành 3 phân họ chính dựa trên sự tương đồng về trình tự và thụ thể (**Bảng 1.1**).^{33,34} Các cytokin này được xếp vào họ IL-1 bởi một số lý do. Thứ nhất, gen mã hóa cho hầu hết các thành viên họ IL-1 đều nằm trên nhiễm sắc thể (NST) số 2, ngoại trừ IL-33 ở NST số 9 và IL-18 ở NST số 18. Thứ hai, về cấu trúc, tất cả thành viên họ IL-1 đều có chung cấu trúc dạng tứ diện gồm 12 phiên β. Thứ ba, về cơ chế sinh tổng hợp, các cytokin này đều được tổng hợp ở dạng tiền chất (hay còn gọi là dạng đầy đủ) trước khi được biến đổi thành các dạng trưởng thành (tức dạng có hoạt tính cytokin). Cuối cùng, bằng việc gắn kết vào các thụ thể và đồng thụ thể tương ứng để tạo thành phức hợp xuyên màng có cấu trúc dimer dị thể, các cytokin họ IL-1 làm khởi phát tín hiệu sinh học mà trong cơ chế đều có sự tham gia của các phân tử bên trong tế bào như MyD88, IRAK và TRAF6.^{34,35} Hơn bất kỳ một họ cytokin nào khác, các IL-1 có mối liên hệ chặt chẽ với tình trạng viêm và tổn thương, nhưng một số thành viên cũng có chức năng tăng sức đề kháng không đặc hiệu đối với nhiễm trùng và giúp phát triển đáp ứng miễn dịch đối với các kháng nguyên lạ. Các IL-1 liên quan

chủ yếu đến miễn dịch bẩm sinh, được biểu hiện bằng tình trạng viêm và có thể hoạt động như một cơ chế bảo vệ vật chủ.³³

Bảng 1.1. Sự phân loại, thụ thể, đồng thụ thể và chức năng chính của các cytokin họ IL-1

Thành viên họ IL-1	Tên gọi khác	Phân loại	Thụ thể đặc hiệu	Đồng thụ thể	Chức năng
IL-1 α	IL-1F1	Phân họ IL-1	IL-1R1	IL-1R3 (IL-1RAcP)	Báo động, tiền viêm, kích thích tế bào T _H 17
IL-1 β	IL-1F2		IL-1R2		Phản ứng với nhiễm trùng, tiền viêm, kích thích tế bào T _H 17
IL-1Ra	IL-1F3		IL-1R1	-	Ức chế viêm
IL-33	IL-1F11		IL-1R4 (ST2)	IL-1RAcP	Tiền viêm, kích thích tế bào T _H 2
IL-18	IL-1F4	Phân họ IL-18	IL-1R5 (IL-18R α)	IL-1R7 (IL-18R β)	Tiền viêm, kích thích tế bào T _H 1
IL-37	IL-1F7		IL-18R α	-	Ức chế viêm
IL-36 α	IL-1F6	Phân họ IL-36	IL-1R6 (IL-36R)	IL-1RAcP	Viêm da và hô hấp
IL-36 β	IL-1F7				
IL-36 γ	IL-1F8			-	Ức chế viêm
IL-36Ra	IL-1F5			-	Ức chế viêm
IL-38	IL-1F10			-	Ức chế viêm

Bên cạnh đó, các IL-1 có vai trò quan trọng trong việc khuếch đại một cách đầy đủ các phản ứng miễn dịch thu nhận bằng cách tăng cường chức năng của các tế bào T hỗ trợ (T helper cell) T_H1, T_H2, T_H17 và CD8. Nhưng từ đó, các IL-1 đồng thời cũng là các tác nhân thúc đẩy phản ứng viêm rất mạnh trong cơ thể. Qua 40 năm nghiên cứu, vai trò của các cytokin họ IL-1 đã và đang được nghiên cứu một cách đầy đủ hơn để phục vụ cho quá trình khám phá thuốc mới.³⁶ Hiện nay, các thành viên IL-1 đã được xác định mối liên quan đến các bệnh viêm cấp và mạn tính, bệnh tự miễn, hội chứng chuyển hóa và ung thư.³⁷ Kể từ khi anakinra (một protein tái tổ hợp đối kháng thụ thể IL-1R) được khám phá vào năm 1985 cho đến nay, nhiều tác nhân sinh học khác đã được phát triển để điều trị các bệnh lý kể trên.³³ Tuy nhiên, việc thiết kế chất ức chế phân tử nhỏ cho các mục tiêu tiềm năng này vẫn còn gặp nhiều thách thức và do đó chưa có thuốc hóa dược nào được chính thức chấp thuận cho việc điều trị các bệnh lý do rối loạn hoạt động của các cytokin họ IL-1.

1.1.2. Interleukin-33 và thụ thể ST2

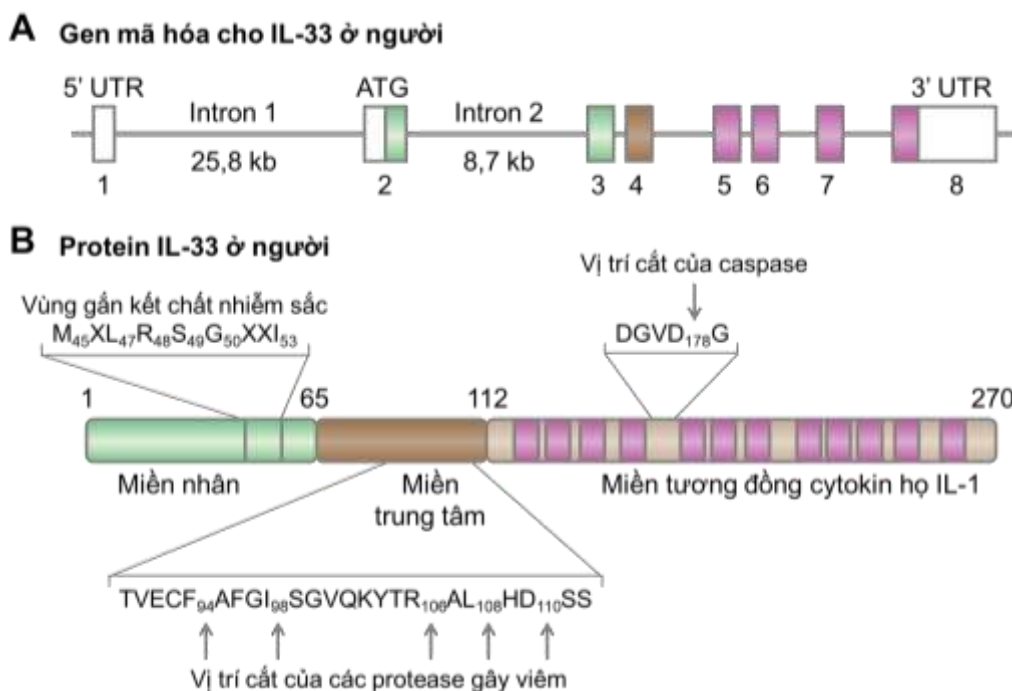
1.1.2.1. Interleukin-33

Năm 2003, một protein được phát hiện và báo cáo lần đầu tiên bởi Baekkevold và cộng sự với tên gọi “yếu tố nhân của tiểu tĩnh mạch giàu nội mô” (Nuclear Factor

- High Endothelial Venules, NF-HEV).³⁸ Đến năm 2005, Schmitz và cộng sự nhận thấy trình tự của NF-HEV có sự tương đồng với các thành viên họ IL-1 đã được xác định trước đó. Do vậy, protein này được đặt tên là IL-33 và trở thành thành viên thứ 11 của họ IL-1.³⁹ Một thời gian dài trước khi IL-33 được khám phá, ST2 được xem là thụ thể “mò côi” bởi chưa rõ phối tử đặc hiệu và được mô tả như một chất điều hòa âm tính tín hiệu của thụ thể IL-1R. Tuy nhiên, ST2 được quan sát thấy có chức năng như một phân tử tín hiệu quan trọng trong các phản ứng của tế bào T_H2 .^{10,40} Công trình của Schmitz là một bước ngoặt quan trọng, xác định IL-33 là thành viên mới của họ IL-1 và đồng thời chứng minh ST2 là thụ thể đặc hiệu của protein này.

Sự liên kết ái lực cao của IL-33 với ST2 kích hoạt các kinase để hoạt hóa yếu tố nhân tăng cường chuỗi nhẹ kappa của các tế bào B hoạt động (NF- κ B) và protein kinase được kích hoạt bởi mitogen (MAPK). Đồng thời, tín hiệu IL-33/ST2 cũng thúc đẩy quá trình sản xuất các cytokin liên quan khác từ các tế bào T_H2 phân cực. Trên mô hình động vật, Schmitz và cộng sự báo cáo rằng IL-33 thúc đẩy sự biểu hiện của IL-4, IL-5, IL-13 và dẫn đến những thay đổi bệnh lý nghiêm trọng ở niêm mạc của các cơ quan. Năm 2007, Chackerian và cộng sự đã khám phá thêm rằng phức hợp IL-33/ST2 cần liên kết với một đồng thụ thể có tên IL-1RAcP mới có thể truyền tín hiệu vào bên trong tế bào thông qua sự triệu tập phân tử MyD88.⁴¹ Ngoài sự cảm ứng tế bào T_H2 , IL-33 còn kích thích sự sản xuất các cytokin khác ở tế bào mast.⁴² Qua hai thập kỷ được nghiên cứu, cấu trúc, vai trò sinh học và tiềm năng phát triển thuốc mới của IL-33 đã dần được làm sáng tỏ.

IL-33 hiện diện mức độ cao trong tế bào nội mô mạch máu của phế quản, phế nang, da và bạch huyết; tế bào biểu mô vùng mũi họng, phế quản, mô tuyến đường tiêu hóa; tế bào sừng ở da; nơ-ron thần kinh, tế bào hình sao ở não và tế bào sụn ở khớp.¹ Gen *IL-33* mã hoá cho IL-33 ở người bao gồm 8 exon nằm trên NST số 9 (9p24.1) với độ dài hơn 42 kb (**Hình 1.1A**). Khi được phiên mã, gen này tạo thành sợi mARN 2,7 kb mã hoá cho một sợi protein dài 270 acid amin.^{43,44} Protein này được gọi là IL-33 dạng đầy đủ (IL-33 full-length – IL-33_{FL} hay IL-33₁₋₂₇₀) và có khối lượng khoảng 30 kDa. Cấu trúc của IL-33_{FL} gồm có ba vùng: đầu N là vùng chứa các acid amin có vai trò gắn kết với chất nhiễm sắc trong nhân, vùng thứ hai là miền tương đồng với các cytokin họ IL-1 tại đầu C (acid amin thứ 112–270) đóng vai trò gắn kết với thụ thể ST2 (**Hình 1.1B**).^{43,45} Vùng cytokin có cấu trúc 12 phiên β đặc trưng, sắp xếp thành cấu trúc nếp gấp β dạng cỏ ba lá.^{46,47} Nối liền giữa hai vùng này là một vùng trung tâm (acid amin thứ 65–112) mang tính dị biệt giữa các loài.⁴⁴ Đây chính là vùng nhạy cảm và được nhận diện bởi các protease tiền viêm để phân cắt IL-33_{FL} thành dạng trưởng thành.



Hình 1.1. Các thành phần cấu trúc gen mã hóa và protein của IL-33

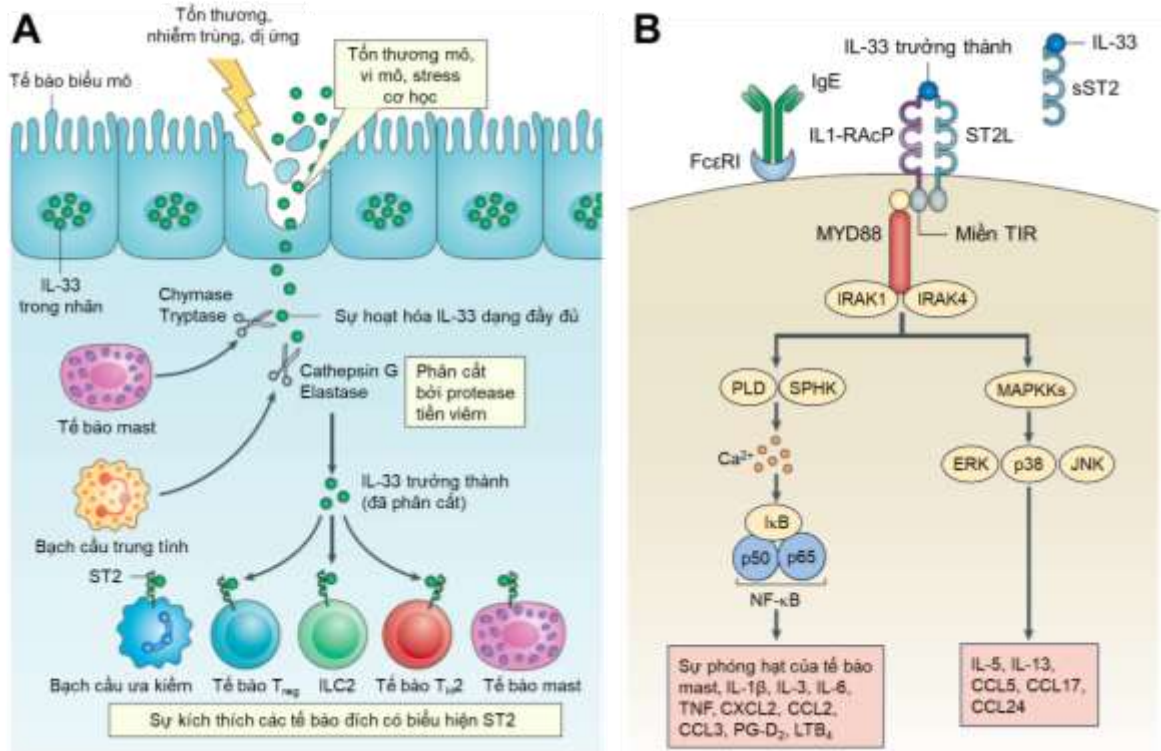
(A) Cấu trúc của gen *IL-33*. (B) Cấu trúc chứa 3 miền của IL-33 dạng đầy đủ. Màu sắc của các exon tương ứng với màu sắc của các vùng cấu trúc protein được mã hóa.

Nguồn: Liew và cộng sự (2016)⁴⁴

Sự hiện diện của miền nhân gợi ý rằng ở trạng thái cân bằng, IL-33_{FL} được dự trữ ổn định ở trong nhân tế bào và gắn kết với các histon.⁴⁸ Việc loại bỏ miền nhân trên mô hình chuột biến đổi gen làm gia tăng đáng kể nồng độ IL-33 trong huyết tương và cơ chế viêm theo con đường IL-33/ST2.⁴⁹ Những quan sát trên ủng hộ cho giả thuyết về sự lưu giữ IL-33 trong nhân tế bào đã được chọn lọc tự nhiên giữ lại trong quá trình tiến hóa để điều hòa hoạt tính thúc đẩy viêm của cytokin này.⁴⁴

Do không chứa trình tự tiết, IL-33 không thể được ngoại tiết thông qua con đường truyền thống nhờ lưới nội chất hạt và thể Golgi. Thay vào đó, IL-33 được tiết theo cơ chế hoại tử của tế bào dưới dạng IL-33_{FL}, sau đó được biến đổi rồi tác động lên các tế bào đích (**Hình 1.2A**).⁵⁰ Vì vậy, sự xuất hiện của IL-33 trong huyết tương và dịch ngoại bào được xem như một tín hiệu cảnh báo nội sinh cho sự tổn thương tế bào.⁵¹⁻⁵³ Các giả thuyết ban đầu cho rằng caspase-1 là enzym chịu trách nhiệm cho sự phân cắt IL-33_{FL} thành IL-33₁₁₂₋₂₇₀, tương tự như trường hợp của IL-1 β .⁵⁴ Tuy nhiên, các nghiên cứu sau này đã chứng minh rằng caspase-1 phân cắt IL-33 tại vị trí Asp178 thay vì Ser111 và dẫn đến sự bất hoạt thay vì thúc đẩy tác động cytokin.⁵⁵ Do đó, các enzym khác hiện nay được đề xuất cho vai trò này, gồm các protease tiền viêm có nguồn gốc từ tế bào mast (chymase và tryptase) hay bạch cầu trung tính (cathepsin G và elastase).^{52,56} Ngoài ra, caspase-3 và caspase-7 được phóng thích bởi từ các tế bào chết theo chương trình có thể phân cắt và bất hoạt IL-33 như một cơ chế kiểm soát.⁵⁷

Như vậy, sau khi được sản xuất trong môi trường nội bào, IL-33_{FL} có thể đi vào nhân hoặc được tiết ra ngoại bào và biến đổi thành dạng trưởng thành có hoạt tính sinh học như một cytokin.³⁸ Nghiên cứu này tập trung vào dạng thứ hai, có trình tự 159 acid amin (từ Ser112 đến Thr270) và khối lượng khoảng 18 kDa, được gọi là IL-33₁₁₂₋₂₇₀.



Hình 1.2. Tác động cytokin của IL-33

(A) Sự phóng thích của IL-33 dạng đầy đủ từ nhân của các tế bào bị tổn thương, nhiễm trùng hoặc dị ứng, được phân cắt bởi các protease tiền viêm từ tế bào mast hoặc bạch cầu trung tính để trở thành dạng trưởng thành và tác động trên tế bào đích có biểu hiện thụ thể ST2. (B) Sự liên kết của IL-33 với các thụ thể xuyên màng của tế bào đích gồm ST2L và IL-1RAcP dẫn đến sự triệu tập MyD88 để kích hoạt tín hiệu nội bào và thúc đẩy sự phóng hạt của tế bào mast và sự sản xuất các phân tử gây viêm khác. Dạng sST2 có tác động điều hòa âm tính tín hiệu IL-33, ngăn chặn sự tương tác hiệu quả của cytokin này với ST2L.

Nguồn: Liew và cộng sự (2010, 2016)^{44,58}

1.1.2.2. Thụ thể ST2

Thụ thể ST2 (còn có các tên gọi khác như IL-1RL1, IL-1R4 hoặc T1) là một thành viên thuộc họ thụ thể IL-1R. Năm 1989, ST2 được báo cáo lần đầu tiên và được gọi là thụ thể “mò côi” vì không thể tìm thấy phối tử gắn kết tương ứng trong các nghiên cứu về chức năng trên mô hình tế bào T_{H2} ở các bệnh dị ứng.⁵⁹ Gen ST2 được nhận thấy là mã hóa cho các protein tương tự như miền ngoại bào của các thụ thể IL-1R1 và IL-1R2.⁶⁰ Tuy nhiên, Kumar và cộng sự (1995) đã xác định rằng IL-1 không phải là phối tử của ST2 mà là một phân tử khác trên dòng tế bào Balb/c 3T3 và tế bào

nội mô tĩnh mạch rốn.⁶¹ Năm 1997, Kumar và cộng sự tiếp tục báo cáo các kích thích tiền viêm cảm ứng sự biểu hiện của ST2 và gợi ý vai trò của thụ thể này trong bệnh lý viêm.⁶² Löhning và cộng sự (1998) đã báo cáo sự biểu hiện của ST2 trên màng tế bào T_H2. Tuy nhiên, khi thử nghiệm trên IL-4, IL-5 hay IL-10, các tác giả nhận thấy chúng không phải là phối tử của ST2.⁶³

Đến những năm 2000, Kuroiwa và cộng sự phát triển phương pháp ELISA để định lượng ST2, từ đó phát hiện sự gia tăng nồng độ của ST2 dạng hòa tan (sST2) trong huyết thanh của bệnh nhân mắc bệnh tự miễn.^{64,65} Sau đó, ST2 lần lượt được nhận thấy sự biểu hiện trên tế bào mast, bạch cầu ưa kiềm, lympho T CD4+, tế bào cơ tim và có liên quan đến các tình trạng viêm như hen suyễn hoặc chấn thương như nhồi máu cơ tim.^{10,66} Từ đây, ST2 có ứng dụng lâm sàng đầu tiên, là dấu ấn sinh học cho nhồi máu cơ tim và suy tim.^{10,67} Đến năm 2005, phối tử đặc hiệu IL-33 của ST2 mới được xác định.³⁹ Từ đó, tương tác protein-protein giữa ST2 và IL-33 đã trở thành một chủ đề nghiên cứu tiềm năng để phát triển thuốc mới nhằm điều trị các bệnh lý liên quan đến vai trò sinh học của hai protein.

Về nguồn gốc, từ một gen quy định nằm ở vị trí 2q12 trên nhiễm sắc thể, ST2 là sản phẩm của quá trình mã hóa gen thành 4 đồng dạng do sự khác biệt trong quá trình cắt nối lựa chọn bởi hai promoter khác nhau.^{39,68,69} Trong đó, hai dạng quan trọng và được nghiên cứu nhiều nhất là ST2 xuyên màng (còn gọi là ST2L) và ST2 hòa tan (sST2). Ngoài ra, thụ thể này còn có hai biến thể ít quan trọng hơn là ST2V và ST2LV.⁷⁰ Dạng xuyên màng ST2L biểu hiện chủ yếu ở nguyên bào sợi, tế bào đuôi gai và đặc biệt là các tế bào máu như bạch cầu ưa acid, bạch cầu ưa kiềm, tế bào mast, tế bào lympho T_H2, đại thực bào và diệt bào tự nhiên. Dạng hòa tan sST2 có tính cảm ứng và biểu hiện ở chủ yếu ở các tế bào biểu mô và nguyên bào sợi.⁷¹ Khi được tiết vào tuần hoàn, sST2 có tác động gắn kết với IL-33 và cản trở tương tác giữa IL-33 và ST2L trên tế bào đích. Do đó, sST2 còn được gọi là thụ thể “bẫy” (**Hình 1.2B**). Như vậy, hệ thống thụ thể ST2 không chỉ có vai trò như chất đáp ứng chức năng của IL-33 khi ở dạng xuyên màng, mà còn đóng vai trò của một chất ức chế IL-33 khi ở dạng hòa tan.⁷² Sự tăng nồng độ của sST2 trong huyết tương liên quan đến nhiều bệnh lý, bao gồm nhồi máu cơ tim cấp, đợt cấp của hen phế quản, viêm phổi tăng bạch cầu ái toan, xơ phổi vô căn, nhiễm trùng máu và chấn thương. Do đó, sST2 đã được nghiên cứu để làm dấu ấn sinh học cho một số bệnh lý như suy tim, bệnh động mạch vành, viêm cơ tim cấp và bệnh mảnh ghép chống chủ.^{11,73-75}

1.1.2.3. Tác động cytokin của IL-33 thông qua sự tương tác với ST2

Hình 1.2B minh họa tác động cytokin của IL-33 lên tế bào đích. Đầu tiên, IL-33 gắn kết với thụ thể ST2L trên bề mặt tế bào và sau đó là đồng thụ thể IL-1RAcP. Khi

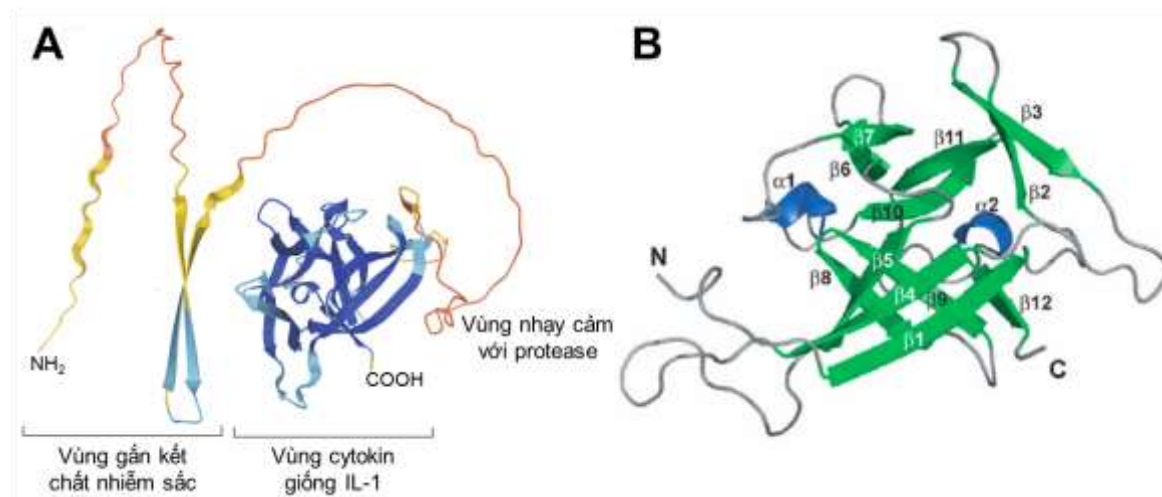
miền TIR của hai thụ thể tiếp cận với nhau dẫn đến sự triệu tập MyD88 và các kinase hỗ trợ thụ thể IL-1R 1 và 4 (gọi tắt là IRAK1 và IRAK4). Từ đó, nhiều protein tín hiệu được kích hoạt, bao gồm NF- κ B, protein ức chế của tiểu đơn vị α của NF- κ B ($I\kappa$ B α), các kinase được điều hòa bởi tín hiệu ngoại bào (extracellular signal-regulated kinase – ERK), protein p38 và JUN N-terminal kinase-1 (JNK1).

Trong tế bào mast, hoạt động của các kinase IRAK1 và IRAK4 làm hoạt hóa các enzym phospholipase D (PLD) và sphingosin kinase (SPHK) dẫn đến sự kích hoạt kênh calci và từ đó kích hoạt NF- κ B. Cơ chế này cần thiết cho sự phóng hạt của tế bào mast khi có sự kích thích của kháng thể IgE và sự tổng hợp các cytokin khác như IL-1 β , IL-3, IL-6, TNF, CXC chemokin ligand 2 (CXCL2), CC-chemokin ligand 2 (CCL2), CCL3, prostaglandin D₂ và leukotrien B₄. Đối với con đường hoạt hóa MAPKK, tế bào mast sản xuất IL-5, IL-13, CCL5, CCL17 và CCL24 mà không cần sự cảm ứng của kháng thể IgE.⁵⁸

1.1.3. Cấu trúc và tương tác protein-protein giữa IL-33 và ST2

1.1.3.1. Cấu trúc của IL-33

IL-33 của người ở dạng đầy đủ có khối lượng 30,7 kDa, với cấu trúc không gian được minh họa ở **Hình 1.3A**. Vùng nhân mang tính base, có khối lượng 12,8 kDa và điểm đẳng điện 10,28. Trong khi đó, vùng cytokin mang tính acid cao, có khối lượng 18 kDa và điểm đẳng điện 4,80.⁷⁶



Hình 1.3. Cấu trúc không gian ba chiều của các dạng IL-33

(A) Cấu trúc IL-33 ở dạng đầy đủ được dự đoán bởi AlphaFold. (B) Cấu trúc IL-33 ở dạng trưởng thành được xác định bằng phương pháp NMR (PDB: 2KLL).

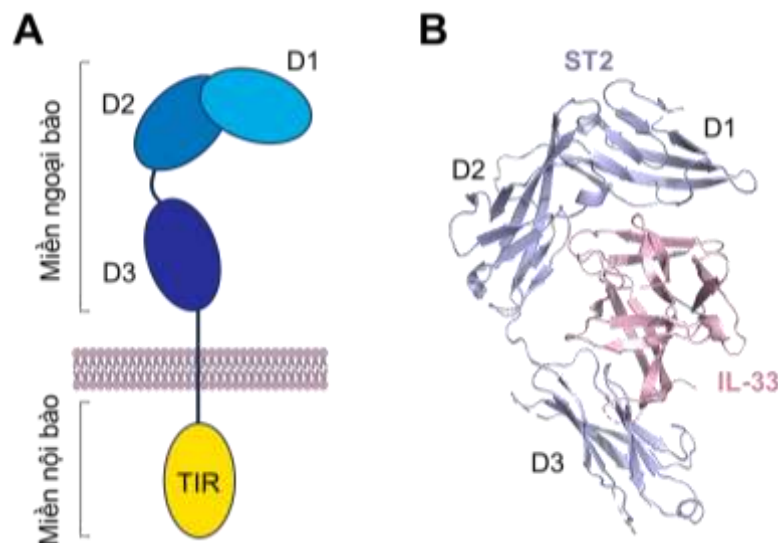
Nguồn: Lingel và cộng sự (2009)⁴⁶

Năm 2009, Lingel và cộng sự đã giải cấu trúc của IL-33 dạng trưởng thành (IL-33₁₁₂₋₂₇₀) trong dung dịch bằng phương pháp phổ NMR (PDB: 2KLL).⁴⁶ Cytokin này

có sự tương đồng cao về cấu trúc không gian với các thành viên khác của họ IL-1, đặc trưng bởi 12 phiến β sắp xếp tạo thành cấu trúc nếp gấp cở ba lá β , tương tự như các nếp gấp hiện diện trong IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra và IL-18 (**Hình 1.3B**). Trong đó, 12 phiến β được sắp xếp thành 3 đoạn lặp lại của 4 đơn vị phiến β . Những phiến β đầu tiên và cuối cùng được xếp song song ngược chiều trong một cấu trúc dạng thùng gồm 6 phiến β . Mỗi dạng lặp lại của các phiến β thứ 2 và thứ 3 tạo ra một nút kẹp tóc β ở chỏm của cấu trúc thùng β . Đây chính là các vị trí trên IL-33 để gắn kết với thụ thể ST2. Sự linh động về cấu dạng của các acid amin, chủ yếu thuộc các vòng β 2- β 3, β 3- β 4, β 4- β 5, β 10- β 11, và β 11- β 12, tham gia vào sự tương tác với ST2. Hai vòng xoắn ngắn α 1 và α 2 trong IL-33 đứng trước các chuỗi β 8 và β 12 cho thấy sự sắp xếp tương tự IL-1 β và IL-18.

1.1.3.2. Cấu trúc của thụ thể ST2

Thụ thể xuyên màng ST2L chứa 556 acid amin và có cấu trúc tổng thể tương tự với cấu trúc của các thụ thể IL-1 loại 1 (**Hình 1.4A**). ST2L bao gồm phần nội bào là một đoạn TIR hay còn gọi là miền gian bào, phần xuyên màng và miền ngoại bào. Miền ngoại bào của ST2L tham gia gắn kết với IL-33, gồm 3 miền giống globulin miễn dịch G (IgG) liên kết với nhau.



Hình 1.4. Cấu trúc của thụ thể ST2

(A) Sơ đồ cấu trúc tổng thể của ST2 ở dạng xuyên màng. (B) Cấu trúc không gian miền ngoại bào của ST2 (minh họa dưới dạng ruy-băng màu xanh nhạt) được xác định bằng phương pháp tinh thể học tia X.

Nguồn: Liu và cộng sự (2013)⁴⁷

Miền D1 và D2 được nối với nhau bởi các cầu nối disulfid, trong khi miền D3 nối với mô-đun D1D2 chỉ bằng một nối linh động. Dạng hòa tan sST2 có cấu trúc

ngắn hơn, chứa 338 acid amin, thiếu vùng nội bào và vùng xuyên màng, nhưng có chứa một đoạn 9 acid amin đặc thù ở đầu C.⁷²

Năm 2013, Liu và cộng sự đã giải cấu trúc phức hợp gắn kết giữa thụ thể ST2 và IL-33 bằng phương pháp nhiễu xạ tinh thể tia X với độ phân giải 3,27 Å (PDB: 4KC3).⁴⁷ Cấu trúc không gian miền ngoại bào của thụ thể ST2 (ST2^{ECD}) đã được làm sáng tỏ (**Hình 1.4B**). Đồng thời, cấu trúc nếp gấp cở ba lá β của IL-33 cũng được xác nhận trong cấu trúc tinh thể này, với RMSD = 1,2 Å so với cấu trúc NMR. Do tín hiệu điện tử yếu nên các vòng β 4- β 5 và β 11- β 12 bị khuyết trong cấu trúc tinh thể. Đây cũng là những vùng có cấu trúc linh động nhất thể hiện trong cấu trúc NMR.

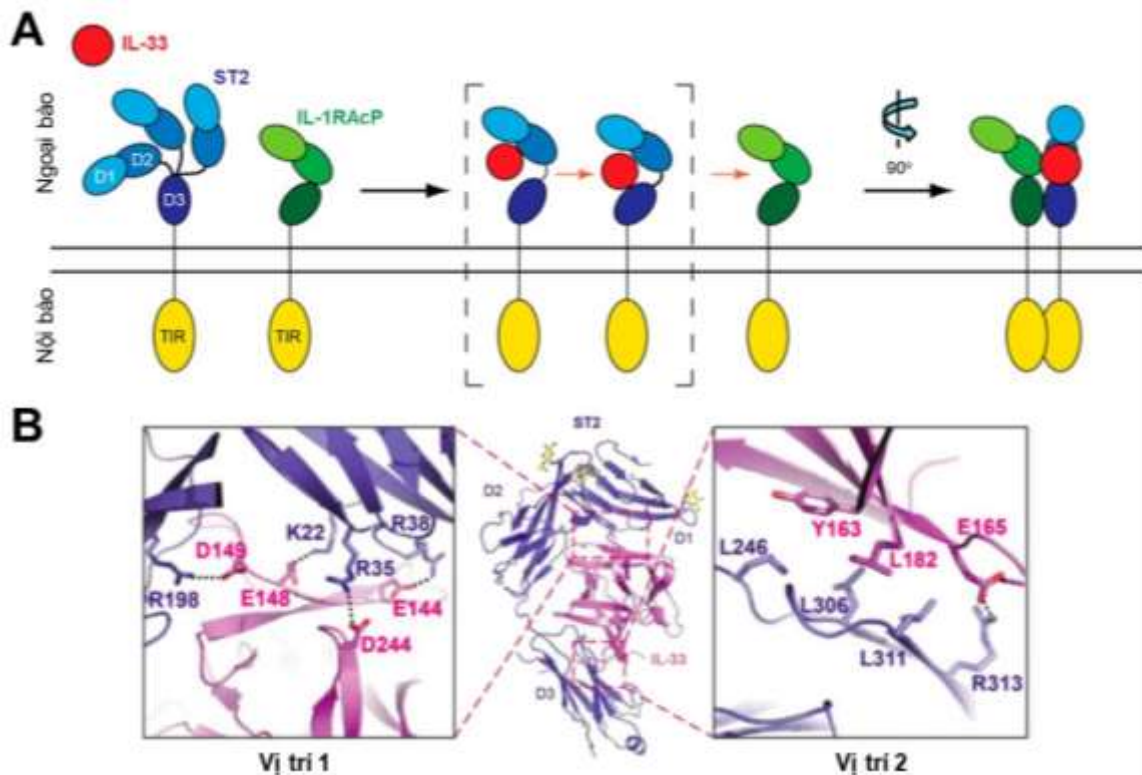
1.1.3.3. *Tương tác protein-protein giữa IL-33 và ST2*

Báo cáo của Liu và cộng sự (2013) đã làm rõ PPI giữa IL-33 và ST2.⁴⁷ Để gây ra đáp ứng sinh học trên tế bào đích, IL-33 cần gắn kết với thụ thể chính ST2L và đồng thụ thể IL-1RAcP trên màng tế bào. Như minh họa tại **Hình 1.5A**, ST2L là một thụ thể bám màng có cấu trúc 3 miền linh động. IL-33 và ST2L tương tác với nhau tại hai vị trí riêng biệt. Đầu tiên, IL-33 gắn kết với vùng ngoại bào của ST2L tại miền D1D2, được gọi là vị trí 1. Sau đó, ST2L có sự thay đổi về cấu dạng, chủ yếu ở miền D3, để tiếp tục gắn kết với IL-33 tại vị trí 2. Vị trí 1 có độ bảo tồn cao hơn vị trí 2 do tính chất cứng của mô-đun D1D2.

Bằng phép chuẩn độ nhiệt lượng đẳng nhiệt (Isothermal Titration Calorimetry – ITC), báo cáo của Lingel và cộng sự (2009) cho thấy IL-33 gắn kết với ST2 theo tỉ lệ 1:1 và có hằng số phân ly $K_D = 4$ nM.⁴⁶ Trong thử nghiệm sử dụng phương pháp phổ cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface plasmon resonance – SPR) của Liu và cộng sự (2013), ái lực gắn kết của hai protein là 0,74 nM.⁴⁷ Sau khi hình thành, phức hợp IL-33/ST2L tiếp tục liên kết với đồng thụ thể IL-1RAcP với tỉ lệ 1:1:1 và $K_D = 76$ nM.⁴⁶ Cuối cùng, tương tác giữa hai miền TIR của ST2L và IL-1RAcP dẫn đến sự triệu tập các phân tử tín hiệu nội bào và kích hoạt các tác động sinh lý của IL-33.

Như vậy, IL-33 tương tác với cả 3 miền cấu trúc của ST2. Bề mặt tương tác giữa hai protein rộng 1789 Å² trên IL-33 và 1785 Å² trên ST2.⁴⁷ Tại vị trí 1, 13 acid amin của IL-33 thuộc chuỗi β 3, các vòng β 1- β 2, β 2- β 3, β 3- β 4 và β 10- β 11 tương tác với mô-đun D1D2 của ST2. Trong những acid amin này, Glu144, Glu148, Asp149 và Asp244 tạo liên kết cầu muối tương ứng với acid amin Arg38, Lys22, Arg198 và Arg35 của ST2. Điều này phản ánh sự bổ sung điện tích của hai bề mặt: bề mặt IL-33 tích điện âm, bề mặt ST2 tích điện dương. Tại vị trí 2, 8 acid amin của IL-33 thuộc chuỗi β 1, β 4, β 5 và vòng β 8- β 9 tương tác với miền D3 của ST2. Trong đó, có một cụm kỵ nước quan trọng được hình thành bởi Tyr163 và Leu182 của IL-33 với

Leu246, Leu306 và Leu311 của ST2. Đồng thời, acid amin Glu165 tạo cầu muối với Arg313 của ST2 (**Hình 1.5B**).⁴⁷



Hình 1.5. Sự tương tác của IL-33 với các thụ thể để thể hiện hoạt tính cytokin
(A) IL-33 liên kết với thụ thể ST2 và đồng thụ thể IL-1RAcP để tạo thành phức hợp truyền tín hiệu. (B) Hai vị trí tương tác giữa IL-33 và ST2, chủ yếu qua các cầu muối tại vị trí 1 và qua các tương tác kỵ nước tại vị trí 2.

Nguồn: Liu và cộng sự (2013)⁴⁷

Trong PPI, các “điểm nóng” (hot spot) được tạo thành chỉ bởi một vài acid amin tại giao diện tương tác nhưng chúng lại có đóng góp lớn cho ái lực liên kết giữa hai protein.⁷⁷ Để xác định các điểm nóng như vậy trong PPI giữa IL-33 và ST2, Liu và cộng sự đã đột biến điểm các acid amin trên bề mặt tương tác của IL-33 và sau đó sử dụng phổ SPR để đo lường sự thay đổi ái lực liên kết với ST2. Trên bề mặt giao diện tương tác của IL-33 với ST2 tại vị trí 1, đột biến điểm tại các acid amin có tính acid như Glu144, Glu148 và Asp244 thành Lys làm tăng giá trị K_D lên 1,89; 5,15 và 1,65 nM, tức là làm giảm ái lực lần lượt 2,6; 7,0 và 2,2 lần. Đột biến Asp149 thành Lys cho sự thay đổi ái lực đến mức không thể phát hiện bằng SPR. Tại vị trí 2, đột biến acid amin Glu165 có tính acid thành Lys làm giảm ái lực liên kết của IL-33 với ST2 gần 8 lần (K_D tăng đến 6,07 nM). Đồng thời, đột biến các acid amin kỵ nước Tyr163 và Leu182 thành Ala làm tăng giá trị K_D lên lần lượt 1,1 và 1,91 nM, tức là làm giảm ái lực lần lượt 1,5 và 2,6 lần.⁴⁷ Trong nghiên cứu trước đó của Lingel và cộng sự, Glu144

cũng được chứng minh là một điểm nóng quan trọng, bởi sự đột biến acid amin này thành Lys làm giảm ái lực 5 lần qua phân tích phổ BLI và 7 lần trên phổ SPR.⁴⁶

1.1.4. Vai trò của IL-33 và ST2 trong các bệnh lý

1.1.4.1. Vai trò của IL-33/ST2 trong các bệnh lý viêm và dị ứng

Hen suyễn, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính và ngưng thở khi ngủ

Được sản xuất bởi các tế bào cơ trơn đường hô hấp, nồng độ IL-33 ở nhóm bệnh nhân hen suyễn cao hơn so với nhóm khỏe mạnh, đặc biệt ở các bệnh nhân có mức độ hen nặng. Do đó, IL-33 đã được đề xuất là một dấu ấn sinh học mới cho tình trạng này.⁷⁸ IL-33 cũng được sản xuất với nồng độ cao bởi các tế bào tổng hợp globulin miễn dịch trong huyết tương, góp phần vào tình trạng viêm dị ứng ở bệnh nhân hen suyễn.⁷⁹ Bên cạnh đó, IL-33 đóng một vai trò quan trọng trong tình trạng viêm đường hô hấp bẩm sinh do bạch cầu ưa acid.² Đồng thời, nồng độ sST2 cũng tăng cao trong máu và tương quan với mức độ nghiêm trọng của hen suyễn.⁴⁰ Vì vậy, hướng tác động lên IL-33/ST2 được đề nghị như một phương pháp điều trị mới cho hen suyễn.

IL-33 và ST2 góp phần vào cơ chế bệnh sinh của bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD). Các tế bào biểu mô phế quản và tế bào lympho máu ngoại vi của bệnh nhân COPD tăng biểu hiện và giải phóng IL-33 để đáp ứng với các tác nhân kích ứng từ môi trường và liên quan đến tình trạng viêm đường hô hấp.⁸⁰

Ngưng thở khi ngủ do tắc nghẽn (obstructive sleep apnea – OSA) là một tình trạng mạn tính đặc trưng bởi sự ngưng thở tái diễn trong khi ngủ do sự biến dạng của đường hô hấp trên và có liên quan đến tình trạng viêm mạn tính. Nồng độ IL-33 được quan sát thấy sự gia tăng trong huyết tương và nước bọt của bệnh nhân OSA, cho thấy sự đóng góp của IL-33 đối với tình trạng viêm toàn thân trong bệnh lý này. Béo phì là một yếu tố nguy cơ quan trọng đối với OSA. Tế bào mỡ có khả năng sản xuất IL-33 và do đó mô mỡ ở bệnh nhân OSA sẽ sản xuất một lượng IL-33 dư thừa. Đồng thời, tỉ lệ mắc hen suyễn và COPD ở bệnh nhân OSA cũng tăng lên so với người bình thường. Việc đồng mắc OSA làm trầm trọng thêm diễn tiến của COPD. Tình trạng viêm toàn thân trong OSA cùng với sự tăng nồng độ của IL-33 được giả định là sẽ tăng cường các hiệu ứng miễn dịch liên quan đến sự tiến triển của COPD.⁸¹

Dị ứng

Sốc phản vệ được đặc trưng bởi sự gia tăng các kháng thể IgE truyền tín hiệu thông qua thụ thể IgE có ái lực cao (FcεR1) để giải phóng các chất trung gian gây viêm. IL-33 tăng rõ rệt trong huyết tương của bệnh nhân sốc phản vệ và trong mô da

bị viêm của bệnh nhân viêm da cơ địa. Với sự hiện diện và tiếp xúc của IgE, IL-33 kích hoạt các tế bào mast và trực tiếp gây ra sự phóng hạt.⁸²

Trong dị ứng thức ăn, IL-33 góp phần gây sốc phản vệ thông qua các đường tiếp xúc gồm tiêu hóa và da. Sau giai đoạn nhạy cảm, IL-33 gây sốc phản vệ thông qua liên kết chéo giữa kháng thể IgE và sự phóng hạt của tế bào mast. Thử nghiệm *in vitro* cho thấy IL-33 kích hoạt tế bào mast ở niêm mạc tiêu hóa tiết ra IL-9, là chất đóng vai trò quan trọng trong sốc phản vệ do thức ăn. Trên mô hình động vật thử nghiệm, chuột thiếu IL-33 hoặc ST2, hoặc chuột bình thường được điều trị bằng sST2 hay kháng thể đơn dòng kháng ST2 đều được bảo vệ khỏi sốc phản vệ do thức ăn.⁸³

Đối với viêm da cơ địa, nồng độ của IL-33 trong biểu bì và sự xâm nhập của các tế bào biểu hiện thụ thể ST2 trong lớp hạ bì đều tăng lên. IL-33 từ tế bào sừng kích hoạt tế bào bạch huyết bẩm sinh nhóm 2 (ILC2) trong da và hạch bạch huyết, kích thích sự sản xuất IL-4, IL-5 và IL-13 gây nên tình trạng viêm da.⁸⁴ IL-33 còn cảm ứng sinh ra IL-31, do đó thúc đẩy hành vi ngứa và gãi. Ngược lại, gãi da thúc đẩy sự giải phóng IL-33 từ tế bào sừng và gây giảm biểu hiện của filaggrin và claudin-1, từ đó làm giảm chức năng hàng rào bảo vệ da. Sự phá hủy hàng rào này lại gây ra sự tiếp xúc với chất gây dị ứng và dẫn đến giải phóng IL-33. Do đó, IL-33 là một mắt xích chung tham gia vào chu trình ngứa–gãi của viêm da cơ địa.⁸⁵

Viêm ruột

Ở đường tiêu hóa, IL-33 gây ra các biến đổi bệnh lý nghiêm trọng bao gồm sự xâm nhập của các tế bào miễn dịch, tăng sản biểu mô, phì đại tế bào hình đài và chất nhầy.³⁹ Nghiên cứu về kiểu gen được thực hiện bởi Latiano và cộng sự (2013) cho thấy mRNA của IL-33 và ST2 tăng lên trong mẫu sinh thiết của bệnh nhân viêm ruột. Đồng thời, các biến thể di truyền của gen *IL-33* và *ST2* được chứng minh là có liên hệ với bệnh viêm ruột do tự miễn, bao gồm viêm loét đại tràng và bệnh Crohn.⁸⁶ Sedhom và cộng sự (2013) đã báo cáo việc dùng kháng thể đơn dòng trung hòa con đường IL-33/ST2 giúp cải thiện viêm đại tràng trên mô hình thử nghiệm ở chuột.⁸⁷

Bệnh Alzheimer

Sự biểu hiện của IL-33 và thụ thể ST2 trong não của bệnh nhân Alzheimer được báo cáo bởi Xiong và cộng sự (2014). Điểm nổi bật của bệnh Alzheimer là sự biểu hiện cao của các phân tử thúc đẩy viêm tại vùng lân cận của các mảng amyloid và đám rối sợi thần kinh. IL-33 và ST2 được biểu hiện trong vùng lân cận của các tổ chức này, kết hợp với tế bào thần kinh đệm, đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của các mảng bám gây nên bệnh Alzheimer. Các tế bào hình sao ở thần kinh trung ương không chỉ tiết ra IL-33 mà còn biểu hiện thụ thể ST2. Dưới sự kích thích

của các phân tử β -amyloid, IL-33 và ST2 tăng biểu hiện trong não của bệnh nhân Alzheimer. IL-33 thể hiện tác động như một cytokin tự tiết và cận tiết, làm phóng thích các phân tử gây viêm từ các tế bào thần kinh đệm và làm trầm trọng thêm tình trạng viêm mô thần kinh.⁷

1.1.4.2. Vai trò của IL-33/ST2 trong các bệnh tự miễn

Viêm khớp dạng thấp

IL-33 liên quan chặt chẽ đến cơ chế bệnh sinh của viêm khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis – RA). Nghiên cứu của Xu và cộng sự (2008) cho thấy IL-33 làm trầm trọng tình trạng viêm khớp bằng cách kích hoạt tế bào mast.⁸⁸ Đồng thời, Matsuyama và cộng sự (2010) phát hiện thấy nồng độ IL-33 tăng cao trong huyết tương lẫn dịch khớp của bệnh nhân RA trong giai đoạn hoạt động.⁸⁹ Sự gia tăng IL-33 trong máu tương quan thuận với mức độ nghiêm trọng của RA và do đó IL-33 đã được đề nghị là dấu ấn sinh học trong chẩn đoán mức độ nghiêm trọng và theo dõi hiệu quả điều trị bệnh. IL-33 còn góp phần vào quá trình ăn mòn xương và có mối tương quan với việc sản xuất kháng thể IgM, vốn là nguồn gốc của các tự kháng thể gây nên RA.^{5,90} Về mặt trị liệu, một số nghiên cứu báo cáo việc sử dụng sST2 hoặc kháng thể kháng ST2 làm giảm mức độ nghiêm trọng của RA, bao gồm giảm thâm nhiễm tế bào ở khớp, tăng sản hoạt dịch và xói mòn khớp. Bên cạnh đó, việc điều trị bằng kháng thể kháng ST2 cũng làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh và giảm sự phá hủy khớp trên mô hình chuột thử nghiệm được gây viêm khớp do collagen.⁹¹

Lupus ban đỏ hệ thống

Lupus ban đỏ hệ thống (systemic lupus erythematosus – SLE) là bệnh viêm tự miễn mạn tính và phức tạp, gây tổn thương ở nhiều mô và cơ quan. Mok và cộng sự (2010) đã báo cáo nồng độ ST2 tăng lên đáng kể ở những bệnh nhân mắc SLE tiến triển và tương quan với mức độ nghiêm trọng của bệnh.⁹² Các xét nghiệm lâm sàng cũng cho thấy sự đóng góp của IL-33 trong giai đoạn cấp tính của SLE.⁹³ Mối tương quan giữa IL-33 trong huyết tương và chỉ số hoạt động của SLE đã được nghiên cứu trên mô hình chuột thử nghiệm. Chuột được điều trị bằng kháng thể đơn dòng kháng IL-33 giúp giảm đáng kể protein niệu và tự kháng thể kháng sợi kép ADN, giảm sự lắng đọng của các phức hợp miễn dịch cũng như các kháng thể lưu hành, từ đó giúp giảm viêm thận và tỉ lệ tử vong.⁹⁴ Trên lâm sàng, Moreau và cộng sự (2022) báo cáo sự gia tăng nồng độ sST2 ở bệnh nhân SLE, gợi ý đây là một dấu ấn sinh học tiềm năng.⁹⁵ Bên cạnh đó, Abd-Elazeem và cộng sự (2022) cũng đã phát hiện mối tương quan thuận của nồng độ IL-33 huyết tương với chỉ số hoạt động của SLE ở trẻ em.⁹⁶

Đa xơ cứng

Christophi và cộng sự (2012) đã báo cáo sự gia tăng nồng độ của IL-33 trong huyết tương của bệnh nhân đa xơ cứng (multiple sclerosis – MS) so với người bình thường. Các tế bào lympho và đại thực bào được nuôi cấy từ bệnh nhân MS cũng biểu hiện nồng độ IL-33 tăng cao bất thường. Việc điều trị bằng IFN- β -1a làm giảm đáng kể nồng độ IL-33 ở người mắc MS. Được kích hoạt bởi trực IL-33/ST2, NF- κ B làm trung gian cho quá trình phiên mã và cũng tăng cao trong bạch cầu của bệnh nhân MS. IL-33 tăng cao ở các vùng mảng bám và chất trắng trong não bệnh nhân MS, trong đó, tế bào hình sao được xác định là nguồn biểu hiện IL-33 quan trọng.⁹⁷

Xơ cứng bì hệ thống

Manetti và cộng sự (2010) nhận thấy IL-33 và ST2 biểu hiện bất thường ở vùng da và các cơ quan nội tạng bị ảnh hưởng của bệnh nhân xơ cứng bì hệ thống (systemic sclerosis – SSc). Nồng độ IL-33 trong tuần hoàn tương quan với diễn tiến của giai đoạn sớm bệnh SSc.^{98,99} Nồng độ IL-33 tương quan thuận với mức độ xơ cứng của da và mức độ nghiêm trọng của xơ phổi.¹⁰⁰ Bên cạnh đó, Wagner và cộng sự (2015) đã mô tả các bệnh nhân SSc có thời gian mắc bệnh hơn 9 năm biểu hiện sự tăng nồng độ sST2 hơn là IL-33. Nồng độ sST2 trong huyết thanh giảm khi điều trị bằng iloprost. Do đó, sST2 được đề xuất như một dấu ấn sinh học cho quá trình xơ hóa mạch máu tiến triển. Đồng thời, kết quả của nghiên cứu cũng gợi ý sự tham gia của sST2 trong cơ chế bệnh sinh của SSc và có thể được khai thác về mặt trị liệu.¹⁰¹

Bệnh mảnh ghép chống chủ

Bệnh mảnh ghép chống chủ (graft-versus-host disease – GVHD) là một biến chứng có thể gặp sau dị ghép tế bào gốc. Hiện tượng này gây nên bởi các tế bào miễn dịch của người cho lẫn vào các đơn vị tế bào gốc và nhận diện cơ thể người nhận là ngoại lai. Từ đó, các phản ứng miễn dịch không mong muốn xảy ra và gây tổn thương trên các cơ quan khác nhau của người nhận. Các cơ quan bị ảnh hưởng nhiều nhất bởi GVHD là da, gan mật và đường tiêu hóa. Khoảng một nửa số bệnh nhân mắc ung thư máu ác tính được điều trị phương pháp bằng ghép tế bào gốc tạo máu sẽ mắc GVHD. Bệnh có tỉ lệ tử vong cao mặc dù đã điều trị bằng thuốc ức chế miễn dịch.¹⁰²

Trong GVHD, sự tăng nồng độ sST2 là một dấu ấn sinh học cho chẩn đoán và tiên lượng tỉ lệ tử vong. Reichenbach và cộng sự (2015) đã báo cáo IL-33 được tăng sản xuất bởi các tế bào không tạo máu trong đường tiêu hóa của bệnh nhân. Việc đưa IL-33 ngoại sinh vào cơ thể trong thời gian có phản ứng viêm cao nhất làm trầm trọng thêm GVHD.¹⁰³ Nghiên cứu của Dwyer và cộng sự (2022) trên mô hình chuột biến đổi gen và mô hình GVHD do cấy ghép tế bào gốc tạo máu chứng minh IL-33 là một

phân tử kích thích quan trọng cho các tế bào T_H1 trong GVHD.⁸⁹ Sự phong tỏa tương tác của IL-33 với ST2 trong quá trình cấy ghép tế bào tạo máu bằng cách truyền ST2-Fc ngoại sinh làm giảm tỉ lệ tử vong.¹⁰³ Kháng thể đơn dòng trung hòa ST2 cũng giúp bảo vệ quá trình ghép trên mô hình bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, làm giảm mức độ nghiêm trọng và tỉ lệ tử vong của GVHD.¹⁰⁴ Những phát hiện kể trên chỉ ra rằng con đường IL-33/ST2 là một mục tiêu tiềm năng cho liệu pháp điều trị GVHD.

1.1.4.3. Vai trò của IL-33/ST2 trong các bệnh lý tim mạch

IL-33/ST2 thể hiện các vai trò đối lập nhau trong bệnh lý tim mạch, phản ánh tính đa hướng trong tác động của PPI này. Trên mô hình chuột thử nghiệm, sự sản xuất IL-33 ở nguyên bào sợi và tế bào cơ tim có chức năng bảo vệ nhằm đáp ứng với tình trạng quá tải và chấn thương. IL-33 làm giảm tình trạng phì đại và xơ hóa cơ tim, giảm apoptosis và cải thiện chức năng cơ tim.^{70,72} Các tác động có lợi của IL-33 có được do sự tương tác với thụ thể ST2L. Khi có tổn thương tim, sST2 gia tăng nồng độ trong tuần hoàn do được tiết ra bởi nguyên bào sợi, tế bào cơ tim và tế bào nội mạc mạch máu. Hoạt động như một thụ thể môi nhử, sST2 liên kết với IL-33 và điều chỉnh tín hiệu IL-33/ST2L, từ đó ngăn chặn các tác động có lợi của IL-33.⁷² Trên lâm sàng, nồng độ sST2 trong huyết tương tăng cao ở các bệnh nhân nhồi máu cơ tim cấp tính vào ngày đầu sau biến cố và giảm dần sau đó. Nồng độ sST2 tương quan thuận với creatin kinase (một dấu ấn của tổn thương cơ tim) và tỉ lệ tử vong sau 30 ngày, đồng thời tương quan nghịch với chức năng thất trái.⁷⁰ Hiện nay, sST2 đã được sử dụng trên lâm sàng như một dấu ấn sinh học cho mức độ nghiêm trọng và tiên lượng cho các bệnh lý tim mạch, được công nhận bởi các hướng dẫn của Hội Tim mạch học Hoa Kỳ và Hiệp hội Tim mạch Hoa Kỳ từ năm 2013.¹⁰⁵

Ngoài ra, IL-33 còn làm giảm mảng xơ vữa động mạch chủ trên mô hình chuột thử nghiệm. Ngược lại, việc tiếp xúc với sST2 trước khi cho IL-33 làm tăng xơ vữa động mạch.⁷⁰ Tác dụng này được giải thích bởi tín hiệu IL-33/ST2L gây ra sự chuyển đổi phản ứng miễn dịch, từ đáp ứng T_H1 gây xơ vữa động mạch sang đáp ứng T_H2 .⁷²

Tuy nhiên, giả định rằng IL-33 có những tác động có lợi trên tim mạch và bị đối kháng bởi sST2 vẫn chưa được chứng minh ở người.¹⁰⁵ Ảnh hưởng có lợi hoặc có hại của trục IL-33/ST2 trên tim mạch vẫn còn gây tranh cãi. Phân tích gộp của Liu và cộng sự cho thấy gen *ST2* và *IL1RAcP* có liên quan chặt chẽ đến nguy cơ bệnh mạch vành, nhưng ảnh hưởng của gen *IL-33* không có ý nghĩa thống kê bởi tính đa hình của nó. Gen *IL-33* liên quan đến việc tăng nguy cơ bệnh mạch vành ở người Châu Á nhưng lại có tác dụng bảo vệ ở người da trắng.¹⁰⁶ Việc sử dụng IL-33 ở giai đoạn cấp tính của nhồi máu cơ tim cho các tác dụng có lợi trên mô hình chuột thử nghiệm, nhưng việc sử dụng ở giai đoạn mạn tính làm tăng sự thâm nhiễm bạch cầu ưa acid,

mở rộng kích thước vùng nhồi máu và thúc đẩy vỡ buồng tim. Nồng độ IL-33 tăng cao kéo dài sau nhồi máu cơ tim thúc đẩy phản ứng T_H2 , gây tái cấu trúc quá mức, gia tăng tình trạng xơ hóa và suy tim. Các nghiên cứu hiện tại cho thấy vai trò kép của trục IL-33/ST2.¹⁰⁷ Tác động của IL-33 trong các giai đoạn tiến triển khác nhau của bệnh cần được nghiên cứu thêm để định hướng phù hợp cho can thiệp lâm sàng.

1.2. Các phương pháp *in silico* trong khám phá thuốc phân tử nhỏ

1.2.1. Mô hình pharmacophore

1.2.1.1. Khái niệm và các hướng tiếp cận pharmacophore

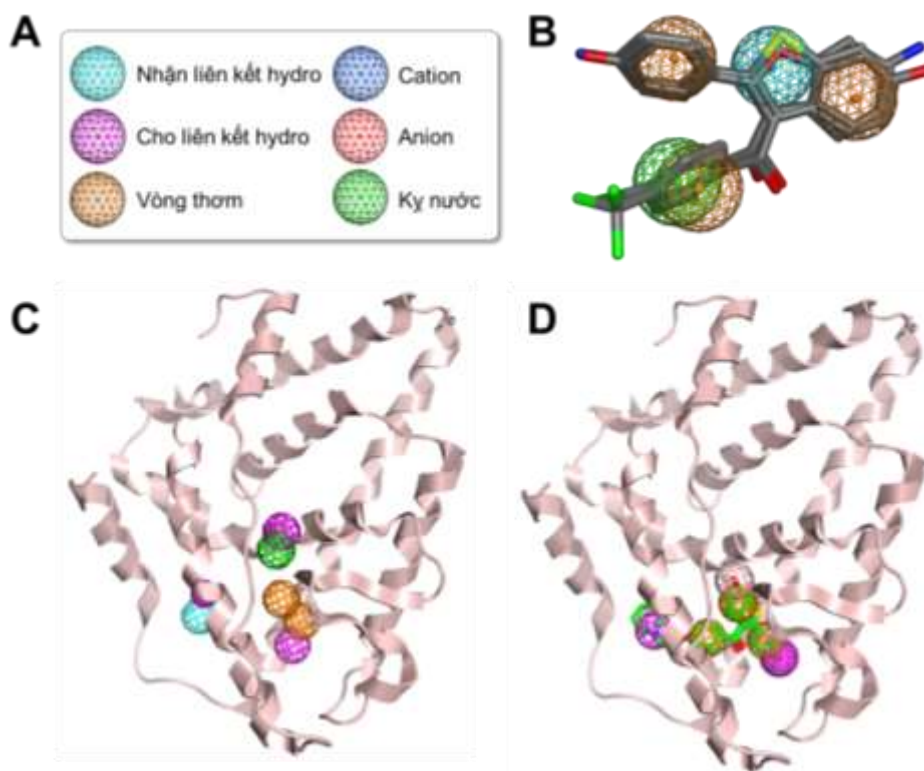
Hiệp hội Quốc tế về Hóa học cơ bản và ứng dụng (IUPAC) định nghĩa pharmacophore là một tập hợp các yếu tố về không gian (*steric*) và điện tử (*electronic*) cần thiết để đảm bảo cho sự tương tác siêu phân tử với một đích tác động nhằm hoạt hóa hoặc ức chế tín hiệu sinh học tương ứng. Không đại diện cho một phân tử hoặc một tập hợp các nhóm hóa học nào, pharmacophore là một khái niệm trừu tượng và là mẫu số chung lớn nhất của một tập hợp các phân tử hoạt tính.¹⁰⁸ Bất kỳ một loại nguyên tử hoặc nhóm nào trong phân tử thể hiện một số tính chất liên quan đến nhận dạng phân tử đều có thể được quy về các đặc tính pharmacophore. Các đặc tính thường gặp là khả năng cho hoặc nhận liên kết hydro, điện tích dương hoặc âm, khả năng tương tác với kim loại, tính thơm và kỵ nước (**Hình 1.6A**).¹⁰⁹

Mô hình pharmacophore là sự sắp xếp các đặc tính phân tử trong không gian ba chiều. Mô hình bao gồm một số điểm nhất định, mỗi điểm được biểu diễn dưới dạng hình cầu có bán kính xác định để thể hiện dung sai cho độ lệch so với tọa độ chính xác. Các điểm pharmacophore có thể biểu thị cho một đặc tính riêng lẻ hoặc bất kỳ tổ hợp logic nào (“và”, “hoặc”, “không”) để kết hợp các đặc tính vào cùng một điểm. Từ khi kỹ thuật tìm kiếm cấu dạng 3 chiều được phát triển, pharmacophore đã trở thành một trong những công cụ đơn giản nhưng hiệu quả trong lĩnh vực thiết kế thuốc với sự trợ giúp của máy tính (computer-aided drug design – CADD) nhằm sàng lọc ảo, thiết kế *de novo* và tối ưu hóa chất khởi nguồn. Trong đó, hai hướng tiếp cận chính của pharmacophore là dựa trên phối tử (ligand-based pharmacophore – LBP) và dựa trên cấu trúc mục tiêu (structure-based pharmacophore – SBP).^{110,111}

Mô hình pharmacophore dựa vào phối tử (**Hình 1.6B**) là một trong những chiến lược chính của thiết kế thuốc trong điều kiện cấu trúc mục tiêu chưa được xác định. LBP được tiến hành bằng cách xác định những đặc tính chung của một tập hợp cấu trúc 3D của các phối tử đã biết trước hoạt tính sinh học trên một đích tác động cụ thể. Quá trình xây dựng mô hình LBP dựa vào phối tử bao gồm hai bước chính: (i) tạo tập hợp cấu dạng không gian tương ứng của các phối tử trong tập chất huấn luyện nhằm

thể hiện sự linh động trong thực tế của các phối tử, (ii) giống hàng các cấu dạng trong không gian 3 chiều nhằm xác định các “đặc tính chung” để đưa vào mô hình. Việc kiểm soát tính linh động về cấu dạng của phối tử và giống hàng một cách hợp lý là các lưu ý quan trọng để tạo ra một mô hình LBP đáng tin cậy.¹¹⁰ Cuối cùng, mô hình cần được đánh giá khả năng phân biệt các phối tử có và không có hoạt tính bởi một tập kiểm tra phù hợp.

Ngược lại, mô hình pharmacophore dựa trên cấu trúc mục tiêu được xây dựng bằng cách làm việc trực tiếp trên cấu trúc 3D của đại phân tử sinh học. SBP có thể được phân loại chi tiết hơn thành mô hình được xây dựng chỉ dựa vào cấu trúc của đại phân tử (tức apoprotein, **Hình 1.6C**) hoặc được thiết lập dựa trên phức hợp giữa đại phân tử và phối tử (tức holoprotein, **Hình 1.6D**).¹¹⁰



Hình 1.6. Mô hình pharmacophore trong thiết kế thuốc với sự trợ giúp của máy tính (A) Một số đặc tính pharmacophore cơ bản. (B) Mô hình LBP. (C) Mô hình SBP ở dạng không có phối tử (apoprotein) và (D) có phối tử gắn kết (holoprotein).

Hiện nay, nhiều phần mềm khác nhau có thể hỗ trợ xây dựng mô hình pharmacophore. Tiêu biểu là công cụ MOE Pharmacophore Elucidator và Editor, chương trình Catalyst trong gói phần mềm BIOVIA Discovery Studio, công cụ Phase trong gói phần mềm Schrödinger Suite, công cụ GASP của phần mềm Sybyl-X hoặc chương trình LigandScout. Ngoài ra, các công cụ trực tuyến cũng có thể hỗ trợ việc xây dựng mô hình và thực hiện sàng lọc ảo như PharmIT, ZINCPharmer, PharmaGist hay PharmMapper.^{112,113}

1.2.1.2. *Đánh giá mô hình pharmacophore*

Để đánh giá hiệu năng sàng lọc của một mô hình pharmacophore, các chỉ số thường được sử dụng bao gồm độ nhạy (Se), độ đặc hiệu (Sp), tỉ suất hoạt tính (Ya), điểm số Güner–Henry (GH), hệ số làm giàu (EF) và phân tích đường cong ROC.¹¹⁴ Tập dữ liệu được sử dụng để đánh giá mô hình cần chứa các chất đã biết là có hoạt tính (active) và không có hoạt tính (inactive). Nếu không có sẵn các chất không có hoạt tính xác định bằng thực nghiệm, các hợp chất “mồi nhử” (decoy) có thể được sử dụng. Đây là các chất được giả định là không có hoạt tính và được tạo ra bằng các công cụ máy tính dựa trên cấu trúc của các chất có hoạt tính.¹¹⁵ Các chỉ số đánh giá mô hình pharmacophore được tính toán dựa trên ma trận nhầm lẫn trong sàng lọc ảo được minh họa ở **Bảng 1.2**.¹¹⁶

Bảng 1.2. Ma trận nhầm lẫn của sàng lọc ảo trong thiết kế thuốc

<i>Pharmacophore</i>	<i>Thực nghiệm</i>	
	Chất có hoạt tính	Chất không có hoạt tính
Thỏa mô hình	Dương tính thật (TP)	Dương tính giả (FP)
Không thỏa	Âm tính giả (FN)	Âm tính thật (TN)

Độ nhạy, độ đặc hiệu, tỉ suất hoạt tính và điểm số GH lần lượt được tính theo các công thức (1)–(4).¹¹⁴

$$Se = \frac{TP}{TP + FN} \quad (1) \quad Sp = \frac{TN}{TN + FP} \quad (2)$$

$$Ya = \frac{TP}{TP + FP} \quad (3) \quad GH = \left(\frac{3}{4}Ya + \frac{1}{4}Se \right) \times Sp \quad (4)$$

Đường cong đặc trưng của bộ nhận tín hiệu (Receiver Operating Characteristic – ROC) là đồ thị biểu diễn cùng lúc sự thay đổi của độ nhạy (Se) và độ đặc hiệu (1 – Sp), hay nói cách khác là biểu diễn tỉ lệ dương tính thật so với tỉ lệ dương tính giả tại từng ngưỡng phân loại có thể xảy ra của một mô hình.¹¹⁷ Phần diện tích dưới đường cong (area under the curve – AUC) ROC có thể được sử dụng để đánh giá khả năng phân biệt của mô hình đối với các chất có và không có hoạt tính trong tập dữ liệu. Giá trị AUC = 0,5 tương ứng với đường thẳng $y = x$ trên đồ thị cho biết mô hình không thể phân biệt giữa chất có và không có hoạt tính, tức sự phân loại là ngẫu nhiên. Một mô hình có ROC-AUC càng cao thì càng đáng tin cậy về hiệu năng sàng lọc. Giá trị AUC từ 0,7–0,8 cho thấy mô hình có thể chấp nhận được; 0,8–0,9 gợi ý một mô hình hoàn hảo; và >0,9 cho thấy mô hình tốt vượt trên sự mong đợi.¹¹⁸

Hệ số làm giàu (enrichment factor – EF) là một chỉ số quan trọng trong đánh giá các mô hình sàng lọc ảo. Sau khi sàng lọc qua mô hình, các chất trong tập kiểm tra

được xếp hạng (ví dụ, theo giá trị RMSD so với mô hình pharmacophore). Giá trị $EF_{x\%}$ là hệ số làm giàu ở $x\%$ được tính theo công thức (5).

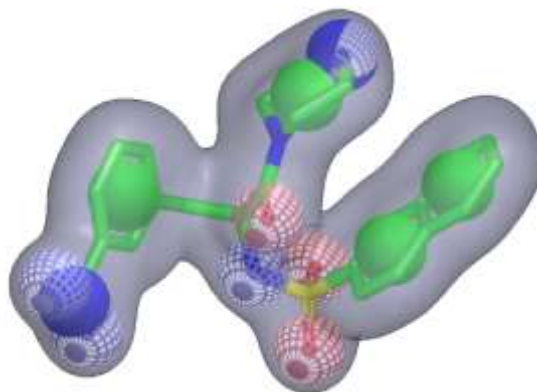
$$EF_{x\%} = \frac{Hit_{x\%}/N_{x\%}}{Hit_t/N_t} \quad (5)$$

Trong đó, N_t là tổng số chất của tập kiểm tra, với Hit_t là số lượng chất có hoạt tính thực sự. $N_{x\%}$ là số lượng tương ứng với $x\%$ số chất được xếp hạng tốt nhất của kết quả sàng lọc, với $Hit_{x\%}$ là số chất có hoạt tính thực sự trong $N_{x\%}$.^{119,120} Hệ số làm giàu nhỏ cho thấy kết quả phân loại bằng mô hình được sắp xếp một cách ngẫu nhiên và hầu như không có sự làm giàu nào đạt được bằng mô hình. Hệ số làm giàu lớn gợi ý rằng chỉ cần một tỉ lệ nhỏ của thư viện cần được sàng lọc có thể tìm một số lượng lớn các chất hoạt tính.¹²⁰

Bên cạnh đó, Empereur-mot và cộng sự còn đề xuất đường cong dự đoán (predictiveness curves – PC) để bổ sung cho đường cong ROC trong việc đánh giá khả năng nhận dạng sớm các hợp chất có hoạt tính bởi mô hình sàng lọc ảo.¹¹⁹ Trong đó, sự phân tán của điểm số được mô tả rõ ràng bằng PC và giúp định lượng hiệu suất dự đoán của mô hình. Tổng mức thu được chuẩn hóa (standardized total gain – $\overline{TG}$) được tính từ PC thể hiện mức độ phân biệt các hợp chất có hoạt tính do sự thay đổi của các điểm số sàng lọc trên toàn bộ tập dữ liệu. $\overline{TG} > 0,25$ kết hợp với ROC-AUC $> 0,5$ cho thấy sự thay đổi điểm số có ý nghĩa trong việc phân biệt các hợp chất có hoạt tính.¹²¹

1.2.2. Truy vấn tương đồng hình dạng phân tử 3 chiều

Các chất có sự tương đồng về hình dạng 3 chiều được cho là có khả năng cho hoạt tính tương tự nhau. Tuy nhiên, so sánh hình dạng phân tử đã từng là một tác vụ khó khăn cho các phương pháp tính toán dựa trên hàm nhị phân cho đến khi Grant và cộng sự đề xuất thuật toán sử dụng bộ mô tả Gaussian.^{122,123} Dựa trên hàm đặc tính Gaussian, OpenEye đã phát triển chương trình chồng phủ nhanh các cấu trúc hóa học (Rapid Overlay of Chemical Structures – ROCS). Triết lý của OpenEye cho rằng phân tử có hai thông số mô tả cơ bản: hình dạng và tính điện. Các đặc tính về tính điện như khả năng cho hay nhận liên kết hydro, điện tích âm hoặc dương, tính kỵ nước và vòng thơm được mô tả bằng các bộ màu sắc đơn giản (**Hình 1.7**). Nhờ đó, ROCS cho phép tính toán nhanh chóng sự tương đồng về hình dạng ba chiều và tính chất hóa học của phân tử thể hiện qua các màu sắc quy ước.¹²⁴ ROCS vẫn đảm bảo được các ưu điểm của phương pháp tìm kiếm tương đồng 3D (so với 2D), nhưng có tốc độ sàng lọc rất nhanh (1000–2000 bộ cấu dạng mỗi giây).



Hình 1.7. Một ví dụ về truy vấn ROCS

Hình dạng phân tử 3D được thể hiện bởi phần màu xám. Các màu sắc quy ước thể hiện cho các tính chất hóa học, trong đó màu xanh lá cây, xanh dương và đỏ lần lượt đại diện cho các đặc tính vòng, cation hoặc cho liên kết hydro, và nhận liên kết hydro.

Truy vấn tương đồng hình dạng 3 chiều có thể ứng dụng trong sàng lọc ảo với hiệu quả cao hơn các bộ mô tả 2 chiều, và nhanh hơn nhiều so với mô phỏng gắn kết phân tử. Phương pháp này cũng có thể ứng dụng trong tìm kiếm khung cấu trúc mới cho chất khởi nguồn hoặc dự đoán tư thế gắn kết của phối tử trên vị trí hoạt động của protein. Do sử dụng thuật toán xấp xỉ Gaussian, ROCS có thể tính điểm cho sự tương đồng hình dạng và tính chất của hai phân tử, ví dụ như hệ số Tanimoto được tính bởi công thức (6):

$$T(A, B) = \frac{O_{AB}}{O_{AA} + O_{BB} - O_{AB}} \quad (6)$$

với O_{AB} là độ chồng phủ giữa phân tử A và B, O_{AA} và O_{BB} lần lượt là độ tự chồng phủ của A và B.¹²⁴

Một truy vấn tương đồng hình dạng 3 chiều chạy trên phần mềm ROCS có thể là một hoặc nhiều phân tử hoạt tính, một tập hợp các mảnh cấu trúc hay thậm chí là các nguyên tử giả. Mô hình lưới thu được từ mật độ điện tử trong tinh thể học tia X cũng có thể được sử dụng làm truy vấn cho ROCS. Đối tượng truy vấn đa dạng, tốc độ sàng lọc nhanh và có chức năng tính điểm là những ưu điểm quan trọng của ROCS. Trong một nghiên cứu so sánh, ngay cả khi không biết cấu trúc mục tiêu tác động, ROCS vẫn thể hiện hiệu năng sàng lọc bằng hoặc vượt trội hơn so với các chương trình mô phỏng gắn kết phân tử.¹²⁵ Là một mô hình sàng lọc ảo, truy vấn ROCS cũng được đánh giá qua đường cong ROC và hệ số làm giàu.

1.2.3. Mô hình mối liên quan định lượng giữa cấu trúc – tác động

Mô hình mối liên quan định lượng giữa cấu trúc – tác động (QSAR) là một phương pháp hóa tin dựa trên phối tử và được sử dụng rộng rãi để xác định mối quan hệ toán học giữa hoạt tính sinh học của một phân tử và các đặc tính cấu trúc của nó

(thể hiện qua thông số mô tả hoặc dấu vân tay phân tử).¹²⁶ Những thay đổi dù nhỏ nhất trong cấu trúc cũng có thể dẫn đến các thay đổi lớn về hoạt tính dược lực hay độc tính của một phân tử. Do đó, QSAR là một mô hình lý thuyết hữu ích để thiết kế các phân tử mới có các đặc tính mong muốn. Nhờ giảm thời gian và chi phí cho thực nghiệm, QSAR có ứng dụng quan trọng trong việc xác định và tối ưu hóa chất khởi nguồn.¹²⁷ Mô hình QSAR có thể được biểu diễn dưới dạng toán học như sau:

$$\text{Hoạt tính} = f(\text{thuộc tính hóa học}) = f(\text{thông tin định lượng cấu trúc phân tử})$$

Ở đây, hoạt tính là biến phụ thuộc và các thuộc tính hóa học là biến độc lập. Các thuộc tính hóa học được biểu diễn thành các thông tin định lượng dựa trên các phương pháp lý thuyết hoặc thực nghiệm. Mô hình QSAR với hoạt tính sinh học phụ thuộc nhiều biến thông số mô tả cấu trúc hóa học được biểu diễn bởi phương trình:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + \dots + a_nX_n$$

Theo hướng dẫn của Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD), mô hình QSAR cần được xây dựng và thẩm định để đạt các tiêu chí:

1. Một điểm cuối xác định (tức hoạt tính sinh học)
2. Một thuật toán rõ ràng
3. Một miền ứng dụng được xác định
4. Các phương pháp đánh giá thích hợp đối với độ khớp, độ tin cậy và khả năng dự đoán của mô hình
5. Một sự diễn giải mang tính cơ học nếu có thể.¹²⁸

Hai hướng tiếp cận thường gặp trong thiết lập mô hình QSAR là xây dựng mô hình hồi quy và mô hình phân loại. Các phương pháp xây dựng mô hình hồi quy thường được sử dụng bao gồm hồi quy đa biến, bình phương tối thiểu từng phần hay phân tích hồi quy thành phần chính. Mô hình phân loại có thể được thiết lập bằng các thuật toán phân tích phân biệt tuyến tính, hồi quy logistic hay thuật toán phân cụm. Hiện nay, với sự phát triển của dữ liệu lớn và trí tuệ nhân tạo, các mô hình QSAR còn có thể được huấn luyện với các thuật toán học máy và học sâu.¹²⁷

Để xác thực một mô hình QSAR hồi quy, các chỉ số thống kê cần được tính toán để đánh giá độ khớp của mô hình qua các giá trị R^2 , $R^2_{\text{hiệu chỉnh}}$; độ ổn định của mô hình thông qua đánh giá chéo *bỏ-ra-một* (*leave-one-out* – LOO) với các chỉ số Q^2_{LOO} , $r^2_{\text{m(LOO)}}$ và khả năng dự đoán ngoại của mô hình trên tập kiểm tra qua chỉ số R^2_{pred} , $r^2_{\text{m(Test)}}$. Các chỉ số này được tính toán theo các công thức ở **Bảng 1.3**.¹²⁷

Bảng 1.3. Các chỉ số đánh giá mô hình QSAR hồi quy

Chỉ số đánh giá mô hình QSAR	Công thức tính
Độ khớp của mô hình	
Hệ số xác định	$R^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{\text{exp}} - Y_{\text{calc}})^2}{\sum(Y_{\text{exp}} - \bar{Y}_{\text{train}})^2}$
Hệ số xác định hiệu chỉnh	$R_a^2 = \frac{\{(n-1) \times R^2\} - p}{n - p - 1}$
Căn bậc hai sai số bình phương	$\text{RMSE}_{\text{train}} = \sqrt{\frac{\sum(Y_{\text{exp}(\text{train})} - Y_{\text{calc}(\text{train})})^2}{n_{\text{train}}}}$
Sai số tuyệt đối trung bình	$\text{MAE}_{\text{train}} = \frac{1}{n} \times \sum Y_{\text{exp}} - Y_{\text{calc}} $
Độ ổn định của mô hình qua đánh giá chéo nội	$Q_{\text{LOO}}^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{\text{exp}(\text{train})} - Y_{\text{pred}(\text{train})})^2}{\sum(Y_{\text{obs}(\text{train})} - \bar{Y}_{\text{train}})^2}$
Khả năng dự đoán ngoại trên tập kiểm tra	$Q_{\text{F1}}^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{\text{exp}(\text{test})} - Y_{\text{pred}(\text{test})})^2}{\sum(Y_{\text{exp}(\text{test})} - \bar{Y}_{\text{train}})^2}$ $Q_{\text{F2}}^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{\text{exp}(\text{test})} - Y_{\text{pred}(\text{test})})^2}{\sum(Y_{\text{exp}(\text{test})} - \bar{Y}_{\text{test}})^2}$ $\text{MAE}_{\text{test}} = \frac{1}{n} \times \sum Y_{\text{exp}} - Y_{\text{pred}} $
Hệ số tương quan phù hợp	$\text{CCC} = \frac{2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 + n(\bar{x} - \bar{y})^2}$
Đánh giá dựa trên chỉ số r_m^2	$\bar{r}_m^2 = \frac{r_m^2 + r_m'^2}{2} \quad ; \quad \Delta r_m^2 = r_m^2 - r_m'^2 $
với:	
$r_m^2 = r^2 \times \left(1 - \sqrt{r^2 - r_0^2}\right)$	
$r_m'^2 = r^2 \times \left(1 - \sqrt{r^2 - r_0'^2}\right)$	

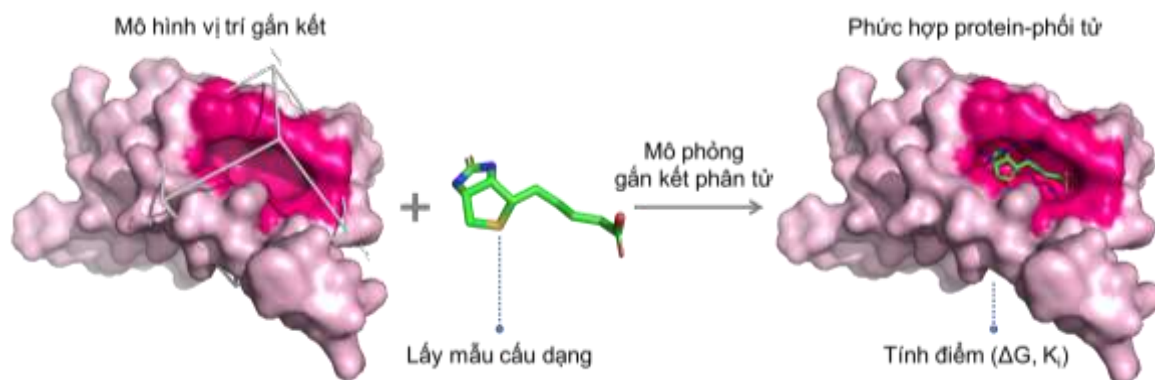
* Y_{exp} : giá trị hoạt tính sinh học thực nghiệm, Y_{calc} : giá trị hoạt tính được mô hình dự đoán trên tập huấn luyện (train), Y_{pred} : giá trị hoạt tính được dự đoán trên tập kiểm tra (test), n : số chất được sử dụng để xây dựng mô hình, p : số biến độc lập của mô hình, r^2 : bình phương hệ số tương quan của đường hồi quy giữa giá trị hoạt tính thực nghiệm và dự đoán, r_0^2 : bình phương hệ số tương quan của đường hồi quy với trục x là giá trị hoạt tính dự đoán, trục y là giá trị hoạt tính thực nghiệm và có hệ số chặn bằng 0, $r_0'^2$ có cùng cách tính như r_0^2 nhưng hai trục x, y được đảo ngược.

Sử dụng mô hình QSAR để dự đoán cho tất cả các loại hợp chất mới là không thực tế. Để có những dự đoán có ý nghĩa, mô hình QSAR phải được sử dụng cho các hợp chất nằm trong miền ứng dụng của nó. Miền ứng dụng của mô hình QSAR được xem là không gian hóa học của tập xây dựng mà dựa trên đó mô hình được phát triển, có thể được xác định dựa trên phạm vi giá trị của thông số mô tả, các phương pháp dựa trên hình học, khoảng cách hoặc phân bố mật độ xác suất.¹²⁷

1.2.4. Mô phỏng gắn kết phân tử

1.2.4.1. Các phương thức gắn kết phân tử

Gắn kết phân tử (molecular docking) là phương pháp đã được sử dụng từ những năm 1980 và hiện nay đã trở thành công cụ quan trọng và phổ biến nhất trong lĩnh vực SBDD. Phương pháp này mô phỏng sự gắn kết của một phối tử vào mô hình vị trí gắn kết của một đại phân tử sinh học khác (protein, enzyme hay acid nucleic) trong không gian ba chiều (**Hình 1.8**). Các phần mềm dựa trên những thuật toán khác nhau đã được phát triển cho mô phỏng gắn kết phân tử. Hiểu biết chính xác về vị trí gắn kết trên đại phân tử sinh học là yếu tố giúp cho quá trình gắn kết phân tử được thực hiện hiệu quả và cho kết quả đáng tin cậy.¹²⁹



Hình 1.8. Nguyên tắc cơ bản của mô phỏng gắn kết phân tử

Từ mô hình “ổ khóa và chìa khóa” được đề xuất bởi Fischer (1894)¹³⁰ để mô tả cơ chế gắn kết giữa thụ thể và phối tử, các chương trình gắn kết phân tử đầu tiên đã áp dụng thuật toán mô phỏng dựa trên lý thuyết này. Các phần mềm quy định cả thụ thể và phối tử đều là những phân tử cứng nhắc. Sau đó, với sự phát triển của máy tính, các chương trình bắt đầu áp dụng thuật toán mô phỏng dựa trên thuyết gắn kết “phù hợp cảm ứng” được đề xuất bởi Koshland (1958).¹³⁰ Lý thuyết này cho rằng cả thụ thể và phối tử thay đổi cấu dạng liên tục để gắn kết với nhau và gợi ý rằng thụ thể và phối tử cần được giữ linh động trong quá trình mô phỏng gắn kết. Từ đó, các thuật toán mô phỏng gắn kết “bán linh động” ra đời, trong đó chương trình xem phối tử là những phân tử linh động, còn protein mục tiêu vẫn là một phân tử cứng nhắc. Một

cách chính xác hơn nhưng cũng tiêu tốn tài nguyên máy tính hơn, các phương pháp mô phỏng gắn kết “linh động hoàn toàn” xem cả phối tử và cấu trúc mục tiêu là phân tử linh động. Để cân đối giữa độ chính xác và thời gian tính toán, gắn kết bán linh động là phương pháp được áp dụng phổ biến nhất hiện nay.

Mục tiêu của gắn kết phân tử là dự đoán một cấu trúc phức hợp giữa mục tiêu tác động và phối tử. Quá trình này gồm hai bước liên quan đến nhau: (i) lấy mẫu các cấu dạng của phối tử trong vị trí hoạt động của protein mục tiêu, (ii) xếp hạng các cấu dạng gắn kết này thông qua một hàm tính điểm (**Hình 1.8**). Các phương pháp lấy mẫu cấu dạng điển hình gồm thuật toán so khớp, tìm kiếm hệ thống và tìm kiếm ngẫu nhiên. Đối với tác vụ tính điểm, các hàm có thể dựa trên trường lực, kinh nghiệm, kiến thức hoặc mô hình học máy. Lý tưởng nhất là các thuật toán chọn mẫu cấu dạng có thể tái tạo được cấu dạng gắn kết thực nghiệm của phối tử và hàm tính điểm cũng sẽ xếp hạng nó cao nhất trong số tất cả các cấu dạng mô phỏng gắn kết có thể tìm kiếm được.^{129,131,132}

1.2.4.2. Đánh giá quy trình mô phỏng gắn kết phân tử

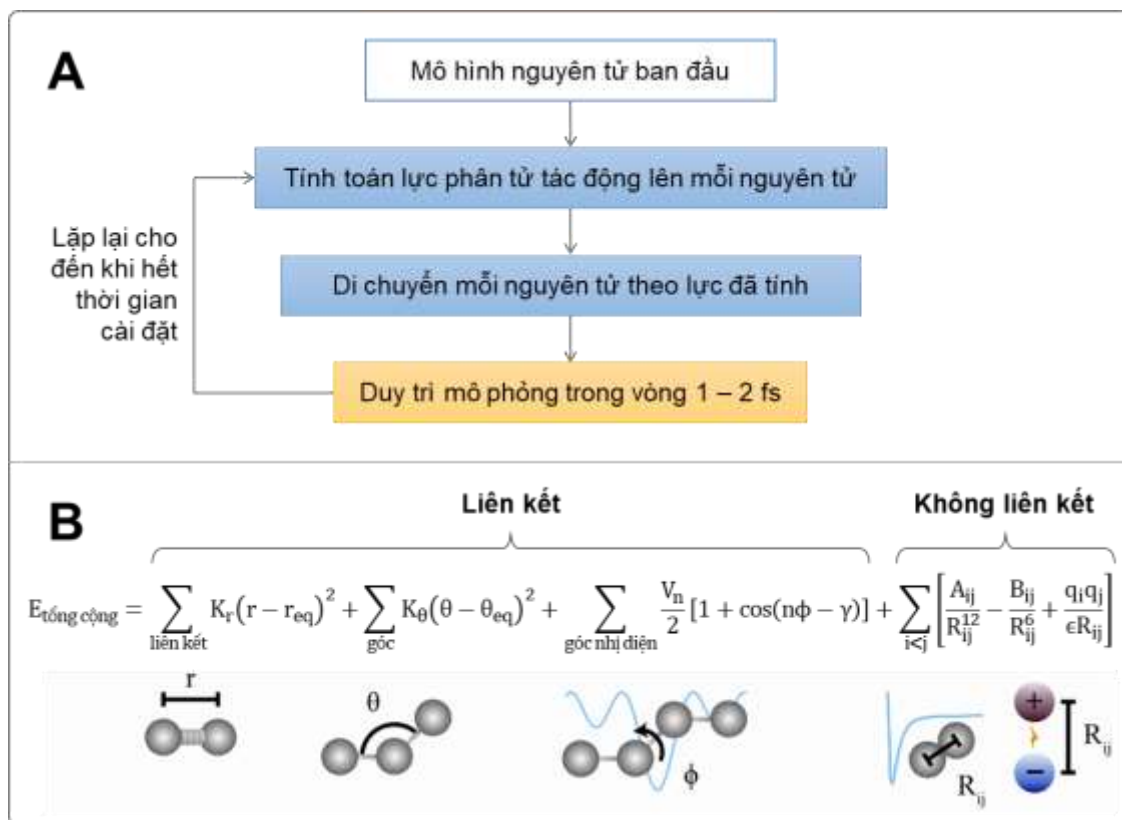
Các tiêu chí về hiệu quả gắn kết và hiệu năng sàng lọc thường được sử dụng để đánh giá mô hình gắn kết phân tử. Đối với hiệu quả gắn kết, các phương pháp thường được sử dụng là tái gắn kết và gắn kết chéo. Một mô hình có năng lực gắn kết tốt khi có thể tái tạo cấu dạng gắn kết thực nghiệm của phối tử, phản ánh qua giá trị RMSD giữa cấu dạng được mô phỏng gắn kết và thực nghiệm không quá 2 Å. Bên cạnh đó, hàm chấm điểm của phần mềm cũng phải dự đoán được ái lực gắn kết tương quan với dữ liệu thực nghiệm.¹³³ Để đánh giá hiệu năng sàng lọc của mô hình, tập dữ liệu chứa các phối tử có hoạt tính và tập chất không có hoạt tính lần lượt được sàng lọc qua mô hình gắn kết. Nếu không có tập chất không hoạt tính thì tập “mồi nhử” (decoy) có thể được sử dụng. Điển hình là công cụ DUD (directory of useful decoys), được giới thiệu lần đầu tiên bởi Huang và cộng sự (2006), nhằm tạo ra các hợp chất mồi nhử để sử dụng cho mục đích đánh giá các mô hình gắn kết phân tử.¹³⁴ Hiện nay, DUD có các phiên bản mới hơn gồm DUD-E và DUDE-Z.^{135,136} Sau khi sàng lọc, khả năng phân biệt chất có và không có hoạt tính của mô hình được đánh giá qua phân tích đường cong ROC, PC và hệ số làm giàu đã được mô tả tại **Mục 1.2.1.2**.

1.2.5. Mô phỏng động lực học phân tử

1.2.5.1. Mô phỏng động lực học phân tử trong khám phá thuốc

Mọi sinh vật sống đều được cấu tạo từ các nguyên tử, và bản chất của sự sống chính là sự chuyển động “lắc lư” của các nguyên tử đó. Các định luật của cơ học lượng tử chi phối những chuyển động của thế giới vi mô một cách sâu sắc. Tuy nhiên,

các tính toán cần thiết để mô tả các chuyển động cơ học lượng tử và phản ứng hóa học của các hệ phân tử lớn thường rất phức tạp. Do đó, mô phỏng động lực học phân tử (molecular dynamics – MD) được phát triển vào cuối những năm 1970 để khắc phục hạn chế này. Bằng cách sử dụng các phép tính gần đúng và đơn giản dựa trên lý thuyết của vật lý Newton, MD mô phỏng chuyển động của các nguyên tử và làm giảm độ phức tạp trong tính toán. Quy trình chung của phép tính gần đúng được sử dụng trong mô phỏng MD được minh họa ở **Hình 1.9A**.



Hình 1.9. Nguyên tắc cơ bản của mô phỏng động lực học phân tử
(A) Các quá trình trong mô phỏng động lực học phân tử. (B) Một ví dụ về phương trình được sử dụng để xấp xỉ các lực chi phối sự chuyển động của phân tử.

Nguồn: Durrant và cộng sự (2011)¹³⁷

Đầu tiên, một mô hình của hệ nguyên tử được sử dụng như điểm bắt đầu của quá trình mô phỏng. Sau đó, các lực phân tử chi phối sự chuyển động của hệ được ước tính từ phương trình như ví dụ ở **Hình 1.9B**, gồm các lực phát sinh từ sự tương tác giữa các nguyên tử liên kết và không liên kết. Các liên kết hóa học và góc nguyên tử được mô hình hóa như các lò xo đơn giản. Các góc nhị diện được mô hình hóa bằng cách sử dụng một hàm hình sin để tính toán xấp xỉ sự khác biệt năng lượng giữa các cấu dạng bị che khuất và những cấu dạng so le. Các lực không liên kết phát sinh do các tương tác *Van der Waals* được mô hình hóa bằng cách sử dụng thế năng Lennard-Jones và các tương tác tĩnh điện được mô hình hóa bằng định luật Coulomb.¹³⁷

Để mô phỏng giống nhất với “hành vi” của các phân tử thật trong chuyển động, các đại lượng năng lượng nêu trên cần được tham số hoá để phù hợp với tính toán cơ học lượng tử và dữ liệu thực nghiệm. Việc tham số hoá này bao gồm sự xác định độ cứng và độ dài của lò xo mô phỏng liên kết hoá học và góc liên kết, xác định điện tích nguyên tử được sử dụng để tính toán năng lượng tương tác tĩnh điện, xác định đúng bán kính tương tác *Van der Waals* và nhiều yếu tố khác. Những tham số này được gọi là “trường lực” (force field). Một số trường lực thường được sử dụng để mô phỏng MD như AMBER, CHARMM, OPLS hay GROMOS. Khi lực tương tác lên từng nguyên tử trong hệ được xác định, vị trí của các nguyên tử này sẽ được di chuyển dựa trên các định luật của Newton về sự chuyển động. Từ đó, gia tốc và vận tốc được tính toán để cập nhật vị trí mới của các nguyên tử. Mỗi lần mô phỏng sự chuyển động được thực hiện trong 1 hoặc 2 femto giây và quá trình này được thực hiện tiếp tục hàng triệu đến hàng tỉ lần cho đến khi hết thời gian mô phỏng được cài đặt trước.

1.2.5.2. Các phân tích trên quỹ đạo mô phỏng động lực học phân tử

Căn bậc hai trung bình bình phương độ lệch

Căn bậc hai trung bình bình phương độ lệch (Root Mean Square Deviation – RMSD) được sử dụng để theo dõi độ dịch chuyển của phân tử (protein và phối tử) ở một thời điểm xác định trong quá trình mô phỏng so với một cấu trúc tham chiếu (thường là cấu trúc tinh thể hoặc cấu trúc tại thời điểm bắt đầu của quá trình mô phỏng). RMSD của phân tử trong khung hình x ở thời điểm t của quỹ đạo mô phỏng MD được tính bởi công thức (7):

$$\text{RMSD}_x = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r'_i(t_x) - r_i(t_{tc}))^2} \quad (7)$$

Với N là tổng số nguyên tử của phân tử, $r_i(t_{tc})$ là tọa độ các nguyên tử của phân tử ở thời điểm tham chiếu, $r'_i(t_x)$ là vị trí của các nguyên tử tương ứng trong khung hình x ở thời điểm t_x . Giá trị RMSD được tính toán cho mọi khung hình của quỹ đạo mô phỏng và biểu diễn thành đồ thị theo thời gian. Biểu đồ RMSD thường được sử dụng để đánh giá sự ổn định của phân tử protein và phối tử trong quá trình mô phỏng.¹³⁸

Căn bậc hai trung bình bình phương độ dao động

Căn bậc hai trung bình bình phương độ dao động (Root Mean Square Fluctuation – RMSF) là thước đo động lực học của mỗi nguyên tử trong hệ mô phỏng. RMSF

được tính toán từ sự dao động của các vị trí nguyên tử dọc theo quỹ đạo MD theo công thức (8):

$$\text{RMSF}_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T \langle (r'_i(t) - r_i(t_{tc}))^2 \rangle} \quad (8)$$

Trong đó, T là thời gian của quỹ đạo mô phỏng cần tính toán, $r_i(t_{tc})$ là tọa độ của nguyên tử thứ i tại thời điểm tham chiếu, $r'_i(t)$ là tọa độ của nguyên tử đó tại thời điểm t . Thông thường, giá trị RMSF được tính toán cho nguyên tử C_α của các acid amin trong cấu trúc protein và cho các nguyên tử nặng của phối tử.¹³⁸

Bán kính quay

Sự phân tán khối lượng của protein xung quanh một trục quay có thể được đánh giá qua bán kính quay (Radius of gyration – R_g). Đại lượng này tương đương với bán kính của một quả cầu có khối lượng bằng với protein và được tính bởi công thức (9):

$$R_g(t) = \sqrt{\frac{\sum_i m_i (r_i(t) - r_{\text{tâm}})^2}{\sum_i m_i}} \quad (9)$$

Với t là thời gian, m_i và r_i lần lượt là khối lượng và vị trí của nguyên tử thứ i và $r_{\text{tâm}}$ là tọa độ của tâm protein.¹³⁸

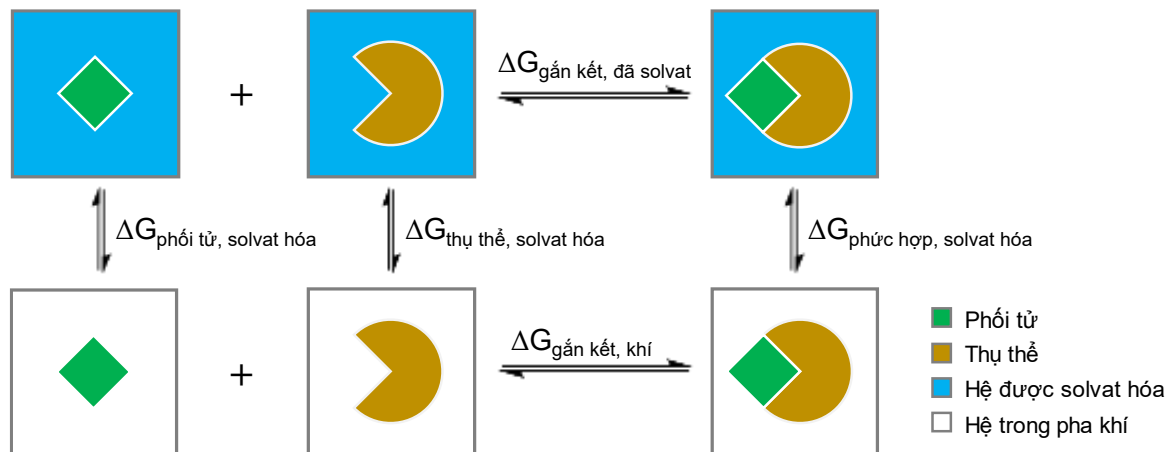
Diện tích bề mặt tiếp cận dung môi

Diện tích bề mặt tiếp cận dung môi (Solvent Accessible Surface Area – SASA) là phần diện tích mà protein có thể tiếp xúc với phân tử dung môi của môi trường mô phỏng. SASA là một trong các đại lượng để nghiên cứu sự cuộn gấp và độ ổn định của protein. SASA có thể được sử dụng trong tính toán năng lượng tự do hoặc khảo sát các tính chất lý sinh và nhiệt động của protein.¹³⁹

1.2.6. Năng lượng tự do gắn kết

Sự mô tả đặc điểm cấu trúc và năng lượng của phức hợp phân tử là chìa khóa quan trọng để giải thích cho nhiều quá trình sinh học, trong đó có sự gắn kết giữa thuốc và protein mục tiêu. Sự phát triển của mô phỏng MD đã thúc đẩy lĩnh vực tính toán năng lượng tự do gắn kết (binding free energy – BFE) của phức hợp protein–phối tử.¹⁴⁰ Nhiều loạn năng lượng tự do và tích phân nhiệt động lực học là các phương pháp tính BFE nghiêm ngặt về lý thuyết nhưng lại tiêu tốn tài nguyên tính toán rất lớn. Trong khi đó, tính toán BFE ở trạng thái cuối yêu cầu năng lực tính toán ít hơn nhờ việc sử dụng mô hình dung môi không tường minh và bỏ qua các mô phỏng trạng thái trung gian.

Vì vậy, các phương pháp này đã được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu sinh học tính toán. Trong đó, phương pháp Cơ học Phân tử – Diện tích bề mặt Poisson-Boltzmann (MM-PBSA) và Cơ học Phân tử – Diện tích bề mặt Born Tổng quát (MM-GBSA) tính toán BFE bằng cách tính chênh lệch năng lượng tự do giữa trạng thái gắn kết và không gắn kết của hai phân tử được solvat hóa ($\Delta G_{\text{gắn kết, đã solvat}}$) theo chu kỳ nhiệt động ở **Hình 1.10**.¹⁴¹



Hình 1.10. Chu kỳ nhiệt động trong tính toán năng lượng tự do gắn kết của phức hợp protein–phối tử

Từ đó, $\Delta G_{\text{gắn kết, đã solvat}}$ được tính toán theo công thức (10):

$$\Delta G_{\text{gắn kết, đã solvat}} = \Delta G_{\text{phức hợp, solv}} - (\Delta G_{\text{thụ thể, solv}} + \Delta G_{\text{phối tử, solv}}) \quad (10)$$

Sự chênh lệch năng lượng tự do liên quan đến mỗi đại lượng ở vế phải của công thức (10) được ước tính theo công thức (11):

$$\Delta G_{\text{đã solvat}} = E_{\text{khí}} + \Delta G_{\text{solvat hóa}} - TS_{\text{chất tan}} \quad (11)$$

Trong đó, năng lượng pha khí ($E_{\text{khí}}$) được sử dụng là năng lượng cơ học phân tử (E_{MM}) từ trường lực và đóng góp entropy (S) được ước tính từ các giá trị gần đúng đã biết. Năng lượng tự do solvat hóa ($\Delta G_{\text{đã solvat}}$) có thể được xem là tổng của các đóng góp tĩnh điện và không phân cực, được tính từ các mô hình dung môi không tường minh như Poisson-Boltzmann (PB) hoặc Born Tổng quát (GB). Để so sánh BFE của các phối tử trong phức hợp với cùng một protein, tức các hệ thống gần giống và có entropy gần bằng nhau, thì giá trị entropy có thể được bỏ qua trong quá trình tính toán.¹⁴¹ Với một mô phỏng MD đạt trạng thái cân bằng, $\Delta G_{\text{gắn kết, đã solv}}$ được tính dựa trên tập hợp các khung hình của quỹ đạo mô phỏng.

1.2.7. Dự đoán tính chất dược động học và độc tính

Nguyên nhân quan trọng dẫn đến tỉ lệ thất bại cao khi phát triển một ứng viên thuốc là độc tính nghiêm trọng và các tính chất dược động học (ADMET) bất lợi. Để tăng tỉ lệ thành công, việc dự đoán sớm tính chất ADMET của các hợp chất “hit” và

chất khởi nguồn là cần thiết. Nhằm tiết kiệm thời gian và chi phí cho nghiên cứu thực nghiệm, các công cụ dự đoán ADMET *in silico* đã được áp dụng rộng rãi. Tuy nhiên các phần mềm thương mại chuyên dụng thường đắt tiền và nằm ngoài khả năng của các dự án học thuật. Những năm gần đây, nhiều công cụ trực tuyến miễn phí đã được giới thiệu như pkCSM, SwissADME, ADMETlab, admetSAR hay vNN-ADMET.¹⁴² Nghiên cứu của Dulsat và cộng sự (2023) đã chỉ ra rằng không có công cụ trực tuyến nào có thể cung cấp toàn bộ các thông số về tính chất lý hóa và ADMET, nhưng máy chủ ADMETlab được xem là nơi cung cấp nhiều nhất các thông số dự đoán với độ chính xác tốt nhất.¹⁴³

1.3. Các phương pháp *in vitro* đánh giá tác động ức chế hoạt tính của IL-33/ST2

1.3.1. Thử nghiệm đánh giá sự gắn kết của kháng thể hoặc phối tử phân tử nhỏ với IL-33 và ST2

Phổ cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) đã được sử dụng để khảo sát tác động ức chế của các đại phân tử sinh học (protein hoặc kháng thể đơn dòng) đối với sự tương tác của IL-33/ST2. Ví dụ, Osbourn và cộng sự (2017) đã báo cáo protein HpARI tiết bởi loài giun *Heligmosomoides polygyrus* ở chuột có tác động làm giảm đáp ứng dị ứng ở mô hình chuột bị hen suyễn. Phổ SPR đã được ứng dụng để xác định khả năng gắn kết của HpARI với IL-33 của chuột (mIL-33) và của người (hIL-33), thu được hằng số phân ly (K_D) lần lượt là 0,56 nM và 260 nM.¹⁴⁴ Tương tự, Murphy và cộng sự (2014) đã sử dụng phổ SPR để khám phá một số protein đối vận gắn kết IL-33 với $K_D < 5$ pM.¹⁴⁵ Trong nghiên cứu của Okragly và cộng sự (2021), phổ SPR được sử dụng để xác định ái lực gắn kết và độ đặc hiệu của các kháng thể đơn dòng với IL-33, dẫn đến sự khám phá torudokimab.¹⁵

Chuẩn độ nhiệt lượng đẳng nhiệt (ITC) là phương pháp được sử dụng bởi Holgado để xác định ái lực của protein bắt IL-33. Đây là một protein tái tổ hợp được thiết kế từ cấu trúc của thụ thể ST2 và đồng thụ thể IL-1RAcP. Kết quả của thử nghiệm cho thấy protein bắt có ái lực cao gấp 30 lần so với ST2 ($K_D = 0,125$ nM).

Kim và cộng sự (2016) đã ứng dụng phổ NMR để khảo sát sự gắn kết của các phối tử phân tử nhỏ với IL-33.²⁰ Trong phương pháp này, độ biến đổi dịch chuyển hóa học $\Delta\delta$ (chemical shift perturbations – CSP) gây nên bởi các tương tác không cộng hóa trị giữa protein và phối tử được dùng để ước tính hằng số phân ly K_D . Kỹ thuật này yêu cầu protein được đánh dấu ^{15}N . Với phổ HSQC được đo cho hỗn hợp protein–phối tử, nếu có tương tác xảy ra, các peak chéo ^1H – ^{15}N trong phổ NMR sẽ bị

dịch chuyển ra khỏi vị trí ban đầu.¹⁴⁶ Bằng phương pháp này, phân tử nhỏ BTB11086 được xác định là phân tử nhỏ gắn kết đầu tiên trên IL-33.²⁰

Quang phổ huỳnh quang, cụ thể là phương pháp dập tắt huỳnh quang, cũng có thể được ứng dụng để khảo sát sự gắn kết của phối tử phân tử nhỏ với protein. Zazeri và cộng sự (2020) đã sử dụng phương pháp này để xác định ái lực gắn kết của piperin với IL-1 β ¹⁴⁷ – một cytokin cùng họ với IL-33. Kỹ thuật này có ưu điểm là sử dụng thiết bị đo quang phổ huỳnh quang phổ biến và nhờ đó có thể áp dụng trong điều kiện Việt Nam. Tuy nhiên, dập tắt huỳnh quang cũng có những nhược điểm như không thể áp dụng với các protein không phát huỳnh quang mạnh (do không chứa các acid amin phát huỳnh quang như Trp hoặc Tyr), có thể bị ảnh hưởng bởi hiệu ứng lọc nội tại hoặc các yếu tố gây nhiễu từ môi trường.^{148,149}

1.3.2. Thử nghiệm đánh giá sự ức chế cạnh tranh PPI của IL-33 và ST2

AlphaLISA là một phương pháp cải tiến của ELISA, có thể được ứng dụng để đo lường sự tương tác của hầu hết các mục tiêu trong khám phá thuốc mới, trong đó có nghiên cứu chất ức chế tương tác IL-33/ST2. Yang và cộng sự (2016) đã sử dụng AlphaLISA để sàng lọc thông lượng cao (High-Throughput Screening – HTS) chất ức chế ST2.^{150,151} Trong đó, các protein IL-33 và ST2 cần được thiết kế khi tái tổ hợp sao cho có thêm các thẻ tương ứng với chất cho và nhận tín hiệu AlphaLISA. Khi có sự gắn kết giữa IL-33 và ST2, các hạt cho và nhận phát quang này sẽ ở một khoảng cách đủ gần để có thể phát xạ tín hiệu thứ cấp ở bước sóng 615 nm, giúp phát hiện sự tương tác giữa hai protein. Sự gắn kết của chất ức chế phân tử nhỏ làm cho ST2 không thể gắn kết với IL-33 và do đó sẽ làm giảm cường độ phát quang thứ cấp này.

Huỳnh quang phân giải thời gian đồng nhất (Homogeneous Time Resolved Fluorescence – HTRF) là phương pháp đánh giá ái lực gắn kết tương tự AlphaLISA. HTRF dựa trên sự truyền năng lượng giữa hai chất phát huỳnh quang, một chất cho và một chất nhận khi ở gần nhau. Tuy nhiên, HTRF sử dụng các chất cho huỳnh quang đặc biệt chứa kim loại đất hiếm nhóm lantan. Bởi thời gian phát xạ dài hơn, các chất này tạo ra hiệu ứng phân giải theo thời gian và cho phép loại bỏ các tín hiệu huỳnh quang nền tồn tại trong thời gian ngắn. Phương pháp này đã được sử dụng bởi Yuan và cộng sự (2022) để khảo sát tác động ức chế tương tác IL-33/ST2 của các dẫn chất acid salicylic.¹⁵²

1.3.3. Thử nghiệm ức chế tín hiệu IL-33/ST2 dựa trên tế bào

Trong nghiên cứu của Ramadan và cộng sự (2018), sau khi sàng lọc thông lượng cao bằng phương pháp AlphaLISA, các hợp chất phân tử nhỏ có hoạt tính ức chế PPI được xác nhận hiệu lực bằng thử nghiệm dựa trên dòng tế bào thận phôi người (HEK)-

Blue IL-33.²² Đây là tế bào được biến đổi để phát hiện hoạt tính sinh học của IL-33 thông qua việc theo dõi tác động kích hoạt con đường NF- κ B và protein hoạt hóa 1 (AP-1). Dòng tế bào này đã được chuyển gen và biểu hiện thụ thể ST2 trên màng tế bào. Với sự hiện diện trong môi trường nuôi cấy, IL-33 gắn kết với thụ thể ST2 và kích hoạt lộ trình tín hiệu NF- κ B và AP-1, cuối cùng được dịch mã tạo thành phosphatase kiềm tiết ra bởi tế bào phôi (SEAP). Tín hiệu SEAP được định lượng bằng bộ kit QUANTI-Blue ở bước sóng 620-655 nm.

Là một trong các đích tác động quan trọng của IL-33, tế bào mast có thể được sử dụng cho thử nghiệm ức chế hiệu lực của cytokin này. Kim và cộng sự (2021) đã đánh giá hoạt tính của các phân tử nhỏ trên dòng tế bào mast của người (Human mast cell-1 – HMC-1).²¹ HMC-1 được cảm ứng bởi IL-33 và sản xuất ra IL-6. Nguyên tắc của thử nghiệm là nếu chất ức chế có tác động ức chế IL-33 thì sẽ làm giảm nồng độ IL-6 sản xuất bởi tế bào mast. Nồng độ của IL-6 được định lượng bằng kit ELISA. Từ đó, hợp chất **7c** được xác định là chất ức chế tốt nhất hiệu lực của IL-33, với khả năng ức chế 97,2% hoạt tính sản xuất IL-6 của HMC-1 ở nồng độ $\sim 0,3 \mu\text{M}$.²¹ Tương tự, Park và cộng sự (2020) cũng đã sử dụng dòng tế bào HMC-1 để đánh giá tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 của một số kháng thể. Nguyên tắc của thử nghiệm là IL-33 gắn kết trên thụ thể ST2 làm kích hoạt con đường tín hiệu MAPK và NF- κ B. Nếu kháng thể có tác động ức chế sự tương tác IL-33/ST2 thì mức độ MAPK và NF- κ B sẽ giảm.¹⁵³ Ngoài tế bào HMC-1, tế bào mast có nguồn gốc từ tủy xương (bone marrow-derived mast cells – BMMC) hoặc từ da của thai nhi (fetal skin-derived mast cells – FSMC) cũng có thể được sử dụng để đánh giá hiệu lực ức chế IL-33/ST2.^{154,155}

1.4. Tình hình nghiên cứu chất ức chế IL-33 và ST2

1.4.1. Các nghiên cứu trên thể giới

1.4.1.1. Các nghiên cứu về tác nhân sinh học ức chế IL-33/ST2

Một số tác nhân sinh học có tác dụng ức chế hoạt tính IL-33/ST2 đã được nghiên cứu và phát triển đến giai đoạn thử nghiệm lâm sàng. Các tác nhân này bao gồm 2 nhóm chính: kháng thể đơn dòng và các protein ức chế.

Kháng thể đơn dòng trung hòa IL-33/ST2

Kháng thể kháng IL-33 có tác dụng ức chế viêm đường hô hấp trên mô hình chuột mắc bệnh hen suyễn dị ứng được báo cáo đầu tiên bởi Liu và cộng sự (2009).¹⁵⁶ Sau đó, Kim và cộng sự (2012) báo cáo một kháng thể kháng IL-33 có tác dụng giảm viêm mũi dị ứng trên mô hình chuột.¹⁵⁷ Gần đây, Okragly và cộng sự (2021) giới thiệu kháng thể torudokimab có khả năng gắn kết đặc hiệu với IL-33, có ái lực mạnh

hơn so với ST2 và không tương tác với bất kỳ thành viên nào khác của họ IL-1.¹⁵ Trong khi đó, kháng thể itepekimab được phát triển bởi Regeneron Pharmaceuticals và Sanofi đã được thử nghiệm lâm sàng pha IIa ở bệnh nhân COPD từ trung bình đến nặng. Kết quả cho thấy itepekimab làm giảm tỉ lệ bùng phát đợt cấp và cải thiện chức năng phổi ở bệnh nhân từng hút thuốc mắc COPD.¹⁶ Một kháng thể đơn dòng khác là tozorakimab được phát triển bởi AstraZeneca và đang ở giai đoạn thử nghiệm lâm sàng pha III cho COPD. Tozorakimab gắn kết với IL-33 mạnh hơn so với thụ thể ST2 và có khả năng ức chế mạnh các phản ứng viêm phụ thuộc ST2 do IL-33 cảm ứng trong các tế bào của người và trên mô hình tổn thương biểu mô phổi ở chuột.¹⁷ Một kháng thể đơn dòng kháng IL-33 khác có tên etokimab cũng đang được phát triển bởi hãng AnaptysBio và thử nghiệm lâm sàng pha IIa ở bệnh nhân viêm da cơ địa.¹⁵⁸

Đối với ST2, Nnane và cộng sự (2019) đã báo cáo đầu tiên kháng thể CNTO7160 có tác dụng trung hòa thụ thể này và ứng dụng trong điều trị hen suyễn cũng như viêm da cơ địa.¹⁵⁹ CNTO7160 tiếp tục được phát triển bởi GlaxoSmithKline với tên gọi melrilimab. Kết quả thử nghiệm lâm sàng pha I cho thấy kháng thể dung nạp tốt và tác dụng phụ ở mức độ nhẹ.¹⁹ Ở pha II, melrilimab thể hiện tác động giảm nồng độ sST2 tự do ở nhóm bệnh nhân thử nghiệm.¹⁶⁰ Bên cạnh đó, kháng thể đơn dòng astegolimab kháng ST2 được nghiên cứu và phát triển bởi Genetech cũng đã được thử nghiệm lâm sàng pha IIb. Astegolimab đã thể hiện tính an toàn và dung nạp tốt, giúp làm giảm tỉ lệ trầm trọng của bệnh hen suyễn ở nhiều bệnh nhân, bao gồm cả nhóm có bạch cầu ưa acid thấp, bị hen nặng và không được kiểm soát đầy đủ.¹⁶¹

Protein ức chế IL-33/ST2

Murphy và cộng sự (2014) đăng ký bằng sáng chế WO2014/152195A1 để bảo hộ cho một loạt các hỗn hợp protein có tác dụng đối vận IL-33. Đây là hỗn hợp của các protein tái tổ hợp như thụ thể sST2 và đồng thụ thể IL1-RAcP. Bằng phương pháp khảo sát ái lực gắn kết dựa trên phổ SPR, hằng số gắn kết của hỗn hợp protein đối vận này với IL-33 được xác định ở khoảng picomol. Chế phẩm đối vận tốt nhất sau đó được xác định bằng phương pháp ELISA và thử nghiệm dựa trên dòng tế bào biểu hiện thụ thể ST2, cho nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) lần lượt là 7,0 và 1,5 pM.¹⁴⁵ Năm 2017, một loại protein có tên HpARI tiết ra bởi loài giun *Heligmosomoides polygyrus* ở chuột có khả năng ức chế hoạt tính IL-33 được phát hiện bởi Osbourn và cộng sự. Protein này ức chế tác động của IL-33 trên tế bào ILC2 bằng hai cách: gắn kết trực tiếp với IL-33 để ngăn cản tương tác IL-33/ST2 và ức chế sự hoạt hóa của IL-33. Kết quả phân tích SPR cho thấy HpARI gắn kết với IL-33 của người với K_D = 260 nM.¹⁴⁴

1.4.1.2. Các nghiên cứu về phân tử nhỏ ức chế IL-33/ST2

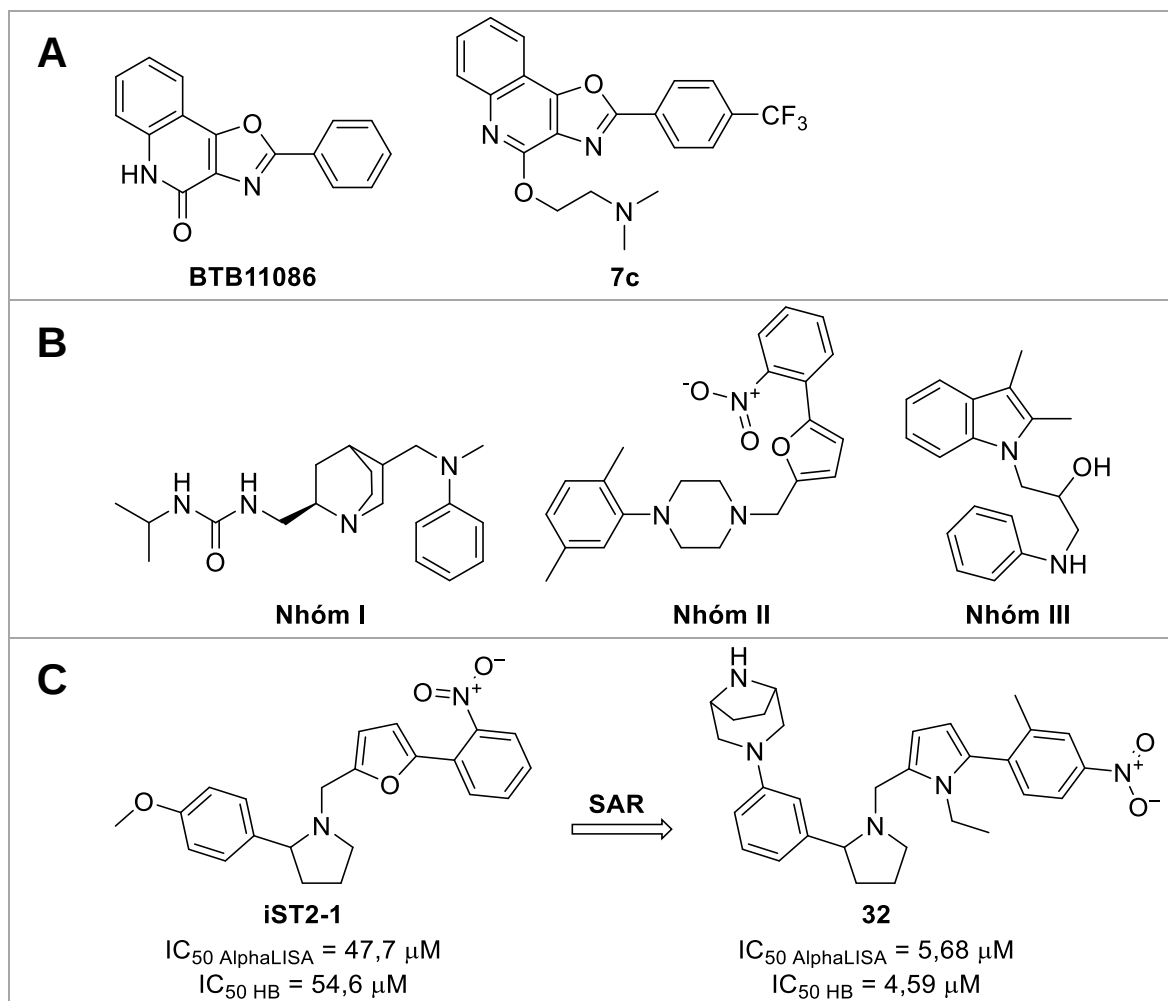
Phân tử nhỏ ức chế IL-33

Hiện nay, các nghiên cứu về phân tử nhỏ ức chế IL-33/ST2 còn hạn chế. Funakoshi-Tago và cộng sự (2015) đã báo cáo đầu tiên về các phân tử nhỏ ức chế con đường tín hiệu của IL-33. Đó là các hợp chất tự nhiên có cấu trúc liên quan flavonoid trong keo ong Nepal, bao gồm 3',4'-dihydroxy-4-methoxydalbergion, 4-methoxydalbergion, cearoin và chrysin có tác động ức chế sự cảm ứng của IL-33 đối với sự biểu hiện của IL-6, TNF- α và IL-13 ở tế bào BMMC. Các hợp chất này cũng ức chế sự kích hoạt NF- κ B gây ra bởi IL-33, từ đó góp phần giải thích cho tác dụng kháng viêm của keo ong.¹⁵⁴

Kim và cộng sự (2016) đã sàng lọc phân tử nhỏ BTB11086 từ thư viện hóa học Maybridge có khả năng gắn kết với IL-33. Bằng phương pháp phổ NMR, BTB11086 (**Hình 1.11A**) được chứng minh là gắn kết với các acid amin tại vị trí tương tác thứ hai của IL-33 với thụ thể ST2.²⁰ Trong một nghiên cứu nối tiếp, Kim và cộng sự (2021) đã tối ưu hóa cấu trúc của BTB11086 bằng cách thay đổi trên khung oxazolo[4,5-c]quinolinon. Trong các dẫn chất được tổng hợp, hợp chất **7c** cho tác động tốt nhất thể hiện qua thử nghiệm gắn kết xác định bằng phương pháp phổ NMR và thử nghiệm *in vitro* trên dòng tế bào mast sản xuất IL-6. Hợp chất này có thể ức chế 97,2% hoạt tính sản xuất IL-6 của tế bào ở nồng độ $\sim 0,3 \mu\text{M}$.²¹ Le và cộng sự (2023) báo cáo một số saponin triterpenoid từ rễ cây *Astragalus membranaceus* có tác động ức chế tín hiệu IL-33. Trong số 8 hợp chất được phân lập, **1**, **5** và **6** ức chế lần lượt 37, 68 và 54% hoạt tính IL-33 trong thử nghiệm ELISA ở nồng độ $100 \mu\text{M}$.²⁶

Phân tử nhỏ ức chế ST2

Yang và Paczesny (2016) đã đăng ký bằng sáng chế WO2017/083242A1, liệt kê hơn 60 hợp chất phân tử nhỏ có tác động ức chế sự gắn kết của IL-33 và ST2 xác định bằng phương pháp AlphaLISA và thử nghiệm dựa trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33.¹⁵⁰ Các chất này được chia thành 3 nhóm cấu trúc chính như **Hình 1.11B**. Sau đó, nhóm nghiên cứu của Yang tập trung phát triển các dẫn chất thuộc nhóm cấu trúc II. Hợp chất đại diện là iST2-1 (**Hình 1.11C**), có tác động ức chế sự gắn kết giữa IL-33 và ST2 qua thử nghiệm AlphaLISA với $\text{IC}_{50} = 47,7 \mu\text{M}$ và tác động ức chế IL-33 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33 với $\text{IC}_{50} = 56,24 \mu\text{M}$. Đồng thời, iST2-1 cũng thể hiện hiệu quả trên mô hình chuột được gây bệnh GVHD.²² Dựa trên phân tích SAR, Yuan và cộng sự (2023) tiếp tục tối ưu hóa cấu trúc và thu được các dẫn chất ức chế ST2 mạnh hơn, dẫn đầu là hợp chất **32** ở **Hình 1.11C**.^{23,162}



Hình 1.11. Một số phân tử nhỏ có khả năng gắn kết và ức chế IL-33/ST2

(A) BTB11086 là chất gắn kết với IL-33 được phát hiện bởi sự thay đổi độ dịch chuyển hóa học trên phổ NMR và được phát triển thành hợp chất **7c** có tác dụng ức chế tác dụng IL-33 trên tế bào mast tiết IL-6. (B) Một số hợp chất ức chế ST2, với 3 khung cấu trúc chính. (C) Hợp chất iST2-1 thuộc nhóm II được phát triển lần lượt thành hợp chất **32** có tác động mạnh hơn trong thử nghiệm AlphaLISA và trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33.

1.4.1.3. Các nghiên cứu *in silico* sàng lọc chất ức chế IL-33/ST2

Trên IL-33, Kim và cộng sự (2016) đã sử dụng mô phỏng gắn kết phân tử để sàng lọc qua thư viện mảnh cấu trúc Maybridge. Mô hình gắn kết được xây dựng dựa trên vị trí 2 của bề mặt tương tác giữa IL-33 và ST2. Quá trình sàng lọc được thực hiện với phần mềm AutoDock Vina và 30 hợp chất tốt nhất được thực hiện thử nghiệm gắn kết bằng phổ NMR. Từ đó, BTB11086 được xác định là hợp chất có khả năng gắn kết với IL-33 thể hiện qua sự thay đổi độ dịch chuyển hóa học trên phổ HSQC. Sau đó, phần mềm Surflex-Dock đã được sử dụng để mô phỏng gắn kết linh động nhằm giải thích cơ chế gắn kết của BTB11086.²⁰ Từ hợp chất này, Kim và cộng sự (2021) đã tổng hợp các dẫn chất và xác định khả năng gắn kết với IL-33 bằng phổ NMR. Giá trị CSP của Glu121 trên IL-33 đã được sử dụng như điểm cuối để xây

dựng mô hình 3D-QSAR. Cũng tại vị trí gắn kết kể trên của IL-33, Adamu và cộng sự (2021) đã sử dụng mô phỏng gắn kết và động lực học phân tử để sàng lọc các hợp chất dị vòng từ Universal Natural Product Database. Qua đó, UNPD36 được đề xuất là hợp chất gắn kết tiềm năng trên IL-33.²⁵ Tương tự, Le và cộng sự (2023) đã sử dụng mô phỏng gắn kết và động lực học phân tử để giải thích tác động ức chế IL-33 của các saponin triterpenoid từ rễ của *Astragalus membranaceus*.²⁶

Trên ST2, Yang và cộng sự (2016) đã sử dụng mô phỏng MD để lấy mẫu cấu dạng của protein và từ đó xác định các vị trí gắn kết tiềm năng trên thụ thể này.¹⁶³ Trong một nghiên cứu khác, Yang (2020) đã sử dụng kết hợp mô phỏng MD thông thường và MD được tăng tốc để so sánh cấu dạng giữa sST2 và ST2L, làm nền tảng cho các thiết kế chất ức chế chọn lọc trên mỗi đồng dạng của thụ thể.¹⁶⁴ Ramadan và cộng sự (2018) đã sử dụng 4 hợp chất có hoạt tính thu được từ quá trình sàng lọc thông lượng cao để xây dựng mô hình pharmacophore chứa 4 điểm đặc tính. Mô hình đã được sử dụng để sàng lọc qua thư viện hóa học thương mại. Các hợp chất thỏa mãn mô hình pharmacophore được mô phỏng gắn kết vào vị trí 1 của ST2. Sau đó, các hợp chất tiềm năng được lựa chọn để thử nghiệm *in vitro* và một số chất có hoạt tính đã được báo cáo.²² Qua thử nghiệm HTRF, Yuan và cộng sự (2022) quan sát thấy acid salicylic, benzamidin và niacin thể hiện hoạt tính ức chế PPI IL-33/ST2 với IC₅₀ lần lượt là 1,77; 8 và 11 mM. Một số dẫn chất acid salicylic tiếp tục được đánh giá và cho hoạt tính tương tự. Từ đó, các tác giả đã ứng dụng phương pháp ánh xạ dựa trên mô phỏng MD đồng dung môi và phát hiện các mảnh cấu trúc nhỏ này có tiềm năng gắn kết với ST2 tại vị trí 1 trong PPI với IL-33.¹⁵²

1.4.2. Các nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về chất ức chế IL-33/ST2 vẫn còn khiêm tốn. Nguyễn Thị Thanh Thảo và cộng sự (2015) đã tái tổ hợp thành công thụ thể sST2 của chuột dung hợp với miền hằng định của globulin miễn dịch gamma-1 (mIL33R-Fc) bằng cách biểu hiện trên chủng nấm men *Pichia pastoris*. Kết quả thử nghiệm trên tế bào HEK-293 cho thấy mIL33R-Fc ức chế cạnh tranh sự tương tác của mIL-33 với thụ thể ST2. Đồng thời, protein này còn ức chế sự sản xuất IL-2 ở dòng tế bào u lympho trên chuột.¹⁶⁵

Trong lĩnh vực CADD, nhóm của chúng tôi (2016) đã có nghiên cứu ban đầu trên IL-33 và ST2. Tuy nhiên, các nghiên cứu chỉ dừng lại ở sàng lọc *in silico* một cách giới hạn trên những cơ sở dữ liệu nhỏ như Ngân hàng thuốc hay Cơ sở dữ liệu các hợp chất từ bài thuốc cổ truyền Trung Hoa. Mô phỏng MD được thực hiện để đánh giá độ ổn định của protein với phối tử còn rất ngắn (1,2 ns) và chưa có thử nghiệm *in vitro* nào được thực hiện để xác nhận hoạt tính của các chất được sàng lọc.

1.4.3. Khoảng trống trong nghiên cứu thuốc phân tử nhỏ chất ức chế IL-33/ST2

Các thử nghiệm trên mô hình chuột loại bỏ gen và thử nghiệm lâm sàng về vai trò của IL-33 và ST2 trong các bệnh viêm và tự miễn đã góp phần xác thực IL-33 và ST2 là những mục tiêu phù hợp cho phát triển thuốc mới. Các dự án khám phá thuốc mới của các công ty dược phẩm theo cơ chế ức chế IL-33/ST2 càng khẳng định tiềm năng làm thuốc của cặp protein này.

Tổng quan tài liệu về chất ức chế IL-33 và ST2 cho thấy một số khoảng trống nghiên cứu. Trước hết, hướng nghiên cứu sử dụng các công cụ CADD trên IL-33/ST2 dù đã được áp dụng nhưng vẫn còn hạn chế. Các acid amin điểm nóng được xác định bằng thực nghiệm trên bề mặt PPI của hai protein vẫn chưa được ứng dụng trong bất kỳ nghiên cứu mô hình hóa *in silico* nào. Đối với hướng thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc mục tiêu (structure-based drug design – SBDD), xác thực vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ trên bề mặt protein là một bước có ý nghĩa quan trọng. Trên IL-33 và ST2, chưa có nghiên cứu nào khảo sát một cách có hệ thống những vị trí gắn kết như vậy. Bên cạnh đó, các nghiên cứu *in silico* gần đây vẫn chưa giải quyết được tính linh động của các protein.

Đối với nghiên cứu thực nghiệm, số lượng chất ức chế IL-33 vẫn còn hạn chế. Tác động của các chất ức chế đã biết trên IL-33 như hợp chất **7c** vẫn còn ở mức trung bình. Với điểm bắt đầu là **7c**, các nghiên cứu dựa trên phối tử có thể được thực hiện để tìm kiếm các hợp chất tương đồng và gia tăng cơ hội tìm kiếm những chất ức chế mạnh hơn trên IL-33. Trên thụ thể ST2, một số chất ức chế tiềm năng đã được công bố nhưng chưa có nghiên cứu nào thiết lập mối liên quan định lượng giữa cấu trúc và tác động của chúng. Mặc dù còn khiêm tốn, dữ liệu hiện tại về chất ức chế ST2 vẫn có thể là chất liệu quan trọng cho các nghiên cứu thiết kế thuốc dựa trên phối tử. Các mô hình máy tính có thể góp phần làm giàu hoặc tối ưu hóa các chất ức chế hiện tại để tạo ra các chất khởi nguồn mới cho IL-33/ST2.

1.4.4. Những thuận lợi và thách thức trong nghiên cứu chất ức chế IL-33/ST2

Việc tìm kiếm chất ức chế IL-33/ST2 có một số tiền đề thuận lợi. Trước hết, cấu trúc không gian ba chiều của IL-33 và ST2 ở người đã được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tinh thể tia X (PDB: 4KC3, độ phân giải 3,27 Å) và phổ NMR (PDB: 2KLL).^{46,47} Trong cấu trúc thực nghiệm của phức hợp IL-33/ST2, sự tương tác giữa hai protein đã được làm sáng tỏ và một số acid amin đóng vai trò quan trọng cho PPI cũng được xác định bằng phương pháp gây đột biến.⁴⁷ Bên cạnh đó, một số hợp chất cấu trúc phân tử nhỏ có khả năng gắn kết hoặc ức chế IL-33 và ST2 đã được báo

cáo.^{20,22-24,26,154,166} Đây là những dữ liệu có thể được sử dụng để thực hiện các nghiên cứu tìm kiếm chất ức chế IL-33/ST2 dựa trên cả cấu trúc mục tiêu và phối tử.

Tuy nhiên, thiết kế phân tử nhỏ ức chế IL-33/ST2 cũng gặp phải những thách thức tương tự như các trường hợp PPI khác. Cả hai đều là các protein có tính linh động cao, tương tác với nhau trên những bề mặt nông, rộng và tích điện.⁴⁷ Những đặc điểm này đặt ra các thử thách lớn cho khả năng tìm ra chất ức chế phân tử nhỏ sao cho vừa có tính chất phù hợp để làm thuốc hóa được lại vừa có ái lực cao với protein. Bên cạnh đó, phân tử nhỏ ức chế IL-33 và ST2 còn hạn chế về số lượng, sự đa dạng cấu trúc và sự phân hóa giá trị hoạt tính ức chế. Quan trọng hơn cả, chưa có vị trí gắn kết nào của phối tử phân tử nhỏ xác định bằng phương pháp tinh thể học tia X được báo cáo trên IL-33 và ST2 (theo tra cứu tại cơ sở dữ liệu PDBe-KB,¹⁶⁷ tính đến ngày 01/06/2024). Việc không có sẵn những túi gắn kết như vậy dẫn đến khó khăn trong việc xây dựng các mô hình sàng lọc *in silico* dựa trên cấu trúc mục tiêu.

Về vai trò sinh học, vấn đề cần lưu ý là trục IL-33/ST2 thể hiện tác động đa hướng trên các cơ quan khác nhau, thậm chí đối lập nhau trên cùng một hệ cơ quan.¹⁰⁷ Các nghiên cứu cho thấy việc ức chế tín hiệu xuôi dòng của con đường này là mục tiêu phù hợp cho các bệnh viêm, dị ứng và tự miễn theo cơ chế gắn kết với IL-33 hoặc ST2L để bất hoạt PPI IL-33/ST2L. Theo hướng này, các công ty dược phẩm đã phát triển các kháng thể đơn dòng đến giai đoạn thử nghiệm lâm sàng pha II–III. Với bệnh lý tim mạch, các thử nghiệm *in vivo* ủng hộ hướng ức chế sST2 để ngăn cản dạng thụ thể hòa tan này gắn kết và làm mất tác dụng bảo vệ của IL-33 khi tương tác với ST2L. Tuy nhiên, các nghiên cứu trên người cần được thực hiện để đánh giá tác động toàn diện của IL-33 và sST2 nhằm xác định thời điểm can thiệp phù hợp. Ngoài hệ tim mạch, IL-33 còn tham gia điều hòa các chức năng bảo vệ mô trong pha phục hồi sau các tổn thương của hệ thần kinh trung ương và tiêu hóa. Vì vậy, tính đặc hiệu cần được chú ý để tránh các tác dụng không mong muốn của việc ức chế IL-33.¹⁶⁸

Về thực nghiệm, các bộ kit thử nghiệm hoạt tính ức chế PPI của IL-33/ST2 vẫn chưa được thương mại hóa. Do đó, việc thực hiện quy trình thử nghiệm đánh giá tác động ức chế con đường tín hiệu của cytokin này là một thách thức lớn trong điều kiện tại Việt Nam.

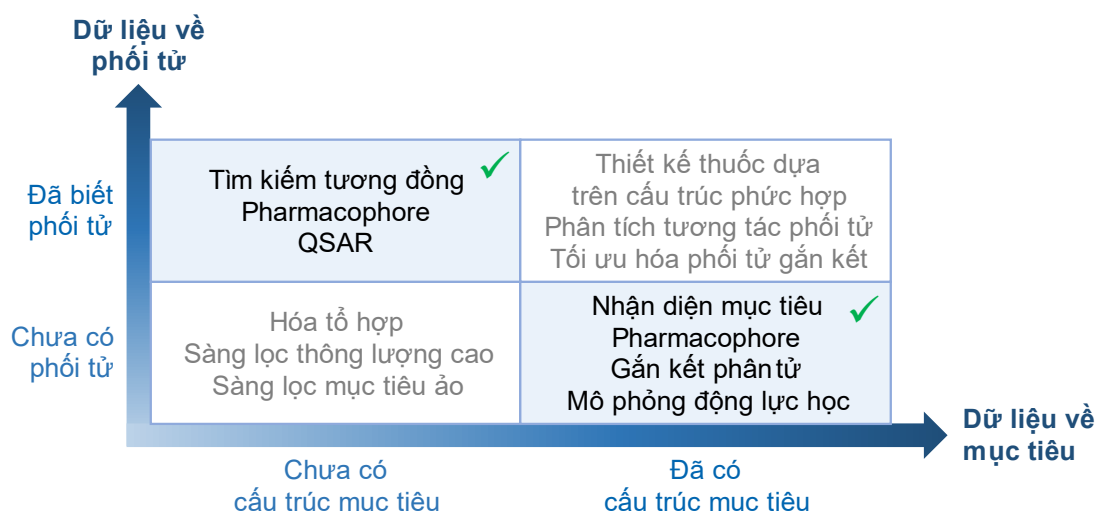
Mặc dù không có nhiều thuận lợi khi tiếp cận một mục tiêu mới như IL-33/ST2, những trở ngại nêu trên đồng thời cũng là cơ hội cho đề tài giải quyết. Với sự phát triển của các phương pháp *in silico*, đặc biệt là các kỹ thuật mô phỏng hệ thống sinh học, quá trình tìm kiếm chất ức chế IL-33/ST2 có thể được thực hiện một cách hiệu quả và tiết kiệm hơn.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Hiện nay, cấu trúc của mục tiêu tác động IL-33/ST2 đã được công bố và một số hợp chất phân tử nhỏ có tác động ức chế tương tác giữa hai protein này cũng đã được báo cáo. Dựa trên các dữ liệu hiện có, đề tài tiếp cận phương pháp sàng lọc *in silico* chất ức chế IL-33/ST2 như minh họa ở **Hình 2.1**. Cụ thể, hai hướng thiết kế thuốc chính được sử dụng:

- Thiết kế dựa vào cấu trúc mục tiêu, trước hết bằng việc nhận diện mục tiêu (gồm khảo sát tương tác protein-protein và xác định vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ), sau đó là xây dựng các mô hình pharmacophore, thiết lập quy trình mô phỏng gắn kết và động lực học phân tử.
- Thiết kế thuốc dựa trên phối tử, bằng cách xây dựng truy vấn tương đồng hình dạng phân tử 3 chiều, mô hình pharmacophore và mô hình mối liên quan định lượng giữa cấu trúc – tác động (QSAR).



Hình 2.1. Hướng tiếp cận sàng lọc *in silico* chất ức chế tương tác IL-33/ST2

Các mô hình *in silico* sau đó được ứng dụng để sàng lọc ảo qua các cơ sở dữ liệu hóa học và các hợp chất tiềm năng sẽ được lựa chọn để đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2 *in vitro*.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1. Cấu trúc không gian 3 chiều của IL-33 và thụ thể ST2

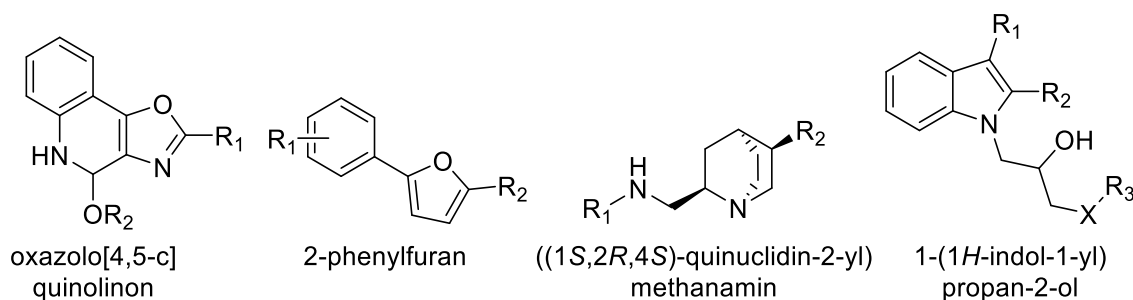
Hiện nay, có 3 cấu trúc protein liên quan đến IL-33 và thụ thể ST2 được lưu trữ tại Ngân hàng Dữ liệu Protein RCSB,¹⁶⁹ bao gồm: (i) cấu trúc của IL-33 ở người trong dung dịch được xác định bằng phương pháp phổ NMR (PDB: 2KLL), (ii) cấu trúc

của phức hợp IL-33/ST2 ở người được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tinh thể tia X (PDB: 4KC3), và (iii) cấu trúc của phức hợp IL-33/ST2/IL-1RAcP ở chuột được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tinh thể tia X (PDB: 5VI4).^{46,47,170} Để xây dựng các mô hình sàng lọc *in silico* dựa trên cấu trúc mục tiêu, nghiên cứu này sử dụng cấu trúc tinh thể của IL-33 và ST2 trong phức hợp PDB 4KC3. Phức hợp này có độ phân giải 3,27 Å, chứa cấu trúc của hai protein có nguồn gốc từ người (với mã định danh UniProt lần lượt là O95760 và Q01638) và không có đột biến. Đồng thời, cấu trúc PDB 2KLL của IL-33 trong dung dịch cũng được sử dụng cho mục đích so sánh. Thông tin chi tiết về các cấu trúc này được bổ sung ở **PHỤ LỤC 1**. Bên cạnh đó, cấu trúc tinh thể của các thành viên khác thuộc họ IL-1 ở người cũng được sử dụng cho các nghiên cứu so sánh, bao gồm IL-1 β (PDB: 1ITB, 3O4O, 4DEP, 5R8A, 5R8B, 5R8C, 5R8D, 5R8E, 5R8F, 5R8G, 5R8H, 5R8I, 5R8J, 5R8K, 5R8L, 5R8M, 5R8O, 5R8P, 5R8Q, 5R85, 5R86, 6Y8I, 6Y8M, 8C3U) và IL-36 γ (PDB: 4IZE, 6P9E).

2.2.2. Các phối tử phân tử nhỏ đã được báo cáo khả năng gắn kết và có tác động ức chế IL-33/ST2

Để xây dựng các mô hình *in silico* dựa trên phối tử và xác định các vị trí gắn kết trên IL-33 và ST2, đề tài sử dụng:

- Các chất gắn kết trên IL-33 với khung cấu trúc oxazolo[4,5-*c*]quinolinon (**Hình 2.2**) được báo cáo bởi Kim và cộng sự (2016, 2021).^{20,21}
- Các chất ức chế thụ thể ST2 với ba khung cấu trúc chính là 2-phenylfuran, ((1*S*,2*R*,4*S*)-quinuclidin-2-yl)methanamin và 1-(1*H*-indol-1-yl)propan-2-ol (**Hình 2.2**) được báo cáo bởi Ramadan và cộng sự (2018), Yuan và cộng sự (2022, 2023).²²⁻²⁴



Hình 2.2. Khung cấu trúc của các hợp chất đã được báo cáo có tác động ức chế IL-33/ST2 được sử dụng cho xây dựng mô hình *in silico* dựa trên phối tử

Thông tin chi tiết về cấu trúc hóa học, tên gọi và giá trị hoạt tính thể hiện khả năng gắn kết hoặc tác động ức chế IL-33/ST2 của các hợp chất kể trên được trình bày lần lượt tại **Bảng PL2.1** và **Bảng PL2.2** của **PHỤ LỤC 2**.

2.2.3. Cơ sở dữ liệu hóa học cho sàng lọc ảo

2.2.3.1. Cơ sở dữ liệu hóa học tích hợp trong các công cụ sàng lọc trực tuyến

Để sàng lọc ảo, các thư viện hóa học chứa các hợp chất được thương mại hóa được sử dụng, bao gồm ZINC, ChemDiv, Enamine, Thư viện hợp chất Mở của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI). Những cơ sở dữ liệu này có thể được sàng lọc nhanh chóng nhờ được tích hợp sẵn trong các công cụ trực tuyến như ZINCPharmer và PharmIT.^{171,172} Cụ thể, cơ sở dữ liệu ZINC Purchasable tại máy chủ ZINCPharmer chứa hơn 20 triệu hợp chất với hơn 200 triệu cấu dạng. Đối với máy chủ PharmIT, các thư viện được sử dụng gồm ZINC (13.127.550 hợp chất), ChemDiv (1.456.120 hợp chất), Enamine (4.117.328 hợp chất) và NCI Open Chemical Repository (52.237 hợp chất).

2.2.3.2. Cơ sở dữ liệu hóa học tự xây dựng nhằm định hướng cho nghiên cứu chất ức chế PPI

Các công cụ trực tuyến ZINCPharmer và PharmIT chứa các thư viện hóa học cho mục đích sàng lọc tổng quát, thiếu tính cập nhật và không chấp nhận các mô hình pharmacophore có các quy tắc ràng buộc được xây dựng bởi các phần mềm thiết kế thuốc thông dụng. Để khắc phục những tồn tại đó, đề tài tự xây dựng một bộ cơ sở dữ liệu chứa các thư viện được chọn lọc cho định hướng nghiên cứu chất ức chế PPI. Cơ sở dữ liệu này có thể được vận hành trên máy tính cục bộ, có thể cập nhật dễ dàng và tương thích với các phần mềm thiết kế thuốc thông dụng. Các thư viện hóa học được sử dụng để xây dựng cơ sở dữ liệu này được liệt kê tại **Bảng 2.1**.

Bảng 2.1. Các cơ sở dữ liệu hóa học định hướng PPI được sử dụng cho quá trình sàng lọc ảo tìm kiếm chất ức chế IL-33/ST2

Thư viện	Thư viện con	Số lượng (chất)
Enamine	Enamine Advanced Collection	751.195
	Enamine Hit Locator Library	460.160
	Enamine Discovery Diversity Set	50.240
	Enamine PPI Library	40.640
	Enamine Protein Mimetics Library	8.960
	Enamine PPI Fragment Library	8.374
	Enamine PPI PDZ Library	1.920
ChemDiv	PPI 2.0 Library	211.413
	PPI Helix Turn 3D Mimetics Library	68.388
	3D-Pharmacophore Diversity Library	47.490
	Peptidomimetics Library	36.711
	PPI Inhibitors Tripeptide Mimetics Library	23.722
	PPI Recognition Elements Library	23.943

Thư viện	Thư viện con	Số lượng (chất)
	Nonpeptide Peptidomimetics PPI Library	18.417
	PDZ PPI Library	3.055
	Peptidomimetic β -turn Motif Library	1.810
	3D Mimetics PPI Library	1.503
	Analogues of Approved Drugs Library	1.403
Asinex	All Screening compounds	575.302
	PPI Library	14.557
National Cancer Institute (NCI) Open Database Compounds		265.242

2.2.3.3. Ngân hàng thuốc và thư viện hợp chất nội bộ

Cơ sở dữ liệu Ngân hàng thuốc (DrugBank Database)¹⁷³ được sử dụng với mục tiêu tìm kiếm cơ hội tái định vị tác dụng điều trị của các thuốc đã được chấp thuận theo cơ chế ức chế IL-33/ST2. Bên cạnh đó, một thư viện hợp chất nội bộ được thu thập tại Bộ môn Hóa Dược, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh chứa 825 hợp chất cũng được đưa vào quá trình sàng lọc ảo.

2.2.4. Phần mềm và máy tính sử dụng cho nghiên cứu *in silico*

Các phần mềm thiết kế thuốc được sử dụng trong nghiên cứu cùng thông tin về nhà phát triển, tình trạng bản quyền và mục đích sử dụng được trình bày tại **Bảng PL3.1, PHỤ LỤC 3**. Các phần mềm được chạy trên các máy tính cục bộ nền tảng Linux và Windows hoặc các máy ảo trên nền tảng Google Colab với cấu hình được trình bày tại **Bảng PL3.2, PHỤ LỤC 3**.

2.2.5. Hóa chất và thiết bị sử dụng cho nghiên cứu *in vitro*

Protein IL-33 được tổng hợp bằng phương pháp tái tổ hợp. Dòng tế bào HEK-Blue IL-33 biểu hiện thụ thể ST2 xuyên màng được cung cấp bởi công ty InvivoGen (San Diego, Hoa Kỳ). Các hóa chất và thiết bị liên quan đến thử nghiệm đánh giá tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33 và thử nghiệm đánh giá kết sử dụng quang phổ huỳnh quang được liệt kê chi tiết tại **Bảng PL4.1** và **Bảng PL4.2** tại **PHỤ LỤC 4**.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đề tài được thực hiện từ tháng 2 năm 2020 đến tháng 2 năm 2024. Các nghiên cứu *in silico* được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Dược Tin học, Bộ môn Hóa Dược, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. IL-33 được tổng hợp tại Bộ môn Hóa Sinh, Khoa Dược và Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Trung tâm Khoa học – Công nghệ Dược Sài Gòn, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

Thử nghiệm hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33 được thực hiện tại Phòng Công nghệ sinh học Y Dược, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Thử nghiệm đánh giá sự gắn kết của hợp chất phân tử nhỏ với IL-33 bằng quang phổ huỳnh quang được thực hiện tại Bộ môn Hóa phân tích – Kiểm nghiệm, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

2.4. Phương pháp và công cụ đo lường, thu thập số liệu

2.4.1. Phương pháp xây dựng cơ sở dữ liệu cho sàng lọc ảo chất ức chế PPI

Các cơ sở dữ liệu hóa học tại **Bảng 2.1** được tải về từ trang chủ của mỗi thư viện dưới định dạng tệp SDF. Phần mềm MOE 2022.02 được sử dụng để xử lý các tệp cơ sở dữ liệu, bao gồm việc làm sạch cấu trúc, thêm hydro và proton hóa ở pH sinh lý với công cụ Wash.¹⁷⁴ Các hợp chất trong thư viện được gán điện tích từng phần với chức năng Partial Charges và tối thiểu hóa năng lượng bằng công cụ Energy Minimize với RMS Gradient 0,0001 kcal/mol/Å². Tất cả các quá trình này được thực hiện dưới trường lực Amber10:EHT dành cho phân tử nhỏ, với điện tích từng phần được tính toán theo mô hình AM1-BCC.¹⁷⁵ Sau đó, tập hợp cấu dạng 3D của các chất được tìm kiếm bằng công cụ Conformation Import, với các thông số được cài đặt gồm tối đa 10.000 cấu dạng được tìm kiếm, 1000 bước tìm kiếm ngẫu nhiên và 1000 bước tối thiểu hóa năng lượng với mức Gradient kiểm tra là 0,0001 kcal/mol/Å².

Đối với các mô hình sử dụng bộ ứng dụng OpenEye, thư viện sàng lọc cũng được chuẩn bị theo cùng nguyên tắc nói trên. Cụ thể, các hợp chất được proton hóa ở pH 7,4 với mô-đun FixpKa và gán điện tích từng phần theo mô hình AM1-BCC với mô-đun MolCharge trong chương trình QUACPAC 2.2.2.0.¹⁷⁶ Sau đó, công cụ OMEGA 4.2.2.0 được sử dụng để tạo tập hợp cấu dạng 3D năng lượng thấp.¹⁷⁷

2.4.2. Phương pháp khảo sát PPI của IL-33/ST2 và xác định các vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ

2.4.2.1. Tinh chỉnh và đánh giá chất lượng cấu trúc tinh thể của IL-33 và ST2

Cấu trúc tinh thể của phức hợp IL-33/ST2 sau khi tải về Ngân hàng Dữ liệu Protein (PDB: 4KC3)⁴⁷ được chuẩn bị bằng công cụ QuickPrep của phần mềm MOE. Quá trình này bao gồm các giai đoạn chuẩn hóa các acid amin của protein, loại bỏ các phân tử N-acetyl-D-glucosamin (xuất hiện do quá trình hậu dịch mã), bổ sung các acid amin còn thiếu, thêm các nguyên tử hydro, gán điện tích từng phần, proton hóa ở pH sinh lý và tối thiểu hóa năng lượng. Cấu trúc của protein trước và sau xử lý được đánh giá bằng các điểm số chất lượng mô hình tổng thể với công cụ ModFOLD.¹⁷⁸

Sau đó, cấu trúc toàn nguyên tử của protein được đánh giá chi tiết bằng công cụ MolProbity, phản ánh bởi các điểm số xung đột và biểu đồ Ramachandran.¹⁷⁹⁻¹⁸²

2.4.2.2. *Xác định các acid amin điểm nóng trong PPI của IL-33/ST2*

IL-33 và ST2 gắn kết với nhau tại hai vị trí riêng biệt, với bề mặt tương tác trên mỗi protein rộng gần 1800 Å². Liu và cộng sự đã xác định 13 acid amin của IL-33 tương tác với miền D1D2 của ST2 tại vị trí 1 và 8 acid amin của IL-33 tương tác với miền D3 của thụ thể tại vị trí 2 (**Bảng PL5.1, PHỤ LỤC 5**). Bằng phương pháp gây đột biến điểm các acid amin tại bề mặt tương tác và xác định độ giảm ái lực gắn kết với ST2, Liu và cộng sự đã xác định các acid amin “điểm nóng” của IL-33 tại mỗi vị trí (gồm Glu144, Glu148, Asp149 và Asp244 tại vị trí 1; Tyr163, Glu165 và Leu182 tại vị trí 2).⁴⁷ Hai vị trí gắn kết cùng các acid amin điểm nóng được khám phá là những cơ sở ban đầu của chiến lược thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc mục tiêu, cụ thể là dựa trên PPI. Tuy nhiên, các acid amin điểm nóng trên ST2 vẫn chưa được khảo sát, trong khi chỉ một số lượng hạn chế điểm nóng trên IL-33 được xác định. Do hiểu biết về các acid amin điểm nóng là cơ sở quan trọng đối với thiết kế thuốc theo phương pháp “bắt chước PPI”, các phương pháp tính toán dưới đây được sử dụng trong nghiên cứu này để khảo sát một cách toàn diện vai trò của các acid amin tại các bề mặt tương tác nhằm làm cơ sở cho quá trình thiết kế chất ức chế IL-33/ST2.

Phương pháp dựa trên cấu trúc “tĩnh” từ phức hợp tinh thể

Cấu trúc tinh thể của phức hợp PPI IL-33/ST2 được khảo sát bằng công cụ MOE Protein Contacts. Các phức hợp IL-33/ST2 trong cấu trúc tinh thể nguyên bản (PDB: 4KC3) và cấu trúc đã xử lý bằng phần mềm MOE được sử dụng để phân tích tương tác nhằm mục đích so sánh. Các loại tương tác được khảo sát bao gồm liên kết hydro, liên kết ion, tương tác kỵ nước với ngưỡng năng lượng cho các loại tương tác $\leq -0,5$ kcal/mol và độ dài liên kết $\leq 5,0$ Å. Công cụ PDBsum¹⁸³ cũng được sử dụng song song để khảo sát PPI của phức hợp PDB 4KC3.

Phương pháp dựa trên mô phỏng MD và phân tích dấu vân tay tương tác

Cấu trúc tinh thể PDB 4KC3 là một mô hình “tĩnh” chứa cấu dạng của IL-33 và ST2 ở trạng thái gắn kết với nhau. Nhằm khảo sát tính linh động của PPI giữa hai protein và xác định các acid amin điểm nóng, phức hợp IL-33/ST2 được mô phỏng MD 500 ns, gồm 5 quỹ đạo độc lập 100 ns. Quá trình mô phỏng MD được thực hiện bằng phần mềm Amber22¹⁸⁴ với trường lực Amber ff14SB.¹⁸⁵ Sử dụng mô-đun τ LEaP, protein được solvat hóa trong một hộp nước TIP3P bất diện sao cho khoảng cách từ biên của protein đến cạnh của hộp là 10 Å. Ion Na⁺ hoặc Cl⁻ được sử dụng để

trung hòa hệ và giữ nồng độ muối đạt 0,15 M. Các quá trình tối thiểu hóa năng lượng, cân bằng và mô phỏng được thực hiện theo quy trình tại **Bảng PL6.2, PHỤ LỤC 6**. Quỹ đạo mô phỏng MD được phân tích bằng chương trình `cpptraj` trong gói công cụ AmberTools23. Tần suất hình thành các loại tương tác giữa các acid amin tại bề mặt PPI được thống kê bằng chương trình MDAnalysis và ProLIF.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Phương pháp phân rã năng lượng tự do với công cụ *MMGBSA.py* được áp dụng cho quỹ đạo mô phỏng MD để xác định mức độ đóng góp của các acid amin. Các acid amin điểm nóng trong PPI IL-33/ST2 được xác định dựa trên tần suất tương tác và đóng góp năng lượng tự do của chúng.

Phương pháp dựa trên kỹ thuật quét đột biến alanin

Quét đột biến alanin (còn được gọi là “quét alanin”) là phương pháp tính toán thường được sử dụng để xác định các điểm nóng chịu trách nhiệm quan trọng cho hoạt tính của các đại phân tử sinh học. Phương pháp này đặc biệt hữu ích trong việc khảo sát các điểm nóng của PPI. Các chương trình sẽ gây đột biến điểm tại các acid amin trên bề mặt PPI thành alanin và tính toán độ chênh lệch năng lượng gắn kết giữa hai protein ở dạng tự nhiên và dạng đột biến ($\Delta\Delta G$) theo công thức (12):

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{dạng đột biến}} - \Delta G_{\text{dạng tự nhiên}} \quad (12)$$

Các đột biến cho giá trị $\Delta\Delta G > 0$ gợi ý các acid amin có vai trò quan trọng trong PPI giữa hai protein. Tuy nhiên, mỗi chương trình sẽ có một phương pháp tính toán ΔG (còn gọi là chức năng tính điểm) khác nhau. Nhằm đạt được kết quả đồng thuận và hữu ích cho việc thiết kế chất ức chế PPI, 4 chương trình quét đột biến alanin khác nhau được sử dụng trong nghiên cứu này, bao gồm DrugScore^{PPI} (tính điểm dựa trên kiến thức), BUDE Alanine Scan (dựa trên thực nghiệm), MutaBind2 (dựa trên mô hình học máy) và PIIMS (phương pháp MM-PBSA).^{77,189-192} Để khảo sát sâu hơn, sau khi quét đột biến điểm alanin, giao diện PPI của IL-33/ST2 được quét cụm bằng máy chủ BUDE Alanine Scan đối với các điểm nóng có ngưỡng $\Delta\Delta G > 1,2$ kcal/mol và khoảng cách C α –C α trong phạm vi 13 Å.¹⁹⁰

2.4.2.3. Dự đoán vị trí gắn kết của phối tử phân tử nhỏ trên IL-33 và thụ thể ST2

Mặc dù các acid amin điểm nóng trên giao diện PPI có thể được xác định bằng các phương pháp tính toán hay thực nghiệm, nhưng sự phù hợp để thiết kế và phát triển các chất ức chế phân tử nhỏ dựa trên các bề mặt này (tức vị trí orthosteric của PPI) vẫn gặp nhiều thách thức. Những trở ngại chính bao gồm các yếu tố về không gian và điện tử gây nên bởi chính các điểm nóng. Vì vậy, “khả năng làm mục tiêu

cho thuốc” (druggability) đối với các vị trí tại bề mặt PPI giữa IL-33/ST2 cần được đánh giá cẩn thận.

Khi xem xét các thành viên khác trong họ IL-1, một số cytokin có phối tử phân tử nhỏ gắn kết ở các vị trí khác (allosteric) so với vị trí tương tác với thụ thể tương ứng (orthosteric). Đặc biệt hơn, một số chất ức chế mạnh lại gắn kết ở các vị trí vốn không có sẵn trong cấu trúc protein ở dạng không liên kết phối tử (apoprotein). Những khoang này được gọi là các “túi ẩn” (cryptic pocket).¹⁹³ Trong các cytokin họ IL-1, IL-1 β và IL-36 γ là hai protein có cấu trúc tinh thể ở dạng apoprotein và holoprotein với phối tử gắn kết tại túi ẩn. Là một thành viên thuộc họ IL-1, với sự tương đồng về cấu trúc và tác động sinh lý, những túi gắn kết allosteric hoặc các túi ẩn có khả năng tồn tại trên IL-33. Để phát hiện hiệu quả các vị trí gắn kết tiềm năng cho phối tử phân tử nhỏ trên IL-33 và ST2, các phương pháp sau đây đã được sử dụng.

Phương pháp dự đoán vị trí gắn kết dựa trên cấu trúc tinh thể của IL-33/ST2

Dựa trên cấu trúc tinh thể ở trạng thái “tĩnh” của protein, các công cụ tính toán được sử dụng bao gồm các nhóm công cụ dựa trên hình học (MOE Site Finder¹⁹⁴, Fpocket^{195,196}, DoGSite^{197,198} và SiteMap¹⁹⁹), dựa trên năng lượng (AutoSite²⁰⁰ và FTSite²⁰¹), dựa trên pharmacophore (VolSite²⁰²) và dựa trên mô hình học máy (P2Rank^{203,204}, DeepSite²⁰⁵ và PocketMiner²⁰⁶). Như một nghiên cứu hồi cứu, các công cụ tính toán này được thực hiện trước tiên trên cấu trúc *apo* và *holo* của IL-1 β và IL-36 γ . Khả năng phát hiện vị trí gắn kết của các phương pháp được đánh giá qua sự đối chiếu với vị trí thực nghiệm của phối tử trong cấu trúc *holo*. Sau đó, các công cụ này tiếp tục được áp dụng trên cấu trúc của IL-33 và ST2 để dự đoán những vị trí gắn kết tiềm năng cho phối tử phân tử nhỏ. Cách thực hiện các phương pháp kể trên được mô tả chi tiết tại **PHỤ LỤC 6**.

Phương pháp dự đoán vị trí gắn kết dựa trên mô phỏng MD đồng dung môi

Các phương pháp “động” dựa trên mô phỏng MD được sử dụng nhằm mục đích cải thiện khả năng phát hiện các vị trí allosteric và túi ẩn. Đặc biệt, đối với các protein chưa có phối tử đồng kết tinh như IL-33 và ST2, mô phỏng MD đồng dung môi (cosolvent molecular dynamics – CMD) của nước và các đầu dò hữu cơ là cách tiếp cận phù hợp. Các phân tử dung môi này có thể là benzen (BNZ), pyrimidin (1P3), isopropanol (IPA), acetonitril (ACN), hay *N*-methylacetamid (NMA) để đại diện cho khả năng thăm dò những bề mặt có tương tác vòng thơm, kỵ nước hay liên kết hydro. Các kỹ thuật được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm MixMD²⁰⁷ và CrypticScout²⁰⁸, với quy trình thực hiện được mô tả chi tiết tại **PHỤ LỤC 6**. Thử tích

và các đặc tính của túi gắn kết được trong quá trình mô phỏng MD được khảo sát bằng công cụ MDpocket.²⁰⁹

Dự đoán vị trí allosteric

Sau khi xác định một cách đồng thuận các vị trí gắn kết trên protein bằng các công cụ tính toán, những vị trí nằm bên ngoài bề mặt PPI có thể được xem là vị trí allosteric. Nhằm mục đích khẳng định, các khoang này được khảo sát thêm bằng phương pháp Phân tích Chế độ Bình thường (Normal Mode Analysis – NoMA) với sự có mặt của các phối tử giả (pseudoligand). Cách tiếp cận này được đề xuất bởi Panjkovich và cộng sự, trong đó một phối tử giả bát diện tại vị trí allosteric có thể gây ra sự thay đổi hình dạng có ý nghĩa đối với cấu trúc của apoprotein trong NoMA.²¹⁰ Trong nghiên cứu này, các phối tử giả bát diện chứa 6 nguyên tử carbon (độ dài của các liên kết là 1,5 Å)²¹¹ được đặt vào các khoang cần khảo sát bằng phần mềm PyMOL dựa trên vị trí ánh xạ của các phân tử thăm dò trong mô phỏng MD đồng dung môi. NoMA sử dụng mô hình mạng đàn hồi (elastic network model – ENM) toàn nguyên tử với trường lực *aaenm2* được thực hiện với mô-đun *aanma* của thư viện Bio3D trong môi trường phần mềm R để đánh giá độ linh hoạt của protein trong 10, 20 và 30 chế độ không dư thừa đầu tiên. Bình phương trung bình $\langle \mu^2 \rangle$ độ dịch chuyển của các nguyên tử nặng của protein được chuyển đổi thành hệ số nhiệt độ B lý thuyết (B-factor) theo công thức (13):

$$B = \frac{8\pi^2}{3} \langle \mu^2 \rangle \quad (13)$$

Sau đó, kiểm định dấu–hạng Wilcoxon hai đuôi không ghép cặp được thực hiện để so sánh sự dao động giữa cấu trúc *apo* và *holo* của protein trên từng cặp nguyên tử. Giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê và vị trí khảo sát có tiềm năng là một vị trí allosteric.

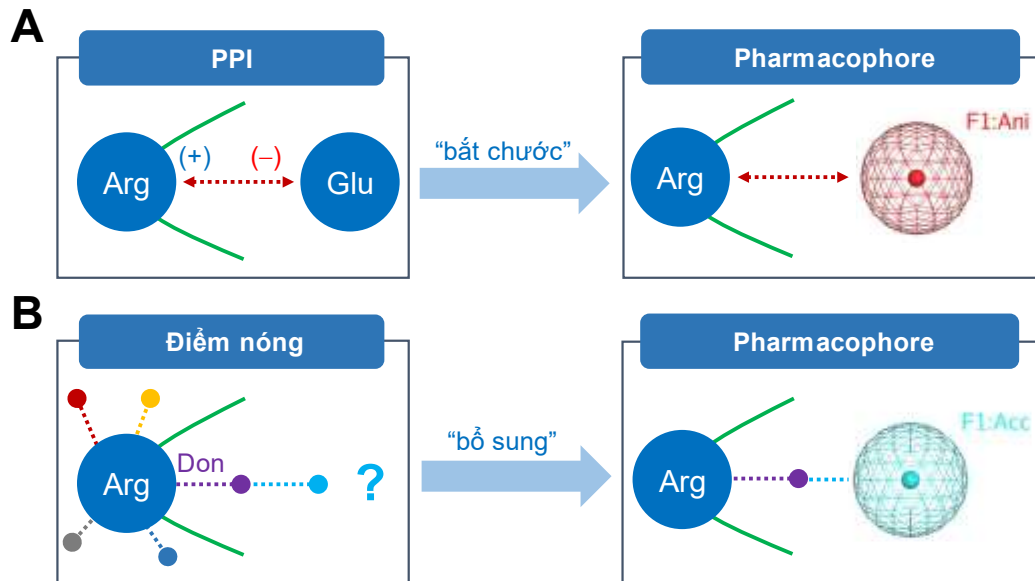
2.4.3. Phương pháp xây dựng mô hình *in silico* dựa trên cấu trúc mục tiêu

2.4.3.1. Xây dựng mô hình pharmacophore dựa trên cấu trúc mục tiêu

Phương pháp “bắt chước” các acid amin điểm nóng của PPI

Voet và cộng sự đã thực hiện một đánh giá về sự khả thi của phương pháp “bắt chước” PPI để xây dựng mô hình pharmacophore nhằm sàng lọc các chất phân tử nhỏ ức chế PPI (SMPPII).^{212,213} Các mô hình pharmacophore dựa trên cấu trúc mục tiêu trong đề tài được xây dựng dựa trên ý tưởng này. Mô hình pharmacophore cho chất ức chế IL-33 được tạo ra bằng cách “bắt chước” các đặc tính và sự tương tác của các acid amin điểm nóng tại giao diện PPI đã được xác định trên ST2 và ngược lại (**Hình 2.3A**). Công cụ MOE Pharmacophore Editor được sử dụng để tạo các truy vấn

pharmacophore. Để tăng tính chọn lọc cho mô hình khi sàng lọc ảo, các quả cầu loại trừ thể tích được tạo ra dựa trên bề mặt của khoang gắn kết của protein.



Hình 2.3. Hai phương pháp xây dựng mô hình pharmacophore dựa trên PPI (A) Phương pháp “bắt chước” PPI. Để ức chế protein chứa Arg tạo cầu muối với Glu, điểm pharmacophore được tạo ra cần bắt chước tính chất anion của Glu (Ani). (B) Phương pháp dựa trên tính chất của acid amin điểm nóng. Arg có thể cho nhiều tương tác khác nhau, nhưng chỉ có một khả năng cho liên kết hydro (Don) xuất hiện trên bề mặt protein. Để ức chế protein chứa Arg này, cần tạo một điểm pharmacophore có tính chất tương ứng, tức khả năng nhận liên kết hydro (Acc)

Phương pháp dựa trên hình dạng và tính chất lý hóa của khoang gắn kết

IL-33 và ST2 tương tác trên các bề mặt tích điện có thể dẫn đến các mô hình pharmacophore kiểu “bắt chước” chứa nhiều điểm cation hay anion. Những mô hình như vậy có thể hạn chế khả năng tìm kiếm hợp chất “hit” trên các cơ sở dữ liệu phổ biến. Do đó, cách tiếp cận thứ hai được áp dụng trong nghiên cứu này là xây dựng các mô hình dựa trên khoang gắn kết của các protein. Từ một khoang gắn kết đã xác định, một mô hình pharmacophore có thể được tạo ra bằng cách phân lập các acid amin điểm nóng và các acid amin khác trong khoang gắn kết. Từ đó, công cụ MOE Pharmacophore Editor có thể gợi ý các điểm pharmacophore thể hiện đặc tính của protein. Mô hình pharmacophore được tạo ra theo nguyên tắc “bổ sung” để tìm kiếm các chất có khả năng “khóa” các điểm nóng của PPI (**Hình 2.3B**).

Mô hình pharmacophore dựa trên phức hợp protein–phối tử

Từ một phức hợp protein–phối tử, công cụ AutoPH4²¹⁴ được sử dụng để tạo ra một truy vấn pharmacophore theo chế độ *Holo*. Với các vị trí gắn kết đã biết các hợp chất gắn kết thực nghiệm, mô hình được đánh giá qua các chỉ số độ đúng, độ đặc hiệu, điểm số GH, phân tích đường cong ROC và hệ số làm giàu.

2.4.3.2. *Mô phỏng gắn kết phân tử*

Cấu trúc 3D của IL-33 và ST2 sau khi tinh chỉnh bằng phần mềm MOE được đưa vào phần mềm AutoDockTools 1.5.7 để gán điện tích Kollman và lưu ở định dạng PDBQT. Chức năng hộp lưới (Grid box) được sử dụng để chỉ định vị trí gắn kết. Tọa độ tâm của hộp mô phỏng gắn kết được đặt tại trung tâm của vị trí gắn kết trên protein. Khoảng cách giữa các điểm lưới của hộp được đặt ở 1 Å và kích thước thước của hộp được mở rộng để bao phủ các acid amin quan trọng. Quá trình sàng lọc ảo bằng mô phỏng gắn kết phân tử được thực hiện với phần mềm AutoDock Vina 1.1.2,²¹⁵ với độ gắng sức của chương trình (exhaustiveness) là 16, số cấu dạng gắn kết giữ lại là 10 và khoảng cách năng lượng là 6 kcal/mol.

Với nghiên cứu sử dụng mô phỏng gắn kết bằng phần mềm LeadIT 2.1.8,²¹⁶ quy trình cũng được thực hiện với cùng nguyên tắc ở trên. Khoảng gắn kết được xác định bằng cách mở rộng bán kính từ vị trí của các acid amin quan trọng. Trong đó, thuật toán kết hợp Enthalpy và Entropy được sử dụng, với số lần phân mảnh cấu trúc phối tử tối đa là 200, số lần lặp lại tối đa là 1000 và số tư thế gắn kết tốt nhất được lưu lại là 10.

Trên những vị trí đã có thông tin về phối tử gắn kết thực nghiệm, quy trình gắn kết phân tử được thẩm định trước khi ứng dụng trong sàng lọc ảo. Tập dữ liệu để đánh giá mô hình chứa các chất có và không có hoạt tính. Nếu không có sẵn các chất không hoạt tính từ thực nghiệm, một tập hợp các hợp chất mới được tạo ra từ các chất có hoạt tính bằng các công cụ DUD-E,¹³⁵ DUDE-Z¹³⁶ và DeepCoy²¹⁷ để đại diện cho các chất không hoạt tính. Một mô hình gắn kết phân tử có hiệu năng sàng lọc tốt khi có thể phân biệt được chất có và không hoạt tính bởi ái lực gắn kết dự đoán, được phản ánh các giá trị ROC-AUC, $\overline{TG}$ và EF_{1%}.

Sau quá trình sàng lọc bằng mô phỏng gắn kết phân tử, các hợp chất tiềm năng được lựa chọn trên điểm số ái lực gắn kết (ΔG_{dock}) và cách thức tương tác với các acid amin quan trọng của protein mục tiêu. Bên cạnh đó, từ phức hợp gắn kết phân tử, chương trình HYDE được sử dụng để tính điểm lại và lựa chọn các hợp chất tiềm năng.^{218,219} Năng lượng tự do gắn kết $\Delta G_{\text{gắn kết HYDE}}$ gồm hai năng lượng thành phần chính là $\Delta G_{\text{liên kết hydro}}$ và $\Delta G_{\text{dehydrat hóa}}$. Từ $\Delta G_{\text{gắn kết HYDE}}$, chương trình có thể ước tính giá trị ái lực $K_{\text{i HYDE}}$ với đơn vị nồng độ mol.

2.4.3.3. *Mô phỏng động lực học phân tử và tính toán năng lượng tự do gắn kết cho phức hợp protein–phối tử*

Phức hợp gắn kết giữa các phối tử tiềm năng và protein được mô phỏng MD với phần mềm Amber22.¹⁸⁴ Protein được chuẩn bị bằng lệnh `pdb4amber` và phối tử

được chuẩn bị và tham số hóa bằng các lệnh `antechamber` và `parmchk2`. Mô-đun `tLEaP` được sử dụng để xây dựng hệ mô phỏng, với trường lực Amber `ff14SB`¹⁸⁵ được áp dụng cho protein và `GAFF2`²²⁰ dành cho phối tử. Phức hợp được solvat hóa trong một hộp nước TIP3P bát diện sao cho biên của protein đến cạnh hộp có khoảng cách 8 Å. Hệ được trung hòa bằng ion Na^+ hoặc Cl^- (nồng độ muối được giữ ở 0,15 M) và sau đó được giảm thiểu năng lượng, gia nhiệt và cân bằng theo cùng quy trình của các mô phỏng trên apoprotein (**Bảng PL6.2, PHỤ LỤC 6**). Các mô phỏng được thực hiện cho mỗi phức hợp protein–phối tử với thời gian cần thiết để đạt trạng thái cân bằng. Khi hoàn tất, quỹ đạo mô phỏng được xử lý bằng mô-đun `cpptraj`¹⁸⁶ để tính các giá trị RMSD, RMSF, Rg và SASA nhằm đánh giá độ ổn định của phức hợp. Dữ liệu của giai đoạn cân bằng được trích xuất để phân tích tương tác protein–phối tử bằng chương trình MDAnalysis và ProLIF.^{186–188} Đồng thời, các khung hình của dữ liệu đã trích xuất cũng được sử dụng để tính toán năng lượng tự do gắn kết bằng phương pháp MM-GBSA với công cụ `MMPBSA.py` tích hợp trong phần mềm AmberTools23.^{141,184} Với nghiên cứu sử dụng phần mềm GROMACS và Desmond, quy trình mô phỏng MD có nguyên tắc tương tự và năng lượng tự do gắn kết cũng được tính toán theo phương pháp MM-GBSA.^{221,222}

2.4.4. Phương pháp xây dựng mô hình *in silico* dựa trên phối tử

2.4.4.1. Phương pháp xây dựng truy vấn tương đồng hình dạng ba chiều

Phương pháp chồng phủ nhanh các cấu trúc hóa học (ROCS)²²³ được ứng dụng như một cách tiếp cận dựa trên phối tử nhằm góp phần làm giàu lượng chất ức chế IL-33/ST2, với quy trình thực hiện được minh họa ở **Hình 2.4**.

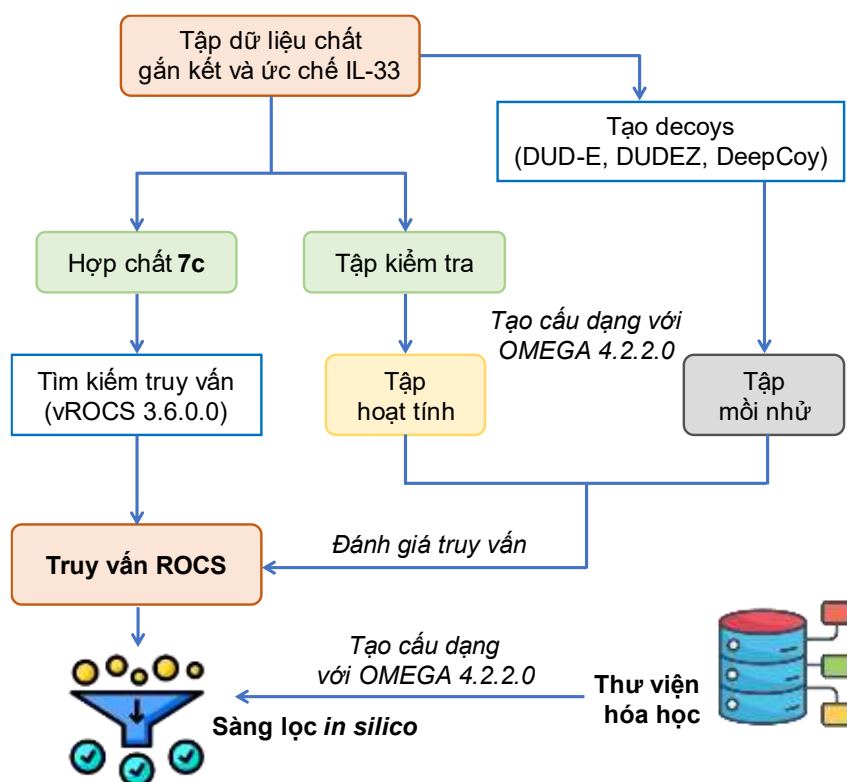
Dữ liệu huấn luyện và đánh giá mô hình

Đối với IL-33, hiện có 18 hợp chất được xác định khả năng gắn kết tại bề mặt tương tác với ST2 bằng phương pháp đo độ nhiễu loạn dịch chuyển hóa học trên phổ NMR. Hợp chất **7c** có hoạt tính tốt nhất được sử dụng để tạo truy vấn ROCS. Các hợp chất còn lại được sử dụng làm tập kiểm tra, đại diện cho các chất có khả năng gắn kết với IL-33. Do chưa có dữ liệu được công bố về chất không có hoạt tính nên một tập không hoạt tính giả định chứa các hợp chất decoy tạo bằng công cụ DUD-E,¹³⁵ DUDE-Z¹³⁶ và DeepCoy²¹⁷ được sử dụng để đánh giá các truy vấn ROCS.

Tìm kiếm truy vấn ROCS

Để tìm kiếm các truy vấn ROCS, hợp chất **7c** được đưa vào phần mềm vROCS 3.6.0.0 dưới dạng SMILES hoặc cấu dạng OMEGA được tạo với các ngưỡng RMS

khác nhau.^{125,223} Trường lực để tham số hóa các tính chất hóa học (Color Force Field) được sử dụng là Implicit Mills-Dean.²²⁴



Hình 2.4. Quy trình xây dựng truy vấn ROCS và ứng dụng trong sàng lọc ảo

Đánh giá các truy vấn ROCS

Các hợp chất trong tập kiểm tra được tìm kiếm tập hợp cấu dạng bằng phần mềm OMEGA. Mỗi hợp chất trong tập kiểm tra sau khi được chạy qua truy vấn ROCS sẽ được chấm các điểm số tương đồng Tanimoto về hình dạng (ShapeTanimoto), tính chất hóa học (ColorTanimoto), điểm số tương đồng tổng thể (TanimotoCombo), độ chồng phủ (Overlap) và các hệ số tương đồng khác so với truy vấn. Khả năng phân biệt chất có và không có hoạt tính của truy vấn ROCS được đánh giá dựa trên phân tích đường cong ROC và hệ số làm giàu (tại 0,5; 1 và 2%) được tính toán theo từng loại điểm số của các chất trong tập đánh giá. Các chỉ số đánh giá được tính toán bằng phần mềm vROCS và công cụ Screening Explorer.^{121,223} Ngoài ra, phương pháp tìm kiếm tương đồng dựa trên dấu vân tay 2 chiều Lingos (Lingos similarity) được áp dụng song song nhằm so sánh với hiệu năng sàng lọc của các truy vấn ROCS.²²⁵ Giá trị $p_{hiệu\ chỉnh}$ được tính toán bởi phần mềm vROCS giúp so sánh thống kê hiệu năng giữa các mô hình. Giá trị $p_{hiệu\ chỉnh} < 0,5$ cho biết truy vấn có hiệu năng sàng lọc tốt hơn có ý nghĩa thống kê so với phương pháp tham chiếu và ngược lại. Bên cạnh đó, kiểm định dấu-hạng Wilcoxon được thực hiện để so sánh thống kê giữa các mô hình và chọn ra truy vấn ROCS tốt nhất được tìm kiếm từ cùng một tập huấn luyện.²²⁶

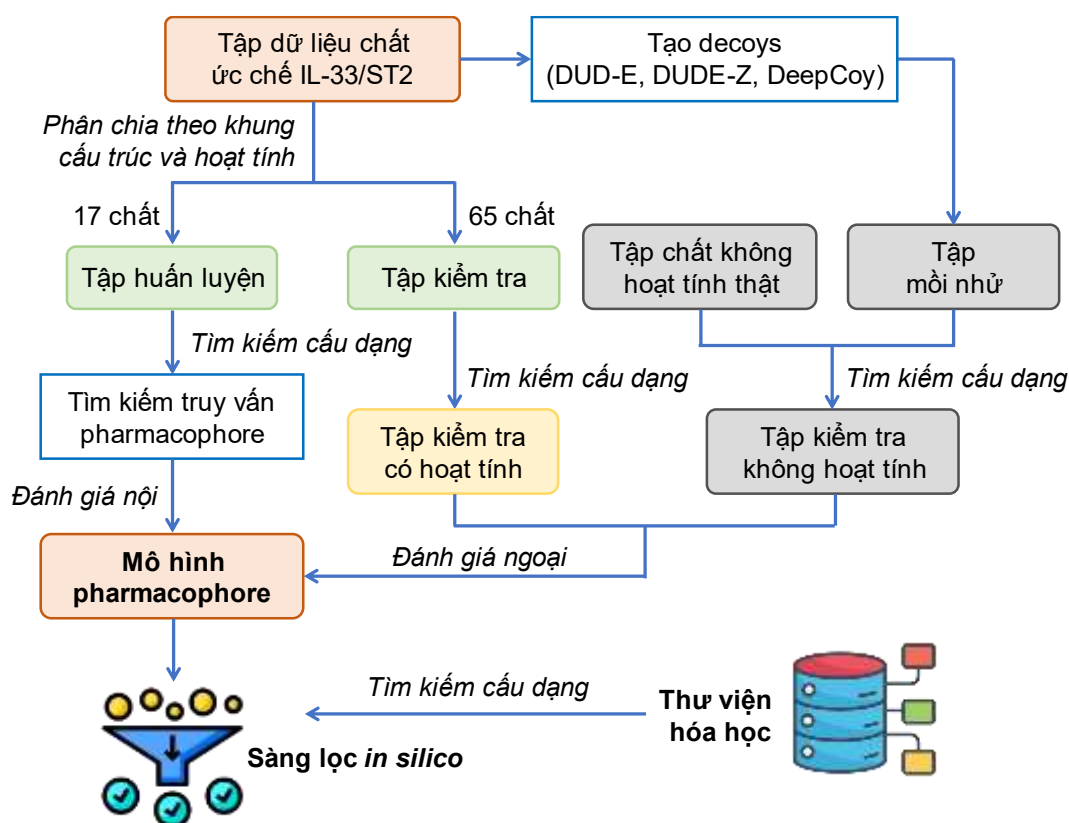
Sàng lọc ảo các thư viện hóa học qua truy vấn ROCS

Truy vấn ROCS có kết quả đánh giá tốt nhất được sử dụng để sàng lọc qua các thư viện hóa học nhằm tìm kiếm các hợp chất mới có tiềm năng ức chế IL-33. Trước khi sàng lọc, các hợp chất trong các thư viện cũng được tạo cấu dạng bằng OMEGA với cùng quy trình đã mô tả ở trên. Tập cấu dạng được cho chạy qua truy vấn và các chất được xếp hạng dựa trên hệ số tương đồng Tanimoto tổng thể.

2.4.4.2. Phương pháp xây dựng mô hình pharmacophore dựa trên phối tử

Tập dữ liệu xây dựng và đánh giá mô hình pharmacophore

Tập hợp 82 hợp chất có tác động ức chế tương tác IL-33/ST2 với hoạt tính được xác nhận qua hai thử nghiệm độc lập (AlphaLISA và trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33) được sử dụng để xây dựng và đánh giá mô hình pharmacophore dựa trên phối tử.^{22-24,150,151,227} Quy trình xây dựng mô hình pharmacophore dựa trên phối tử để sàng lọc *in silico* chất ức chế IL-33/ST2 được minh họa ở **Hình 2.5**.



Hình 2.5. Quy trình xây dựng, đánh giá và ứng dụng mô hình pharmacophore dựa trên phối tử ức chế hoạt tính IL-33/ST2

Tập dữ liệu được phân chia thành tập huấn luyện và tập kiểm tra có hoạt tính. Trong đó, 17 hợp chất có hoạt tính ức chế IL-33/ST2 mạnh nhất (dựa trên giá trị IC_{50} trong hai thử nghiệm sinh học) trong mỗi khung cấu trúc được đưa vào tập huấn

luyện. Tập kiểm tra không có hoạt tính bao gồm một tập không hoạt tính thực nghiệm được lấy mẫu đại diện từ dữ liệu PubChem BioAssay (mã số 1259354) và các tập chất môi như được tạo bằng các công cụ DUD-E, DUDE-Z và DeepCoy.^{135,136,217}

Tìm kiếm cấu dạng cho các hợp chất trong các tập hợp

Tìm kiếm cấu dạng cho các hợp chất trong tập huấn luyện là bước quan trọng trước khi tìm kiếm các truy vấn pharmacophore. Chức năng Conformation Search của phần mềm MOE được sử dụng để tìm kiếm tập hợp các cấu dạng có mức năng lượng thấp của các hợp chất trong tập huấn luyện và tập kiểm tra. Thuật toán tìm kiếm ngẫu nhiên (Stochastic) được áp dụng với các thông số được thiết đặt bao gồm số lượng cấu dạng tối đa tìm kiếm là 10.000, năng lượng biến dạng được giới hạn ở mức 7,0 kcal/mol, số bước tìm kiếm lặp lại tối đa là 10.000, số bước tối thiểu hóa năng lượng tối đa là 1000 cho đến đạt được giá trị RMS Gradient dưới 0,0001 kcal/mol/Å². Trong quá trình tìm kiếm cấu dạng, cấu hình tuyệt đối của các carbon bất đối xứng được chỉ định và điện tích từng phần của các cấu dạng được tính toán theo mô hình AM1-BCC.

Xây dựng và đánh giá mô hình pharmacophore dựa trên phối tử

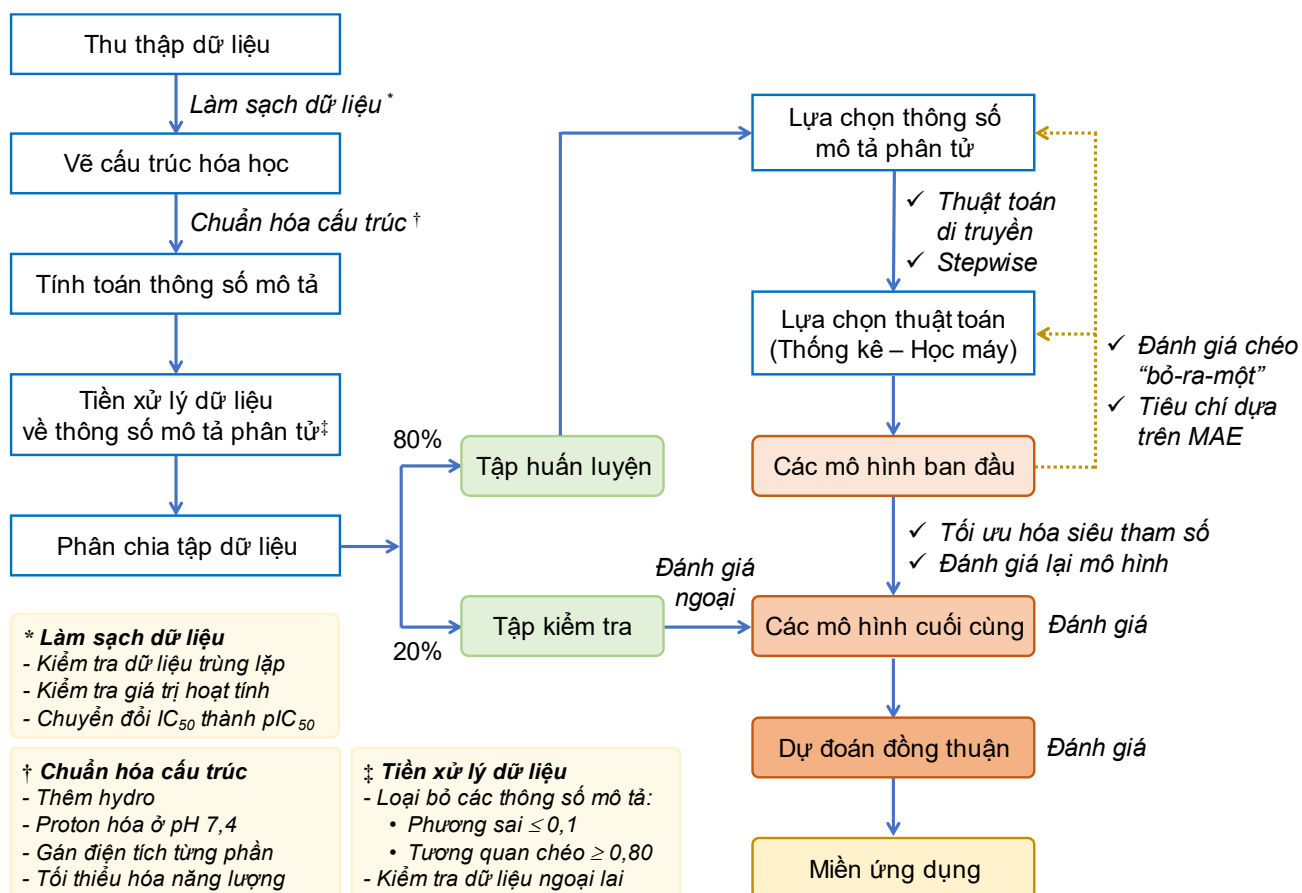
Công cụ MOE Pharmacophore Elucidation được sử dụng để tìm kiếm các truy vấn pharmacophore dựa trên tập hợp cấu dạng của các hợp chất trong tập huấn luyện. Mô hình pharmacophore được đánh giá ban đầu dựa vào số lượng chất có hoạt tính có thể thỏa mãn truy vấn (Cover), điểm số chồng phủ (Overlap) và độ chính xác (Accuracy). Sau đó, các mô hình tiếp tục được đánh giá hiệu năng sàng lọc trên tập kiểm tra có và không có hoạt tính. Từ đó, các chỉ số đánh giá như độ nhạy (Se), độ đặc hiệu (Sp), tỉ suất hoạt tính (Ya), điểm số Güner–Henry (GH), hệ số làm giàu (EF) và diện tích dưới đường cong ROC được tính toán để đánh giá mô hình.²²⁸

2.4.4.3. Phương pháp xây dựng mô hình mối liên quan định lượng giữa cấu trúc và tác động (QSAR)

Nghiên cứu QSAR được thực hiện trong đề tài này nhằm xác định các đặc điểm cấu trúc đóng góp vào tác dụng của các chất ức chế ST2 đã được báo cáo. Mô hình được xây dựng và đánh giá tuân thủ các nguyên tắc của OECD.¹²⁸ Mô hình QSAR dựa trên thông số mô tả phân tử 2 chiều (2D-QSAR) được thực hiện theo quy trình được tóm tắt ở **Hình 2.6**.

“Điểm cuối” của mô hình QSAR là giá trị IC₅₀ thể hiện hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HB. Dữ liệu để xây dựng và đánh giá mô hình được trình bày tại **Bảng PL2.2, PHỤ LỤC 2**. Giá trị IC_{50(HB)} được chuyển thành pIC_{50(HB)} =

$-\log(\text{IC}_{50}(\text{HB}))$. Các hợp chất trong tập dữ liệu được tính toán thông số mô tả phân tử 2D bằng phần mềm MOE 2022.02¹⁷⁴, công cụ PaDEL 2.21²²⁹ và OCHEM²³⁰ (bộ thông số Dragon 7, alvaDesc 2.0 và Mordred). Sau đó, các bộ thông số mô tả được gộp thành một tệp dữ liệu duy nhất và loại trùng lặp.



Hình 2.6. Quy trình xây dựng mô hình QSAR dự đoán chất ức chế IL-33/ST2

Dữ liệu xây dựng mô hình 2D-QSAR được tiền xử lý bằng cách loại bỏ các thông số mô tả có phương sai $\leq 0,1$ và tương quan chéo $\geq 80\%$ bằng thuật toán V-WSP.²³¹ Các dữ liệu ngoại lai hoặc gây nhiễu được xác định và loại bỏ bằng công cụ Small Dataset Curator.²³² Sau đó, tập dữ liệu được phân chia thành tập huấn luyện và tập kiểm tra bằng phương pháp Kennard-Stone²³³ hoặc theo thời gian. Quá trình xây dựng mô hình chỉ được thực hiện trên tập huấn luyện. Bộ thông số mô tả để xây dựng mô hình được lựa chọn bằng thuật toán di truyền hoặc phương pháp Stepwise. Mô hình được xây dựng bằng thuật toán bình phương tối thiểu từng phần (Partial Least Squares – PLS), đánh giá nội bằng phương pháp đánh giá chéo bỏ-ra-một (leave-one-out – LOO) và đánh giá ngoại trên tập kiểm tra (với các chỉ số tại **Bảng 1.3**). Phương pháp Y–ngẫu nhiên 100 lần được áp dụng để chứng minh mô hình được thiết lập không phải do ngẫu nhiên. Miền ứng dụng của mô hình được xác định bằng thuật toán DModX. Công cụ Intelligent Consensus Predictor được sử dụng để dự đoán đồng

thuận từ các mô hình PLS-QSAR. Nhằm mục đích so sánh, các thuật toán học máy cũng được sử dụng để xây dựng mô hình, bao gồm máy vector hỗ trợ (Support Vector Machine – SVM), Rừng ngẫu nhiên (Random Forest – RF), XGBoost và LightGBM.

2.4.5. Dự đoán tính chất dược động học và độc tính

Máy chủ ADMETlab 2.0 để sử dụng lập hồ sơ ADMET cho các hợp chất “hit” trên IL-33/ST2 thu được từ quá trình sàng lọc *in silico*. Chuỗi SMILES của hợp chất được đưa lên máy chủ ADMETlab. Từ đó, các nhóm đặc tính được dự đoán bao gồm tính chất lý hóa, sự phù hợp với các bộ lọc hóa dược, khả năng hấp thu – phân bố – chuyển hóa – thải trừ và độc tính.^{234,235}

2.4.6. Thử nghiệm *in vitro* đánh giá hoạt tính ức chế tương tác IL-33/ST2

2.4.6.1. Tái tổ hợp IL-33 người

IL-33 được tổng hợp bằng phương pháp tái tổ hợp vector biểu hiện *pET-SUMO-IL-33* trên chủng vi khuẩn *Escherichia coli* BL 21 tại Bộ môn Hóa Sinh, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.²³⁶ Sau 40 giờ nuôi cấy chủng vi khuẩn trong điều kiện môi trường ZYP-5052 ở nhiệt độ 25 °C, SUMO-IL-33 được thu lấy và tinh chế qua cột Ni-Sepharose. Đoạn dung hợp được loại bỏ bằng enzym SUMO protease. Sau đó, sản phẩm tiếp tục được tinh chế qua cột Ni-Sepharose và IL-33 ở dạng nguyên thể được thu lấy ở phân đoạn đầu tiên. Trước khi sử dụng cho thử nghiệm, protein được định lượng bằng phương pháp Bradford so với albumin để xác định nồng độ. Protein được xác nhận hoạt tính bằng bộ kit ELISA chứa kháng thể phát hiện IL-33. Đồng thời, IL-33 cũng được khảo sát sự đáp ứng phụ thuộc liều lượng trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33.

2.4.6.2. Thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33

Dòng tế bào HEK-Blue IL-33

Để khảo sát tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 của các hợp chất được sàng lọc *in silico*, nghiên cứu này sử dụng thử nghiệm trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33 (HB). HEK-Blue là dòng tế bào thận phôi thai người (human embryonic kidney – HEK) được chuyển một gen tổng hợp enzym phosphatase kiềm tiết ra bởi phôi (secreted embryonic alkaline phosphatase – SEAP). Gen này có vai trò như một “gen báo cáo”. Dưới tác động của IL-33, NF- κ B và AP-1 được hoạt hóa, dẫn đến sự biểu hiện của SEAP và dễ dàng đo được bằng thuốc thử phát hiện phosphatase kiềm.²³⁷

Dòng tế bào HB được cung cấp bởi hãng InvivoGen (mã số: *hkb-hil33*), đã được chuyển gen *IL1RL1* để biểu hiện thụ thể ST2 xuyên màng. Do sự đáp ứng với TNF-

α , IL-1 β và nhiều cytokin khác đã bị bất hoạt, tế bào này đáp ứng đặc hiệu với IL-33 người với giới hạn phát hiện trong khoảng từ 0,5–100 ng/mL.²²

Quy trình nuôi cấy ban đầu

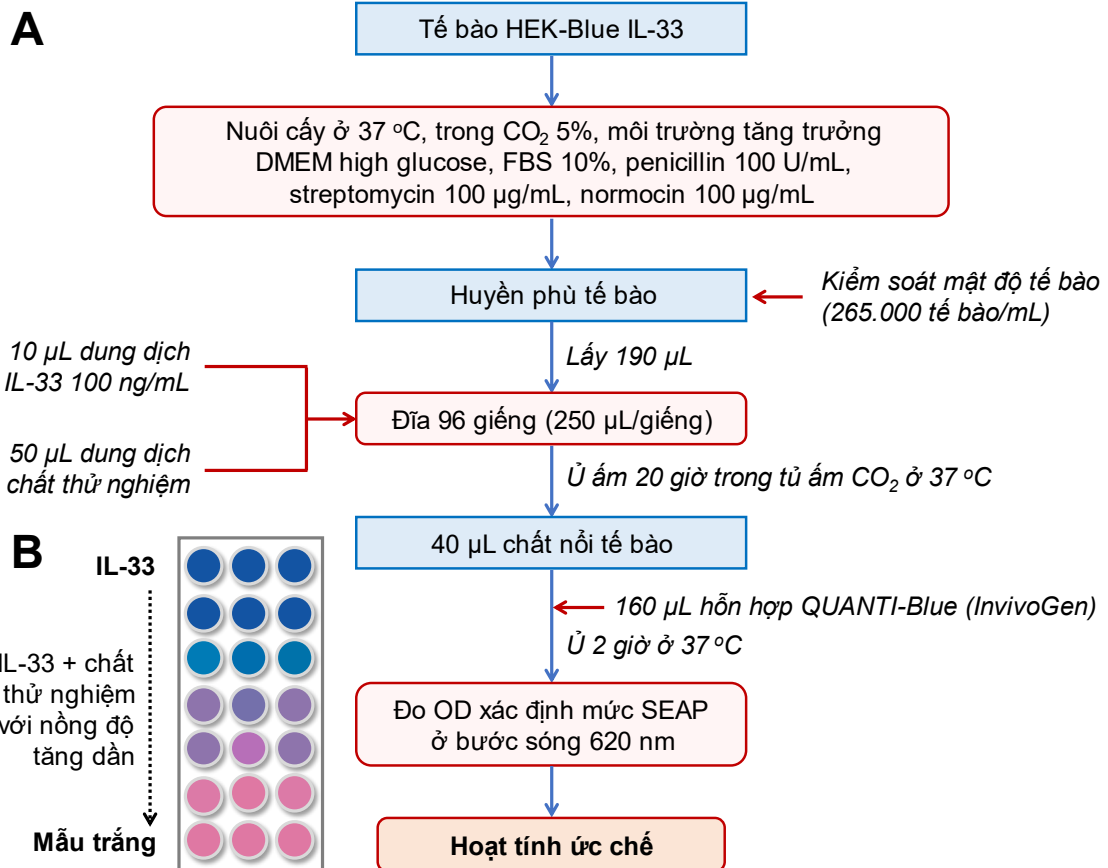
Ống chứa $3-7 \times 10^6$ tế bào được rửa đông nhanh và đảm bảo vô trùng bằng cách lắc nhẹ trong nồi cách thủy ở 37 °C. Tất cả các giai đoạn tiếp theo được thực hiện trong điều kiện vô trùng nghiêm ngặt. Môi trường tăng trưởng Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose được sử dụng, với sự bổ sung huyết thanh thai bò (FBS) 10% bất hoạt bằng nhiệt (30 phút ở 56 °C), penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 μ g/mL và normocin 100 μ g/mL. Tế bào được chuyển vào lọ chứa 15 mL môi trường tăng trưởng đã được làm ấm và ly tâm lọ với lực 300 xg trong 5 phút. Phần nổi phía trên có chứa chất bảo vệ đông lạnh được loại bỏ và huyền phù tế bào được tái tạo với 1 mL môi trường tăng trưởng không chứa kháng sinh chọn lọc. Các thành phần trong lọ được chuyển sang chai nuôi cấy 25 cm² có chứa 5 mL môi trường tăng trưởng không có kháng sinh chọn lọc và nuôi cấy ở 37 °C trong môi trường CO₂ 5%.

Bảo quản tế bào

Huyền phù tế bào được tái tạo trong môi trường đông lạnh (DMEM với FBS 20% và dimethyl sulfoxid (DMSO) 10%) mới chuẩn bị và môi trường tăng trưởng lạnh để đạt được mật độ $5-7 \times 10^6$ tế bào/mL. Mỗi một mL tế bào được cho vào lọ đông lạnh rồi đặt vào hộp đông lạnh và bảo quản qua đêm ở –80 °C. Sau đó, các lọ được chuyển sang nitơ lỏng để bảo quản lâu dài.

Quy trình thực hiện thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2 của hợp chất phân tử nhỏ trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33

Thử nghiệm hoạt tính ức chế IL-33/ST2 của các hợp chất phân tử nhỏ trên dòng tế bào HB được thực hiện theo quy trình của InvivoGen và nghiên cứu của Ramadan và cộng sự (**Hình 2.7A**).²² IL-33 người tái tổ hợp được pha loãng đến nồng độ khảo sát bằng môi trường thử nghiệm (DMEM high glucose, FBS 10%, penicillin 100 U/mL và streptomycin 100 μ g/mL). Hợp chất thử nghiệm và đối chứng dương được pha thành dung dịch gốc nồng độ 50 mM trong DMSO, sau đó được pha loãng nối tiếp đến nồng độ khảo sát bằng môi trường thử nghiệm. Nồng độ DMSO cuối cùng trong các giếng không quá 0,2%. Cho đến nay, hợp chất **32** (**Hình 1.11**) được báo cáo là phân tử nhỏ ức chế tín hiệu IL-33/ST2 tốt nhất trên mô hình tế bào HB nhưng không sẵn có trên thị trường. Do đó, trong nghiên cứu này, iST2-1 (**Hình 1.11**) được sử dụng làm hợp chất đối chứng dương.



Hình 2.7. Quy trình thực hiện thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33

(A) Quy trình nuôi cấy tế bào và thực hiện thử nghiệm đánh giá tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2. (B) Một ví dụ về sự thay đổi tín hiệu SEAP tiết ra bởi tế bào theo nồng độ tăng dần của hợp chất thử nghiệm.

Tế bào được nuôi cấy trong môi trường tăng trưởng và mật độ tế bào trong huyền phù được đảm bảo ở mức 265.000 tế bào/mL. Dịch nổi tế bào được phân phối trong đĩa 96 giếng (190 µL/giếng, tương đương ~50.000 tế bào trong mỗi giếng). Sau đó, 10 µL dung dịch IL-33 nồng độ 100 ng/mL và 50 µL dung dịch hợp chất thử nghiệm được thêm vào mỗi giếng. Thử nghiệm được thực hiện song song với chứng dương là hợp chất iST2-1 nồng độ 100 µM và chứng âm là DMSO 0,2% (v/v). Các nồng độ được mô tả là nồng độ cuối trong giếng. Mỗi giếng có thể tích cuối cùng là 250 µL và được ủ trong tủ ấm CO₂ ở 37 °C trong 20 giờ. Sau khi ly tâm, 40 µL dịch nổi tế bào trong các giếng được trộn kỹ với 160 µL hỗn hợp QUANTI-Blue (InvivoGen) trong các giếng mới và ủ 2 giờ ở nhiệt độ 37 °C trước khi đo hoạt tính SEAP bằng máy quang phổ ở bước sóng 620 nm.

Sự thay đổi màu sắc của thuốc thử QUANTI-Blue phản ánh tín hiệu IL-33/ST2 trên tế bào (**Hình 2.7B**). Ở các giếng chỉ được cho protein, tế bào được kích thích tối đa bởi IL-33 và cho tín hiệu SEAP mạnh nhất. SEAP làm biến đổi thuốc thử

QUANTI-Blue từ màu hồng thành xanh dương. Ngược lại, giếng trắng không có IL-33 nên chỉ có màu hồng của thuốc thử. Ở các giếng được cho hợp chất khảo sát, nếu có tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2, mức SEAP sẽ giảm và thể hiện qua màu tím hoặc hồng.

Hoạt tính ức chế (%) được tính bởi công thức (14). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

$$\%I = \left(1 - \frac{OD_{\text{mẫu thử}} - OD_{\text{mẫu trắng (thử)}}}{OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{mẫu trắng}}} \right) \times 100\% \quad (14)$$

Trong đó:

- $OD_{\text{đối chứng}}$: mật độ quang của giếng chỉ được cho IL-33
- $OD_{\text{mẫu trắng}}$: mật độ quang của mẫu chỉ được cho môi trường
- $OD_{\text{mẫu thử}}$: mật độ quang của mẫu được cho IL-33 và hợp chất thử nghiệm
- $OD_{\text{mẫu trắng (thử)}}$: mật độ quang của mẫu chỉ được cho môi trường và hợp chất thử nghiệm.

Đánh giá tỉ lệ sống của tế bào HB bằng thử nghiệm MTT

Tế bào HB được nuôi cấy trong môi trường DMEM high glucose, bổ sung FBS 10%, penicillin 100 U/mL và streptomycin 100 $\mu\text{g/mL}$. Sau đó, tế bào được phân phối trên đĩa 96 giếng trong 100 μL môi trường với mật độ ~ 50.000 tế bào/giếng. Tế bào được ủ trong CO_2 5% ở nhiệt độ 37 $^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ. Từ dung dịch mẹ có nồng độ 50 mM, các hợp chất thử nghiệm được pha loãng nối tiếp trong môi trường đến nồng độ 100 μM . Sau đó, môi trường cũ được hút bỏ và 100 μL dung dịch hợp chất thử nghiệm ở nồng độ 100 μM được cho vào mỗi giếng. Các mẫu đối chứng được thực hiện song song, gồm mẫu được xử lý chỉ với môi trường (mẫu trắng), DMSO 0,2% (chứng dung môi) và H_2O_2 5 mM (chứng gây chết tế bào).

Sau khi tế bào tiếp tục được ủ trong CO_2 5% ở 37 $^{\circ}\text{C}$ trong 20 giờ, 10 μL thuốc thử MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) nồng độ 5 mg/mL được cho vào mỗi giếng. Đĩa được bọc giấy bạc để tránh ánh sáng và tiếp tục ủ trong 3 giờ. Sau đó, dịch môi trường được hút bỏ và 100 μL DMSO 100% được cho vào mỗi giếng. Đĩa tiếp tục được bọc giấy bạc và lắc trên máy lắc ngang đến khi tan hết cặn tinh thể trong giếng. Cuối cùng, mật độ quang được đo ở bước sóng 540 nm và tỉ lệ sống của tế bào HB được tính bằng công thức (15). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

$$\text{Tỉ lệ tế bào sống (\%)} = \left(\frac{OD_{\text{mẫu thử}}}{OD_{\text{mẫu trắng}}} \right) \times 100\% \quad (15)$$

Trong đó:

- $OD_{\text{mẫu thử}}$: mật độ quang của giếng được xử lý bằng hợp chất thử nghiệm
- $OD_{\text{mẫu trắng}}$: mật độ quang của giếng chỉ được cho môi trường

2.4.6.3. Thử nghiệm đánh giá sự gắn kết của phối tử phân tử nhỏ trên IL-33 bằng quang phổ huỳnh quang

IL-33 có khả năng phát huỳnh quang do chứa các acid amin thơm như Trp, Tyr và Phe. Quang phổ huỳnh quang có thể được ứng dụng để xác định hằng số gắn kết giữa hợp chất phân tử nhỏ và protein thông qua khả năng làm tắt quang của phối tử. Tắt quang được định nghĩa là bất kì quá trình nào làm giảm cường độ huỳnh quang của protein. Chất làm tắt huỳnh quang được gọi chất tắt quang (quencher – Q). Mối liên hệ giữa cường độ huỳnh quang trước và sau khi có sự xuất hiện của chất tắt quang được mô tả bằng phương trình Stern-Volmer (16). Trong đó, giá trị F_0/F là một hàm số phụ thuộc vào giá trị nồng độ chất tắt quang $[Q]$.²³⁸

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad (16)$$

với:

- F_0 và F lần lượt là cường độ huỳnh quang của protein khi chưa có và có chất tắt quang với các nồng độ khác nhau
- K_{SV} là hằng số Stern-Volmer của phản ứng (M^{-1})
- k_q là hằng số tốc độ đập tắt lưỡng phân tử ($M^{-1}s^{-1}$)
- τ_0 là thời gian sống huỳnh quang của protein (s)
- $[Q]$ là nồng độ chất tắt quang (M).

Dung dịch IL-33 nồng độ 1 μM trong đệm PBS được quét phổ 3 chiều để ghi nhận kết quả 3 chiều của cường độ phát huỳnh quang được biểu diễn theo cặp bước sóng kích thích λ_{ex} (250–300 nm) và bước sóng phát xạ λ_{em} (từ 300–500 nm). Quá trình được thực hiện với chức năng 3D-Scan của máy quang phổ huỳnh quang Hitachi F7000, trong đó giá trị khe sóng kích thích và phát xạ được cài đặt ở 5 nm. Từ đó, bước sóng kích thích λ_{ex} với cường độ huỳnh quang tối ưu sẽ được sử dụng để khảo sát tính chất phát huỳnh quang của IL-33.

Phương pháp quét phổ phát xạ λ_{em} (300–500 nm) được sử dụng trong quá trình đo cường độ huỳnh quang của dung dịch IL-33 1 μM với sự có mặt của hợp chất thử nghiệm có nồng độ tăng dần. Đồng thời, hợp chất thử nghiệm được quét phổ UV-Vis để đánh giá khả năng gây ra hiệu ứng lọc nội tại có thể ảnh hưởng đến kết quả của thử nghiệm. Phương trình Stern-Volmer (16) được sử dụng để xác định cơ chế tắt quang của phối tử đối với protein. Biểu đồ Stern-Volmer được vẽ với trục tung là giá

trị F_0/F và trục hoành là nồng độ chất tắt quang $[Q]$. Khi đó, phương trình hồi quy nhận giá trị K_{SV} làm hệ số góc. Từ giá trị K_{SV} và giá trị τ_0 , hằng số dập tắt lưỡng phân tử của phản ứng k_q ($M^{-1}s^{-1}$) có thể được xác định bởi công thức (17):

$$k_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0} \quad (17)$$

Đối với các protein chưa được xác định giá trị τ_0 thực nghiệm như IL-33, τ_0 có thể được xác định sơ bộ dựa trên các tài liệu tham khảo từ y văn và dao động quanh 0,1–10 ns.²³⁹ Trong nghiên cứu này, giá trị τ_0 giả định được sử dụng là 10 ns, một giá trị được ứng dụng thường quy trong các nghiên cứu mà τ_0 của protein vẫn chưa được xác định.^{240,241}

Nếu giá trị k_q thu được nhỏ hơn $2 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$ thì phản ứng có cơ chế tắt quang động, quá trình tắt quang xảy ra do sự va chạm hỗn loạn và hấp thu bức xạ huỳnh quang của chất tắt quang. Ngược lại, nếu k_q thu được lớn hơn rất nhiều so với giá trị $2 \times 10^{10} M^{-1}s^{-1}$ thì phản ứng có cơ chế tắt quang tĩnh.¹⁴⁸ Từ đó, phương trình Stern-Volmer biến đổi (18) được sử dụng để xác định hằng số kết hợp (K_a) và tỉ lệ gắn kết giữa phối tử và protein.¹⁴⁹

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F_0}\right) = \log K_a + n \cdot \log[Q] \quad (18)$$

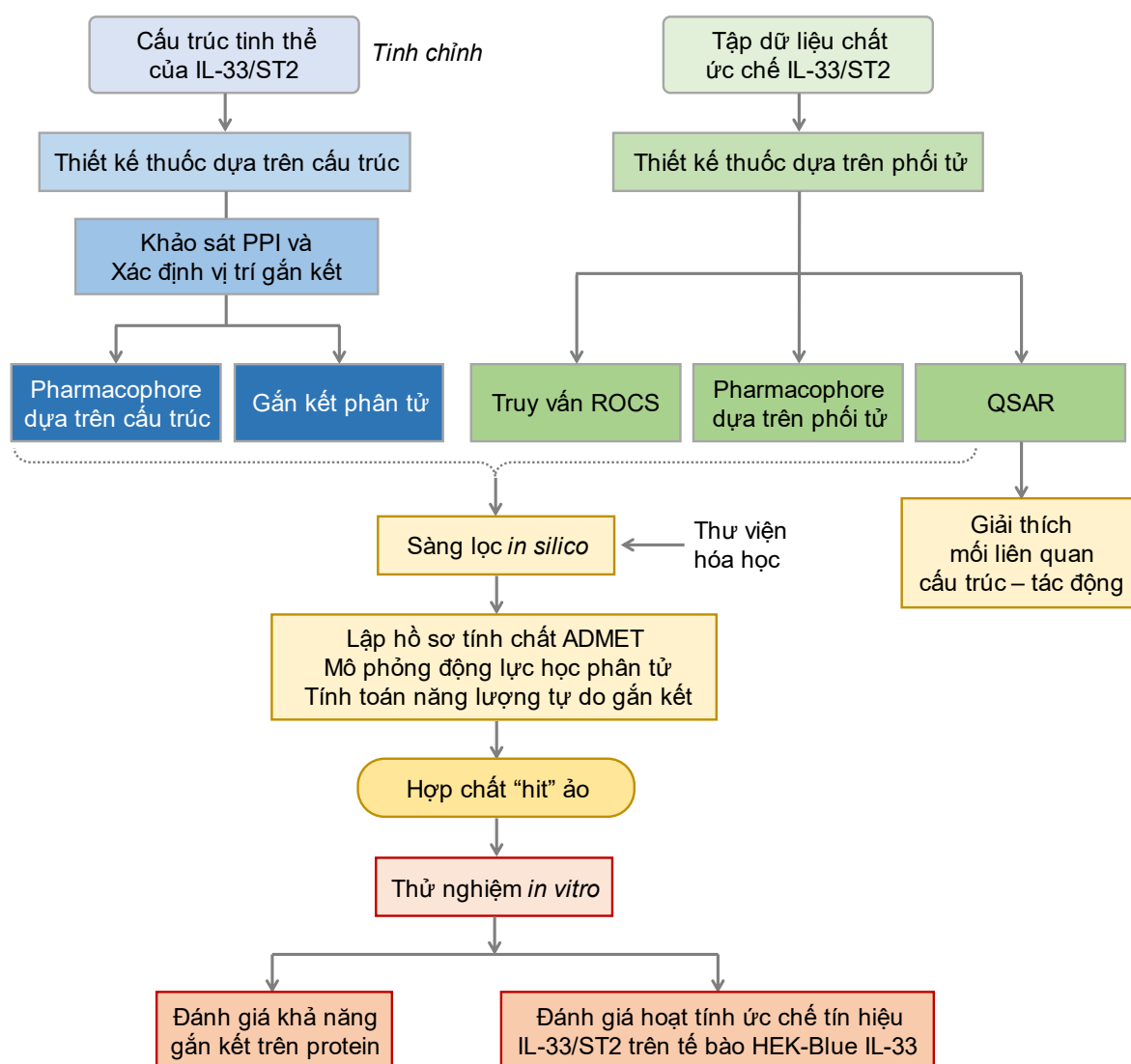
với:

- F_0 và F lần lượt là cường độ huỳnh quang của protein khi chưa có và có chất tắt quang với các nồng độ khác nhau
- K_a là hằng số gắn kết của phản ứng protein và phối tử (M^{-1})
- n là tỉ lệ phản ứng giữa phối tử và protein.

2.5. Quy trình nghiên cứu

Dựa trên thiết kế và phương pháp nghiên cứu, quy trình thực hiện đề tài sàng lọc *in silico* và *in vitro* chất ức chế IL-33/ST2 được thực hiện như sơ đồ ở **Hình 2.8**. Cụ thể, cấu trúc tinh thể của IL-33 và ST2 ở người (PDB: 4KC3) được sử dụng như điểm bắt đầu cho hướng thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc mục tiêu. Sau khi được tinh chỉnh để cải thiện chất lượng cấu trúc, phức hợp IL-33/ST2 được sử dụng để khảo sát các acid amin điểm nóng trong PPI và các vị trí gắn kết phù hợp cho phối tử phân tử nhỏ. Các dữ kiện này được sử dụng để xây dựng mô hình pharmacophore dựa trên cấu trúc mục tiêu và mô hình mô phỏng gắn kết phân tử. Đối với hướng thiết kế thuốc dựa trên phối tử, các mô hình *in silico* được xây dựng bao gồm truy vấn ROCS, mô hình pharmacophore dựa trên phối tử và mô hình QSAR.

Sau khi được thiết lập, các mô hình pharmacophore dựa trên cấu trúc mục tiêu, mô hình mô phỏng gắn kết phân tử và truy vấn ROCS được sử dụng để sàng lọc ảo qua các cơ sở dữ liệu hóa học lớn. Các chất dẫn đầu được lập hồ sơ tính chất ADMET và đưa vào mô phỏng MD để đánh giá sự ổn định của phức hợp protein–phối tử và tính toán năng lượng tự do gắn kết. Đồng thời, các mô hình pharmacophore dựa trên phối tử và QSAR được sử dụng để giải thích mối liên quan cấu trúc – tác động của các hợp chất có hoạt tính đã biết, từ đó hỗ trợ cho việc lựa chọn các hợp chất tiềm năng để đưa vào thử nghiệm *in vitro*. Hai thử nghiệm *in vitro* được thực hiện, bao gồm thử nghiệm đánh giá khả năng gắn kết của các hợp chất trên protein và thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên tế bào HEK-Blue IL-33.



Hình 2.8. Quy trình nghiên cứu tìm kiếm chất ức chế tương tác IL-33/ST2

2.6. Phương pháp phân tích dữ liệu

Để phân tích sự phân bố về các tính chất lý hóa của các hợp chất trong cơ sở dữ liệu cho sàng lọc ảo, các biểu đồ phân bố và mật độ được vẽ bằng thư viện Matplotlib trong môi trường ngôn ngữ lập trình Python 3. Để phân tích dữ liệu thu được từ quá trình mô phỏng MD, các biểu đồ RMSD, RMSF, Rg, SASA và năng lượng tự do được biểu diễn với thư viện Matplotlib và Seaborn. Quá trình thống kê và xếp hạng đồng thuận các acid amin điểm nóng trong quét đột biến alanin được thực hiện với phần mềm Excel trong gói Microsoft Office 365.

Để đánh giá hiệu năng sàng lọc của các mô hình pharmacophore, giá trị RMSD so với mô hình của các chất có và không có hoạt tính được sắp xếp trong chương trình Microsoft Excel. Sau đó, phân tích đường cong ROC được thực hiện bằng công cụ Screening Explorer¹²¹ kết hợp với mô-đun `sklearn.metrics` trong môi trường Python 3. Hiệu năng sàng lọc của truy vấn ROCS và mô hình gắn kết phân tử cũng được đánh giá theo phương pháp tương tự. Để chọn lựa mô hình tối ưu trong nhiều mô hình được xây dựng từ cùng một dữ liệu, kiểm định dấu-hạng Wilcoxon được thực hiện với mô-đun `scipy.stats` trong môi trường Python 3. Để so sánh điểm số gắn kết của các chất từ cơ sở dữ liệu khác nhau, kiểm định Shapiro-Wilk và biểu đồ Q-Q được sử dụng để kiểm tra phân phối chuẩn. Sau đó, kiểm định t-test hoặc Mann-Whitney U được áp dụng để so sánh thống kê tùy theo phân phối của dữ liệu.²⁴²

Đối với các mô hình QSAR được xây dựng bằng phương pháp PLS với bộ công cụ của DTC Lab, các chỉ số đánh giá gồm R^2 , RMSE, MAE, Q^2 , CCC, r_m^2 được phân tích và báo cáo trực tiếp từ phần mềm PLS SingleY 1.0. Với các mô hình QSAR được xây dựng dựa trên mô hình học máy, các chỉ số tương tự được phân tích với mô-đun `sklearn.metrics` trong môi trường Python 3.

Đối với thử nghiệm *in vitro*, kết quả thô từ máy đo quang phổ được nhập vào phần mềm Microsoft Excel để xử lý số liệu và đưa vào phần mềm GraphPad Prism 8.4.3 để phân tích và vẽ các biểu đồ. Hoạt tính của các hợp chất thử nghiệm được so sánh với hợp chất đối chứng dương bằng kiểm định ANOVA một chiều kết hợp với so sánh hậu nghiệm. Giá trị IC_{50} được xác định dựa trên phương trình phi tuyến tính logarit nồng độ – hoạt tính ức chế và được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn.

2.7. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu này không có đối tượng nghiên cứu là con người và không sử dụng các mô hình thử nghiệm trên động vật.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ

3.1. Cơ sở dữ liệu cấu trúc hóa học định hướng cho nghiên cứu sàng lọc *in silico* chất ức chế PPI

Khám phá thuốc phân tử nhỏ ức chế PPI hiện vẫn còn là một trong các thách thức trong lĩnh vực Hóa Dược. Để góp phần thúc đẩy những tiến bộ trong lĩnh vực này, một cơ sở dữ liệu cấu trúc hóa học đã được chuẩn bị cẩn thận để sẵn sàng cho việc sử dụng trong các dự án sàng lọc phân tử nhỏ ức chế PPI. Sau khi thu thập, xử lý và tạo tập hợp cấu dạng cho từng hợp chất trong mỗi thư viện hóa học, các tệp cơ sở dữ liệu được lưu trữ dưới các định dạng phù hợp để có thể truy cập bằng các phần mềm thiết kế thuốc phổ biến. Các tệp này có thể được tải về từ các đường dẫn tại địa chỉ <https://github.com/MedChemUMP/Ready-Database-for-PPI-VS> (**Hình PL7.1, PHỤ LỤC 7**). Bộ cơ sở dữ liệu chứa tổng cộng 2.615.938 hợp chất với hơn 224 triệu cấu dạng 3D (**Bảng PL7.1, PHỤ LỤC 7**). Trong đó, mỗi thư viện con đều được cung cấp: (i) tệp SDF và MDB chứa các cấu trúc đã được tối thiểu hóa năng lượng, (ii) tệp nén ZIP chứa các cấu trúc ở định dạng PDBQT sẵn sàng cho tác vụ gắn kết phân tử bằng phần mềm thông dụng như AutoDock, (iii) một tệp OEB.GZ chứa tập hợp cấu dạng 3D sẵn sàng cho quá trình sàng lọc ảo bằng mô hình pharmacophore với phần mềm MOE hoặc bằng truy vấn tương đồng hình dạng phân tử 3 chiều với phần mềm ROCS. Sự phân bố về các thông số lý hóa cơ bản (khối lượng phân tử, số nhóm cho và nhận liên kết hydro, số nhóm liên kết quay, LogP, diện tích bề mặt phân cực topo) của mỗi thư viện được thống kê và lưu trữ trong thư mục tương ứng.

3.2. Khảo sát tương tác protein-protein của IL-33/ST2 và xác định các vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ trên mỗi protein bằng các công cụ máy tính

3.2.1. Cấu trúc tinh thể được tinh chỉnh của IL-33 và thụ thể ST2

Tập PDB 4KC3 chứa cấu trúc của IL-33 và miền ngoại bào của ST2 ở trạng thái gắn kết với nhau. Trong đó, 3 phân tử N-acetyl-D-glucosamin liên kết với Asn95, Asn140 và Asn191 của ST2 do quá trình hậu dịch mã. IL-33 chứa các selenomethionin tại vị trí acid amin thứ 181, 183 và 223. Cả hai protein đều có một số vùng cấu trúc chưa được giải bởi tín hiệu điện tử yếu trong quá trình nhiễu xạ tinh thể tia X. Vì vậy, cấu trúc tinh thể của mỗi protein được tách riêng từ phức hợp nói trên và xử lý bằng phần mềm MOE để thu được IL-33₁₁₂₋₂₇₀ (dạng IL-33 có hoạt tính cytokin) và ST2₁₉₋₃₂₃ (miền ngoại bào của ST2) có cấu trúc hoàn chỉnh. **Hình PL8.1** tại **PHỤ LỤC 8** minh họa cho cấu trúc của các protein trước và sau khi xử lý. Trong

đó, mạch chính của cấu trúc thực nghiệm được giữ nguyên, chỉ có các vòng (loop) còn thiếu được bổ sung và chuỗi bên của các acid amin được tối ưu hóa.

Cấu trúc của IL-33 và ST2 sau khi xử lý đều có điểm số chất lượng mô hình tổng thể dự đoán bởi ModFOLD (lần lượt là 0,8224 và 0,7116) tốt hơn so với cấu trúc ban đầu (0,7600 và 0,6765). Độ tin cậy của mô hình cấu trúc tính trên từng acid amin được thể hiện tại **Hình PL8.2, PHỤ LỤC 8**. Cấu trúc toàn nguyên tử của các protein trong phức hợp PDB ban đầu và sau khi xử lý được đánh giá bằng công cụ MolProbity (**Bảng PL8.1, PHỤ LỤC 8**) và biểu đồ Ramachandran (**Hình PL8.3, PHỤ LỤC 8**). Kết quả cho thấy cấu trúc 3D của mỗi protein sau khi được tinh chỉnh đều giảm thiểu được các hệ số xung đột, số nhóm quay kém chất lượng và tăng số acid amin trong vùng thuận lợi của biểu đồ Ramachandran. Do đó, các cấu trúc protein thu được sau quá trình tinh chỉnh được sử dụng làm điểm bắt đầu cho các nghiên cứu thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc mục tiêu cho IL-33 và ST2.

3.2.2. Khảo sát PPI của IL-33/ST2

3.2.2.1. PPI của IL-33/ST2 trong cấu trúc tinh thể

Phức hợp tinh thể của IL-33/ST2 (ở dạng nguyên bản trong tệp PDB 4KC3 và sau khi xử lý) được sử dụng để khảo sát PPI bằng công cụ MOE Protein Contacts. Kết quả tại **Bảng 3.1** cho thấy tất cả các acid amin điểm nóng của IL-33 và ST2 tại vị trí 1 được báo cáo bởi Liu và cộng sự đã được phát hiện. Trong đó, 3 tương tác quan trọng là cầu muối giữa Glu144 và Arg38, Glu148 và Lys22, Asp244 và Arg35 với năng lượng liên kết lần lượt là $-4,29$; $-16,19$ và $-10,32$ kcal/mol. Mặc dù được chứng minh là các acid amin quan trọng, tương tác giữa Asp149 và Arg198 không có năng lượng liên kết nổi bật như 3 acid amin còn lại. Tại vị trí 2 của PPI giữa IL-33 và ST2, chỉ có cầu muối giữa acid điểm nóng Glu165 và Arg313 được công cụ MOE Protein Contacts báo cáo, với năng lượng liên kết là $-15,47$ kcal/mol. Các điểm nóng thực nghiệm có thể hình thành tương tác kỵ nước như Tyr163, Leu182 trên IL-33 và Leu246, Leu306, Leu308, Leu311 trên ST2 đã không được phát hiện.

Ngoài những tương tác kể trên, ba tương tác quan trọng được phát hiện thêm là liên kết ion giữa Lys152 của IL-33 và Asp115 của ST2, giữa Glu139 của IL-33 và Arg38 của ST2 tại vị trí 1; và giữa Glu121 của IL-33 và Lys257 của ST2 tại vị trí 2 (với năng lượng liên kết lần lượt là $-24,43$; $-5,61$ và $-5,91$ kcal/mol). Các tương tác này chưa được nhấn mạnh trong các báo cáo trước đây. Sử dụng công cụ phân tích PDBsum, các cầu muối kể trên cũng được phát hiện (**Hình PL9.1, PHỤ LỤC 9**)

Bảng 3.1. Phân tích tương tác protein-protein giữa IL-33 và ST2 trong cấu trúc tinh thể

Phức hợp tinh thể IL-33/ST2 (PDB 4KC3)					Phức hợp IL-33/ST2 sau tinh chỉnh bằng MOE				
Tương tác	IL-33	ST2	E (kcal/mol)	D (Å)	Tương tác	IL-33	ST2	E (kcal/mol)	D (Å)
H	Pro118	Lys257	-0,50	3,31	H	Ile119	Lys257	-4,50	2,94
IH	Glu121	Lys257	-6,72	3,52	IH	Glu121	Lys257	-5,91	3,82
H	Asp131	Arg198	-1,90	3,38					
H	Asp131	Tyr119	-1,40	2,73	H	Asp131	Tyr119	-1,80	2,51
I	Glu139	Arg38	-5,08	3,65	I	Glu139	Arg38	-5,61	3,85
					H	Tyr143	Arg38	-1,10	3,66
IH	Glu144	Arg38	-7,60	3,57	IH	Glu144	Arg38	-4,29	3,83
H	Glu144	Gln39	-2,00	3,18	H	Glu144	Gln39	-4,00	3,27
IH	Glu148	Lys22	-7,21	3,13	IH	Glu148	Lys22	-16,19	3,12
H	Asp149	Thr135	-2,60	2,95	H	Asp149	Thr135	-1,80	2,98
I	Asp149	Arg198	-1,66	3,90	IH	Asp149	Arg198	-3,18	3,75
A	Leu150	Tyr119	-1,00	3,99	H	Leu150	Met118	-0,60	3,56
IH	Lys152	Asp115	-13,19	3,20	IH	Lys152	Asp115	-24,43	3,17
H	Lys152	Ser199	-1,30	3,42	H	Lys152	Ser199	-1,00	3,98
IH	Glu165	Arg313	-23,75	3,21	I	Glu165	Arg313	-15,47	3,35
H	Lys180	Leu311	-6,10	3,20	H	Lys180	Leu311	-4,80	3,28
A	Asn222	His309	-1,10	3,49	A	Asn222	His309	-0,90	3,76
I	Asp244	Arg35	-9,03	3,25	IH	Asp244	Arg35	-10,32	3,35
H	Asn245	Asp137	-2,20	2,89	H	Asn226	Phe245	-0,70	3,16

■ Kết quả đồng thuận, ■ kết quả khác biệt giữa hai phức hợp, ■ kết quả mới được phát hiện, E: năng lượng liên kết, D: khoảng cách của liên kết, H: liên kết hydro, I: liên kết ion, A: tương tác của vòng thơm.

3.2.2.2. PPI của IL-33/ST2 trong mô phỏng MD

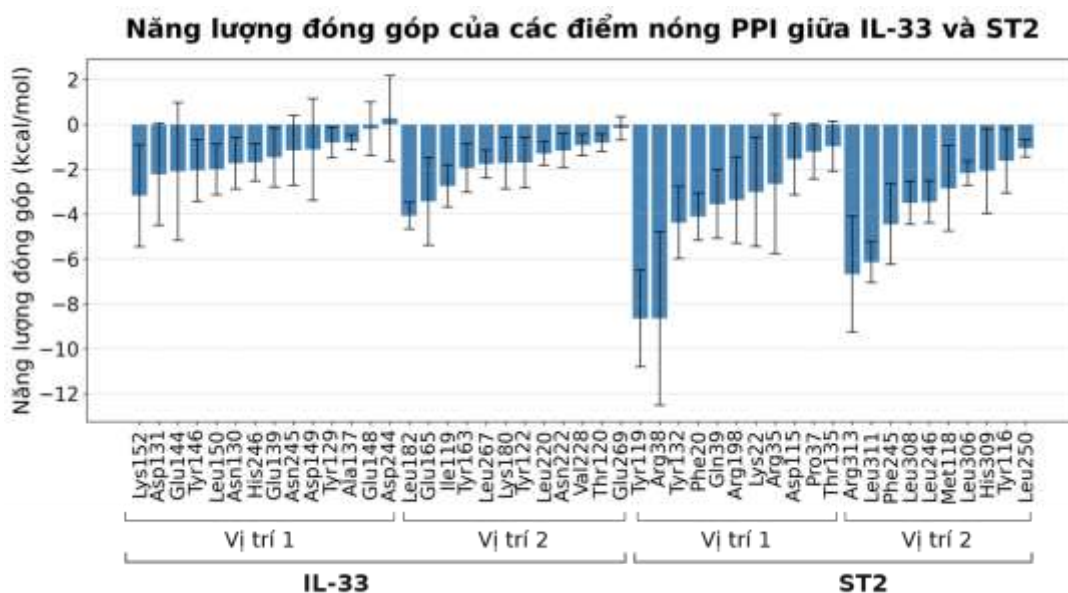
Phức hợp IL-33/ST2 được mô phỏng MD 500 ns, gồm 5 quỹ đạo độc lập 100 ns. Trong mỗi quỹ đạo, phức hợp nhanh chóng đạt sự ổn định sau khoảng 10 ns đầu tiên, thể hiện qua biểu đồ RMSD của protein (**Hình PL9.2, PHỤ LỤC 9**). Bán kính quay và diện tích tiếp xúc bề mặt dung môi của phức hợp hai protein cũng giảm nhẹ và đạt khoảng giá trị hội tụ từ khoảng 40 ns trong mỗi quỹ đạo. Do vậy, dữ liệu 50 ns cuối của mỗi quỹ đạo được trích xuất để phân tích tính chất động của PPI giữa IL-33/ST2 trong quá trình mô phỏng và tần suất biểu hiện của các tương tác được trình bày tại **Bảng 3.2**. Trong đó, mô phỏng MD đã phát hiện tất cả các acid amin điểm nóng thực nghiệm của IL-33 và ST2 tại cả hai vị trí PPI (các tương tác màu xanh). Ngoại trừ Asp149 khá linh động và tương tác với nhiều acid amin khác nhau trong vùng lân cận, những điểm nóng khác đều duy trì tương tác trên 80% trong quá trình mô phỏng MD. Cũng tại **Bảng 3.2**, một số tương tác mới so với các báo cáo về điểm nóng thực nghiệm đã được phát hiện, với các cặp có tần suất trên 80% được tô màu đỏ.

Bảng 3.2. PPI giữa IL-33/ST2 được khảo sát qua mô phỏng MD, với tần suất biểu hiện của các loại tương tác được tính toán trên dữ liệu 50 ns cuối của 5 quỹ đạo MD độc lập

Vị trí PPI	Acid amin IL-33	Acid amin ST2	Tương tác và tần suất biểu hiện (%)
1	Tyr129	Tyr132	Hyd (87,6), VdW (50,4)
1	Asn130	Tyr132	Hyd (95,3), VdW (44,2)
1	Asp131	Tyr119	Hyd (54,7), VdW (49)
1	Asp131	Thr121	HBA (50,3), VdW (58)
1	Asp131	Arg198	Ani (71), HBA (56,9), VdW (71)
1	Ala137	Phe20	Hyd (93,3)
1	Leu138	Lys19	HBA (34,4), VdW (41)
1	Glu139	Lys19	Ani (66), HBA (51,8), VdW (62,1)
1	Glu139	Phe20	Hyd (91,4)
1	Glu144	Phe20	Hyd (86,2)
1	Glu144	Arg38	Ani (99,4), HBA (97,2), VdW (98,9)
1	Glu144	Gln39	HBA (91,8), VdW (93,6)
1	Tyr146	Pro37	HBD (39,7), Hyd (50,2), VdW (49,9)
1	Glu148	Lys22	Ani (96,4), HBA (87,8), VdW (93,7)
1	Asp149	Lys22	Ani (40,9)
1	Asp149	Met118	Hyd (64,5)
1	Asp149	Tyr119	Hyd (54,8), VdW (39,5)
1	Asp149	Thr135	HBA (41,2), VdW (43)
1	Asp149	Arg198	Ani (37,7), HBA (34,9), VdW (35,1)
1	Leu150	Tyr119	HBA (74,5), Hyd (76,7), VdW (83,4)
1	Lys152	Asp115	Cat (33,9), HBD (65), VdW (76,7)
1	Lys152	Tyr116	HBD (40,9), VdW (46,6)
1	Glu200	Lys41	Ani (44,8), HBA (37,4), VdW (40,6)
1	Asp244	Arg35	Ani (84,7), VdW (57)
1	Asn245	Arg35	HBA (53,3), VdW (70,1)
1	His246	Gln39	Hyd (90,7), VdW (56,8)
2	Ile119	Leu250	Hyd (82,3)
2	Ile119	Leu304	Hyd (66)
2	Ile119	Leu306	Hyd (95,7)
2	Ile119	Leu311	Hyd (75,8)
2	Thr120	Leu246	Hyd (54,3)
2	Thr120	Leu306	Hyd (56,8)
2	Tyr122	Leu246	Hyd (47,8)
2	Tyr163	Leu246	Hyd (91,4), VdW (43,7)
2	Glu165	Arg313	Ani (94,5), HBA (93,7), VdW (93,9)
2	Glu165	Leu311	Hyd (92,8), VdW (33,6)
2	Lys180	Leu311	HBA (96,5), HBD (95,5), Hyd (61,7), VdW (99,7)
2	Leu182	Leu246	Hyd (81,3)
2	Leu182	Leu306	Hyd (80,6)
2	Leu182	Leu311	Hyd (86,7)
2	Leu220	Leu308	Hyd (79,7)
2	Leu220	Leu246	Hyd (33,7)
2	Asn222	Leu308	Hyd (59,6), VdW (39,9)
2	Asn222	His309	Hyd (50), VdW (61,6)
2	Val228	Leu308	Hyd (83,6)
2	Leu267	Phe245	Hyd (95,3), VdW (49,6)
2	Glu269	Phe245	Hyd (39,4)

* Các loại tương tác: Ani: anion, Cat: cation, HBA: nhận liên kết hydro, HBD: cho liên kết hydro, Hyd: kỵ nước, VdW: tương tác Van der Waals. ■ Cặp tương tác giữa các acid amin điểm nóng thực nghiệm ■ Các tương tác được mô tả trong y văn nhưng chưa được chứng minh bằng thực nghiệm ■ Các acid amin có tần suất biểu hiện cao, chưa được báo cáo trong y văn và có tiềm năng là những điểm nóng mới trong PPI của IL-33/ST2.

Từ **Bảng 3.2**, các acid amin tham gia tương tác với tần suất cao hơn 80% được lựa chọn để tính toán phân rã năng lượng tự do MM-GBSA nhằm đánh giá sự đóng góp của chúng cho tương tác giữa IL-33 và ST2. Kết quả tại **Hình 3.1** cho thấy các acid amin được khảo sát đều đóng góp mức năng lượng âm, ngoại trừ Asp244. Các acid amin trên ST2 có mức đóng góp năng lượng tự do lớn hơn so với IL-33. Bên cạnh đó, năng lượng tự do gắn kết giữa IL-33 và ST2 được hình thành chủ yếu bởi sự đóng góp từ các chuỗi bên của mỗi acid amin tương tác (**Hình PL9.3, PHỤ LỤC 9**).



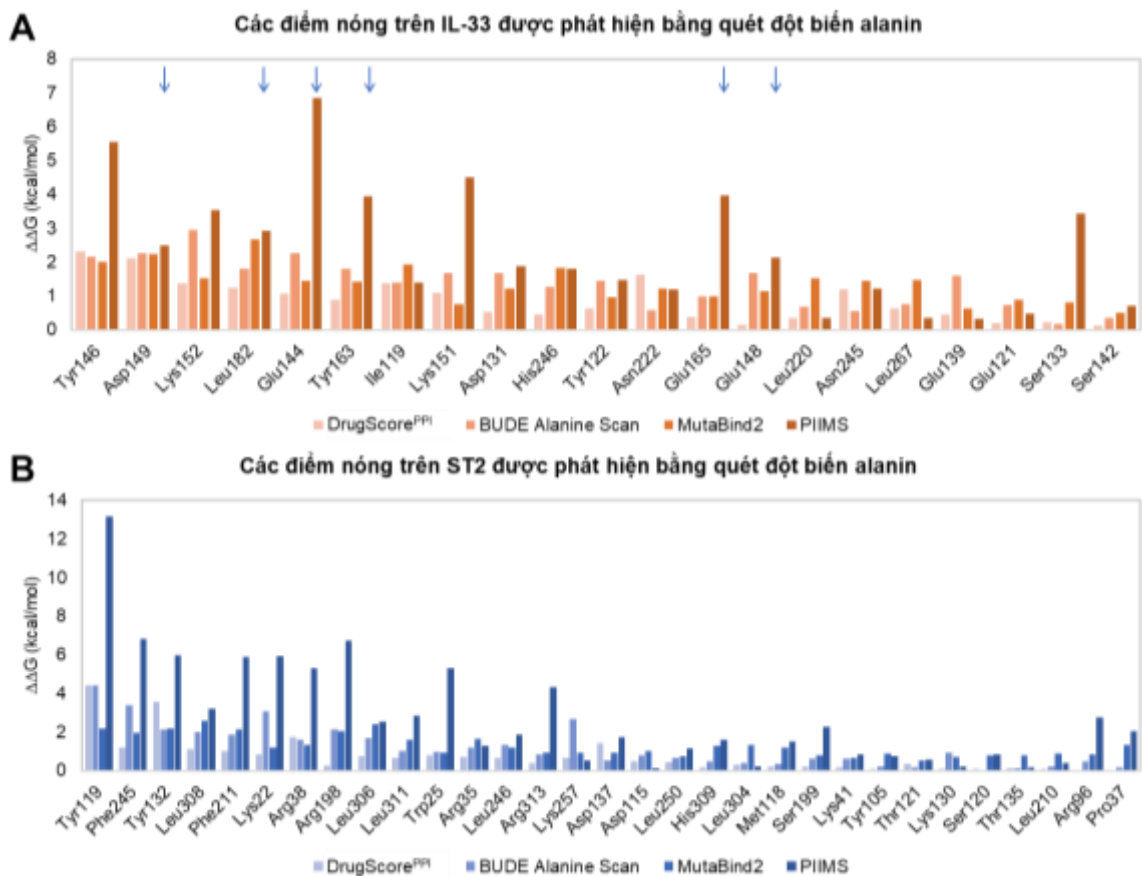
Hình 3.1. Sự đóng góp của các acid amin điểm nóng trong PPI IL-33/ST2 được tính toán từ quá trình phân rã năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA dựa trên mô phỏng MD

Tại vị trí 1 của IL-33, Glu144 là acid amin điểm nóng thực nghiệm có mức đóng góp năng lượng tự do nhiều hơn so với Asp149, Glu148 và Asp244. Các acid amin khác có đóng góp lớn và có tiềm năng là điểm nóng bao gồm Lys152, Asp131, Tyr146, Leu150, Asn130, His246, Glu139 và Asn245. Trên thụ thể ST2, mức đóng góp năng lượng tự do đã chứng minh cho tầm quan trọng của các acid amin Lys22, Arg35, Arg38, Gln39 và Arg198. Các acid amin khác cũng có mức đóng góp đáng kể bao gồm Tyr119, Tyr132, Phe20, Asp115 và Pro37 (**Hình 3.1**).

Tại vị trí 2, các điểm nóng thực nghiệm của IL-33 gồm Leu182, Glu165 và Tyr163 có mức đóng góp năng lượng tự do quan trọng nhất. Các acid amin khác của IL-33 thể hiện tiềm năng là điểm nóng bao gồm Ile119, Leu267, Lys180, Tyr122, Leu220 và Asn222. Trên ST2, các điểm nóng thực nghiệm Arg313, Leu246, Leu306 và Leu311 đều có mức đóng góp năng lượng tự do dưới $-2,0$ kcal/mol. Bên cạnh đó, các acid amin khác có mức đóng góp tương tự bao gồm Phe245, Leu308, Met118, His309 và Tyr116 (**Hình 3.1**).

3.2.2.3. Các điểm nóng trong PPI của IL-33/ST2 được phát hiện bởi phương pháp quét đột biến alanin

Sau quá trình quét alanin trên bề mặt tương tác của IL-33 và ST2, các acid amin điểm nóng gây ra $\Delta\Delta G > 0$ được dự đoán đồng thuận bởi các máy chủ DrugScorePPI, BUDE Alanine Scan, MutaBind2 và PIIMS được xếp hạng và minh họa tại **Hình 3.2**. Dựa trên kết quả đồng thuận từ 4 chương trình quét alanin, tất cả các điểm nóng thực nghiệm đã được phát hiện, ngoại trừ Asp244 của IL-33. Sự phân bố của các điểm nóng trên cấu trúc 3D của phức hợp IL-33/ST2 được trình bày tại **Hình PL10.1**, **PHỤ LỤC 10**. Độ chênh lệch năng lượng liên kết giữa IL-33 và ST2 khi quét alanin trên các điểm nóng này được trình bày chi tiết tại **Bảng PL10.1** và **Bảng PL10.2** tại **PHỤ LỤC 10**.



Hình 3.2. Kết quả đồng thuận từ quá trình quét alanin trên cấu trúc IL-33 và ST2 sử dụng các máy chủ DrugScore^{PPI}, BUDE Alanine Scan, MutaBind2 và PIIMS
(A) Các điểm nóng dự đoán trên IL-33. (B) Các điểm dự đoán trên ST2. Mũi tên chỉ vị trí của các acid amin điểm nóng thực nghiệm.

Sau khi quét đột biến điểm, quá trình quét cụm bởi BUDE Alanine Scan đã được thực hiện. Toàn bộ các cụm 3, 4 hoặc 5 điểm nóng đều được tìm thấy trên vị trí 1 của IL-33 (**Bảng PL10.3**, **PHỤ LỤC 10**). Ngược lại, trên ST2, phần lớn các cụm được

tìm thấy tại vị trí 2. Tuy nhiên, cũng có các cụm như Lys22-Arg35-Arg38-Gln39 được tìm thấy ở vị trí 1 của thụ thể (**Bảng PL10.4, PHỤ LỤC 10**).

Kết hợp các kết quả từ mô phỏng MD, phân rã năng lượng tự do gắn kết và quét đột biến alanin, các acid amin điểm nóng trong PPI giữa IL-33 và ST2 được đề xuất tại **Bảng 3.3**.

Bảng 3.3. Các acid amin điểm nóng trên hai bề mặt tương tác của IL-33 và ST2 được đề xuất dựa trên kết quả mô phỏng MD và quét đột biến alanin

Vị trí tương tác	Điểm nóng trên IL-33	Điểm nóng trên ST2
1	Tyr146, Asp149, Lys152, Glu144, Asp131, His246, Asn245, Glu148, Glu139	Lys22, Arg35, Pro37, Arg38, Asp115, Tyr119, Tyr132, Thr135, Arg198
2	Ile119, Tyr122, Tyr163, Glu165, Leu182, Leu220, Asn222, Leu267	Met118, Phe245, Leu250, Leu246, Leu306, Leu308, His309, Leu311, Arg313

■ Các acid amin điểm nóng của IL-33 đã được xác định bằng thực nghiệm. ■ Các acid amin của ST2 liên kết với acid amin điểm nóng thực nghiệm của IL-33.

3.2.3. Các vị trí gắn kết tiềm năng cho phối tử phân tử nhỏ trên IL-33 và ST2

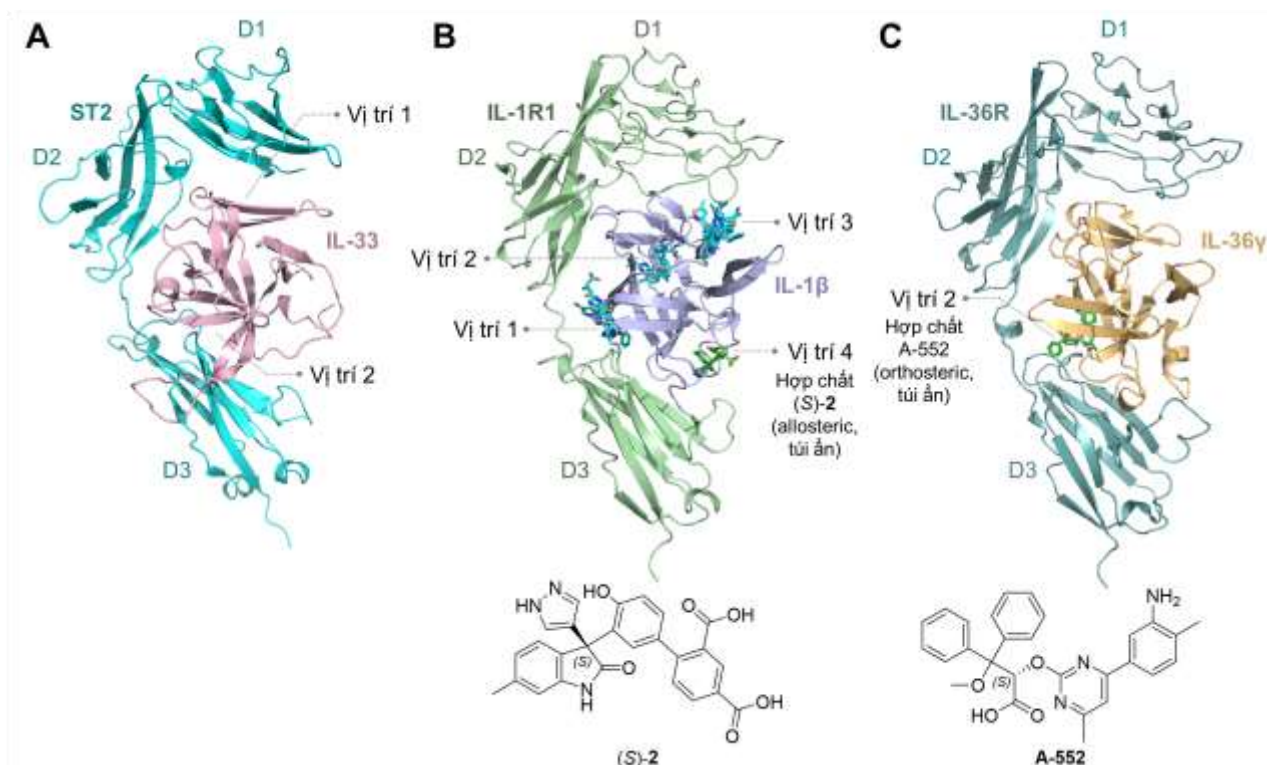
3.2.3.1. Đánh giá hiệu quả của các công cụ dự đoán vị trí gắn kết của phối tử phân tử nhỏ trên các interleukin họ IL-1

IL-1 là phân họ cytokin lớn nhất với 11 thành viên, trong đó có IL-33. Việc khảo sát vị trí gắn kết của phối tử phân tử nhỏ trên các IL thành viên của họ này cung cấp những kinh nghiệm hữu ích cho việc khám phá vị trí gắn kết phù hợp cho thuốc hóa được trên IL-33. Cho đến nay, IL-1 β và IL-36 γ là hai trường hợp có cấu trúc tinh thể ở dạng không có phối tử gắn kết (*apo*) và có phối tử gắn kết (*holo*) được lưu trữ tại PDB (**Bảng PL11.1, PHỤ LỤC 11**). Cụ thể, IL-1 β có 4 vị trí liên kết với phối tử phân tử nhỏ. Trong đó, vị trí 4 là một túi ẩn allosteric được mở ra bởi sự cảm ứng của chất ức chế 2. Tương tự, IL-36 γ cũng có chất ức chế A-552 gắn kết tại túi ẩn ở vị trí orthosteric của PPI (**Hình 3.3**).

Đầu tiên, các công cụ dự đoán vị trí gắn kết dựa trên cấu trúc tĩnh của protein được áp dụng trên IL-1 β và IL-36 γ và đối chiếu với thực nghiệm. Kết quả dự đoán được phân tích chi tiết tại **PHỤ LỤC 12** và **PHỤ LỤC 13** và được đúc kết như sau:

- (1) Các công cụ dự đoán hiệu quả trên dạng *holo* (khi túi ẩn đã mở sẵn) và kém chính xác trên dạng *apo*, dù đó là vị trí túi ẩn hay các túi có sẵn trên bề mặt protein.
- (2) Trên cấu trúc *holo*, Fpocket, DoGSite, SiteMap, VolSite, DeepSite và PocketMiner là những công cụ dự đoán chính xác hơn

(3) PocketMiner là công cụ dự đoán túi ẩn đơn giản nhưng hiệu quả, dù chỉ dựa trên cấu trúc tĩnh của protein.



Hình 3.3. Phức hợp của các cytokin họ IL-1 với thụ thể của chúng và sự minh họa của các vị trí gắn kết thực nghiệm của phối tử phân tử nhỏ trên các cytokin này
(A) IL-33 và thụ thể ST2 (PDB: 4KC3) chưa được xác định vị trí gắn kết thực nghiệm trên cả hai protein. (B) IL-1 β và thụ thể IL-1R1 (PDB: 4DEP), với sự hiện diện của các phối tử gắn kết tại 4 vị trí khác nhau trên IL-1 β . Trong đó, hợp chất 2 gắn kết tại một túi ẩn ở vị trí allosteric. (C) IL-36 γ (PDB: 4IZE) với mô hình homology của thụ thể IL-36R và sự hiện diện của phối tử A-552 gắn tại vị trí túi ẩn ở vị trí orthosteric.

Để đảm bảo tính linh hoạt hoàn toàn của protein trong quá trình xác định vị trí gắn kết, phương pháp mô phỏng CMD đã được áp dụng trên cấu trúc *apo* của IL-1 β và IL-36 γ , gồm quy trình MixMD và CrypticScout.

Mô phỏng MixMD dài 1 μ s được thực hiện cho mỗi protein với hỗn hợp đồng dung môi của 5 loại phân tử thăm dò BNZ, 1P3, IPA, ACN và NMA với nước (nồng độ 5%, v/v). Bản đồ điểm nóng và các vị trí gắn kết tiềm năng xác định bởi MixMD cho IL-1 β và IL-36 γ lần lượt được minh họa tại **Hình PL14.1** và **Hình PL14.2**, **PHỤ LỤC 14**. Trên IL-1 β , MixMD có thể ánh xạ thành công đến vị trí 1, 2 và 3 (xếp hạng 2, 6 và 3) và ánh xạ giới hạn đến vị trí 4 chứa túi ẩn. Trên IL-36 γ , vị trí túi ẩn của phối tử A-552 được ánh xạ tốt bởi các phân tử thăm dò (xếp hạng 3).

Mô phỏng CMD dài 400 ns với CrypticScout cũng được áp dụng trên hai protein, sử dụng đồng dung môi của BNZ và nước (nồng độ 0,2 M). Kết quả tại **Hình PL14.3**, **PHỤ LỤC 14** cho thấy vị trí của các phối tử thực nghiệm tại túi ẩn đều được ánh xạ

tốt. Xét theo năng lượng điểm nóng, vị trí gắn kết của chất ức chế **2** của IL-1 β và A-552 của IL-36 γ được xếp hạng lần lượt là 2 và 4. Xét theo điểm số điểm nóng và thời gian lưu giữ của phân tử BNZ, các túi ản này được xếp hạng lần lượt là 2 và 1.

Như vậy, mặc dù không tuyệt đối nhưng phương pháp “động” dựa trên nền tảng của mô phỏng CMD đã thể hiện tính hiệu quả cao hơn so với các phương pháp thông thường trong việc phát hiện các vị trí gắn kết trên cấu trúc apoprotein, đặc biệt là các túi ản và allosteric. Tất cả các công cụ dự đoán vị trí gắn kết đều có giá trị nhất định và sẽ được áp dụng đồng thời cho IL-33 và ST2, nhưng kết quả của mô phỏng CMD sẽ được ưu tiên trong đánh giá các vị trí gắn kết tiềm năng, đặc biệt là túi ản và vị trí allosteric.

3.2.3.2. *Xác định các vị trí gắn kết tiềm năng cho phối tử phân tử nhỏ trên IL-33*

Trong đề tài này, các phương pháp tính toán được áp dụng trên cấu trúc của IL-33 nhằm hai mục tiêu chính: (i) phát hiện các túi gắn kết tại hai vị trí orthosteric của PPI giữa IL-33 với thụ thể và đánh giá khả năng làm thuốc phân tử nhỏ của chúng, (ii) phát hiện các túi gắn kết khác (nếu có) bên ngoài vị trí PPI.

Các vị trí gắn kết được xác định bằng các phương pháp dựa trên cấu trúc “tĩnh”

Bảng 3.4. Các túi gắn kết được phát hiện và xếp hạng bởi các công cụ tính toán dựa trên cấu trúc tĩnh tại vị trí PPI của IL-33/ST2

Phần mềm	Xếp hạng của các túi gắn kết tại vị trí PPI trên cấu trúc IL-33		Xếp hạng của các túi gắn kết tại vị trí PPI trên cấu trúc ST2	
	Vị trí 1	Vị trí 2	Vị trí 1	Vị trí 2
MOE Site Finder	6, 8	1	1, 7	21, 23
Fpocket	8	7, 9	2, 4, 10, 11, 14	16
DoGSiteScorer	3, 5, 6	1	1*	2
DoGSite3	4	0	1	0
SiteMap	3	0	2	0
AutoSite	5, 6, 8	3	1, 12	0
FTSite	1	3	1	0
VolSite	0	2	1	3
P2Rank	0	2	2	0
DeepSite	0	1	1*	0
PocketMiner	2	1	1	0

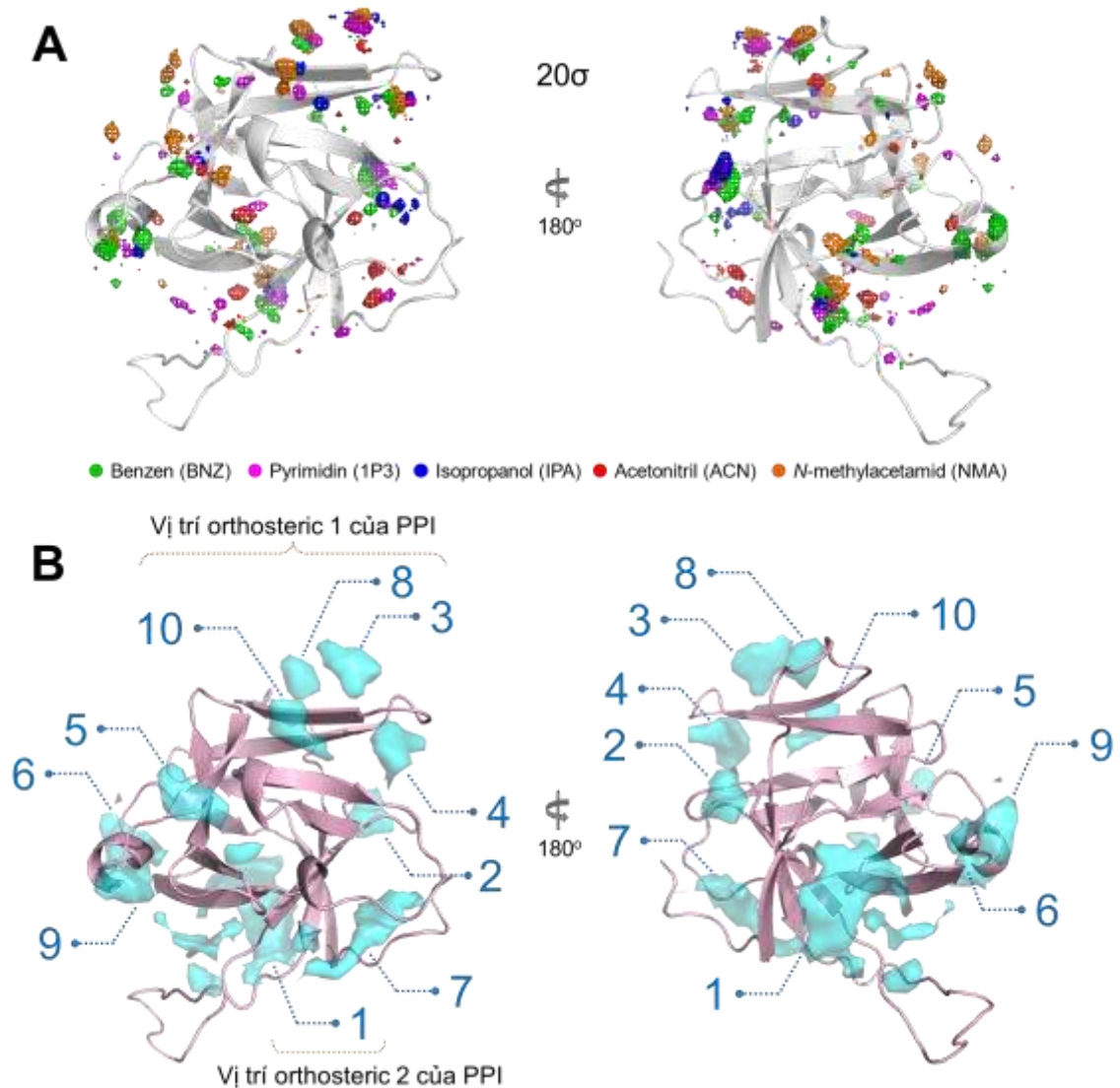
* Các xếp hạng có sự chia sẻ với vị trí allosteric của ST2.

Do vẫn có những ưu điểm nhất định, đặc biệt là về chi phí tính toán, các phương pháp dựa trên cấu trúc tĩnh được áp dụng đầu tiên trên cấu trúc tĩnh thể của IL-33 (PDB: 4KC3). Sự xếp hạng của hai vị trí orthosteric 1 và 2 của IL-33 bởi các phần mềm được trình bày tại **Bảng 3.4**. Toàn bộ các túi gắn kết dự đoán cùng các thông tin bổ sung được trình bày chi tiết tại **Hình PL15.1, PHỤ LỤC 15**. Vị trí 1 của IL-

33 được dự đoán là tập hợp của nhiều túi nhỏ và được xếp hạng không đồng nhất bởi các phần mềm. Trong khi đó, vị trí 2 được dự đoán như một túi duy nhất và xếp hạng cao hơn. Xét trên toàn bộ một giao diện PPI, kết quả tại **Bảng 3.4** gợi ý vị trí 2 có tiềm năng cho phối tử gắn kết hơn so với vị trí 1.

Các vị trí gắn kết xác định bằng phương pháp “động” sử dụng mô phỏng CMD

Mô phỏng MixMD dài 1 μ s đã được áp dụng trên cấu trúc *apo* của IL-33 và bản đồ chiếm giữ của 5 loại phân tử thăm dò ở $z = 20\sigma$ được thể hiện ở **Hình 3.4A** và 10 vị trí có xếp hạng cao nhất được minh họa ở **Hình 3.4B**.



Hình 3.4. Các vị trí gắn kết tiềm năng trên IL-33 được xác định bởi mô phỏng MixMD (A) Bản đồ chiếm giữ của 5 loại phân tử thăm dò được xác định bởi MixMD. (B) Các vị trí gắn kết (bề mặt màu xanh lơ) được phân cụm và xếp hạng bởi MixMD Probeview.

Cả hai vị trí orthosteric PPI giữa IL-33 và ST2 đều thu hút sự tương tác của các phân tử thăm dò. Vị trí 1 được nhận diện với 3 túi con riêng biệt (xếp hạng 3, 8 và

10). Kết quả này ủng hộ dự đoán của các phần mềm trước và gợi ý rằng, để tác động vào vị trí 1, không nên sử dụng toàn bộ bề mặt giao diện PPI mà sự tập trung vào một túi gắn kết tiềm năng có thể cho hiệu quả gắn kết phối tử tốt hơn. Ngược lại, vị trí orthosteric 2 được MixMD ánh xạ một khoang gắn kết duy nhất và được xếp hạng cao nhất, gợi ý khả năng gắn kết với phối tử cao hơn. **Hình 3.4A** cho thấy vị trí này được chiếm giữ bởi nhiều loại phân tử thăm dò khác nhau với tần suất cao. Một cách đồng thuận, vị trí 2 của IL-33 cũng được xếp hạng cao nhất trong mô phỏng CMD với máy chủ CrypticScout (**Hình PL15.2, PHỤ LỤC 15**).

Như các phân tích trước về PPI giữa hai protein, IL-33 đóng vai trò là protein nhận liên kết hydro từ ST2, và điều này được phản ánh bởi sự ánh xạ tốt của phân tử NMA trên cả 2 vị trí tương tác. Bên cạnh đó, BNZ và 1P3 đã ánh xạ vị trí của các acid amin chứa vòng thơm tại vị trí 1. Sự tập trung các phân tử thăm dò kể trên xung quanh các acid amin Tyr129, Asn130, Glu139, Tyr146, Asp149 và Leu150 của IL-33, phản ánh tương tác của chúng với các acid amin Tyr132, Phe20, Pro37 và Tyr119 trên thụ thể ST2. Điều này còn được thấy rõ hơn tại vị trí 2, với sự ánh xạ của các phân tử thăm dò đến Tyr163, Leu182, Val228 và Leu267 của IL-33, đại diện cho sự tương tác của chúng với Leu246, Leu306, Leu308 và Phe245 trên ST2.

Đặc biệt, tại cả 2 vị trí orthosteric, các túi gắn kết xác lập bởi MixMD có xu hướng chôn vùi một phần vào cấu trúc tinh thể của IL-33, được giải thích bởi sự thâm nhập của các phân tử thăm dò có tính thơm và kỵ nước như BNZ và 1P3. Kết quả hiện tại gợi ý tiềm năng các phân tử nhỏ chứa các nhóm vòng thơm có thể gây nên sự cảm ứng tương tự để tăng cường ái lực gắn kết với IL-33. Với các tương tác phân cực, bản đồ chiếm giữ của các phân tử thăm dò ánh xạ mạnh nhất với các acid amin điểm nóng Lys22, Arg35, Gln39 và Arg38 của ST2 tại vị trí 1.

Ngoài hai vị trí PPI với ST2 đã được ánh xạ, mô phỏng MixMD còn giúp phát hiện một số túi gắn kết mới trên IL-33. Các khoang được MixMD xếp hạng 2 và 4 trên IL-33 tương đương vị trí 2 của IL-1 β , nơi protein này liên kết và bị trung hòa bởi kháng thể đơn dòng canakinumab. Vị trí 2 của IL-1 β có thể gắn kết với các mảnh cấu trúc, gợi ý một khả năng tương tự cho IL-33. Xếp hạng 5 là một khoang không tồn tại rõ rệt trên cấu trúc tinh thể của IL-33, được ánh xạ bởi bốn loại phân tử thăm dò gồm BNZ, 1P3, NMA và IPA. Trên cấu trúc tinh thể, vị trí này gần như một mặt phẳng. Sự tương tác của His201, Val238, Leu249 và Lys251 với các phân tử thăm dò và sau đó là sự chuyển động của các chuỗi bên tương ứng đã góp phần mở ra túi gắn kết này. Tương tự, sự ánh xạ của MixMD tại vị trí được xếp hạng 6 gợi ý một túi gắn kết tiềm năng tương tự được định hình bởi các vòng β 8- β 9 và β 11- β 12. BNZ đã lưu giữ một cách mạnh mẽ tại vị trí này, cảm ứng và mở ra một túi gắn kết sâu hơn vào

bên trong so với cấu trúc tinh thể. Gần đó, một vị trí được xếp hạng 9 định vị ngay trên vòng $\beta 11$ - $\beta 12$ với sự ánh xạ của BNZ, 1P3, IPA và NMA.

Đáng chú ý, một khoang gắn kết xếp hạng 7 được phát hiện ở gần đầu N và vòng $\beta 8$ - $\beta 9$ của IL-33. Khoang này được ánh xạ bởi 1P3 và ACN, nếu kết hợp một vùng kế cận được ánh xạ bởi BNZ và 1P3 có thể tạo nên một túi gắn kết tương đồng cao với vị trí túi ẩn của phối tử 2 trên IL-1 β . MixMD không mở được một túi ẩn như vậy trên IL-33 chỉ với các phân tử thăm dò kích thước nhỏ, như kết quả trên chính IL-1 β đã được trình bày ở phần trước. Dù vậy, kết quả hiện tại có thể ủng hộ cho một túi ẩn với sự cảm ứng của một phối tử thích hợp.

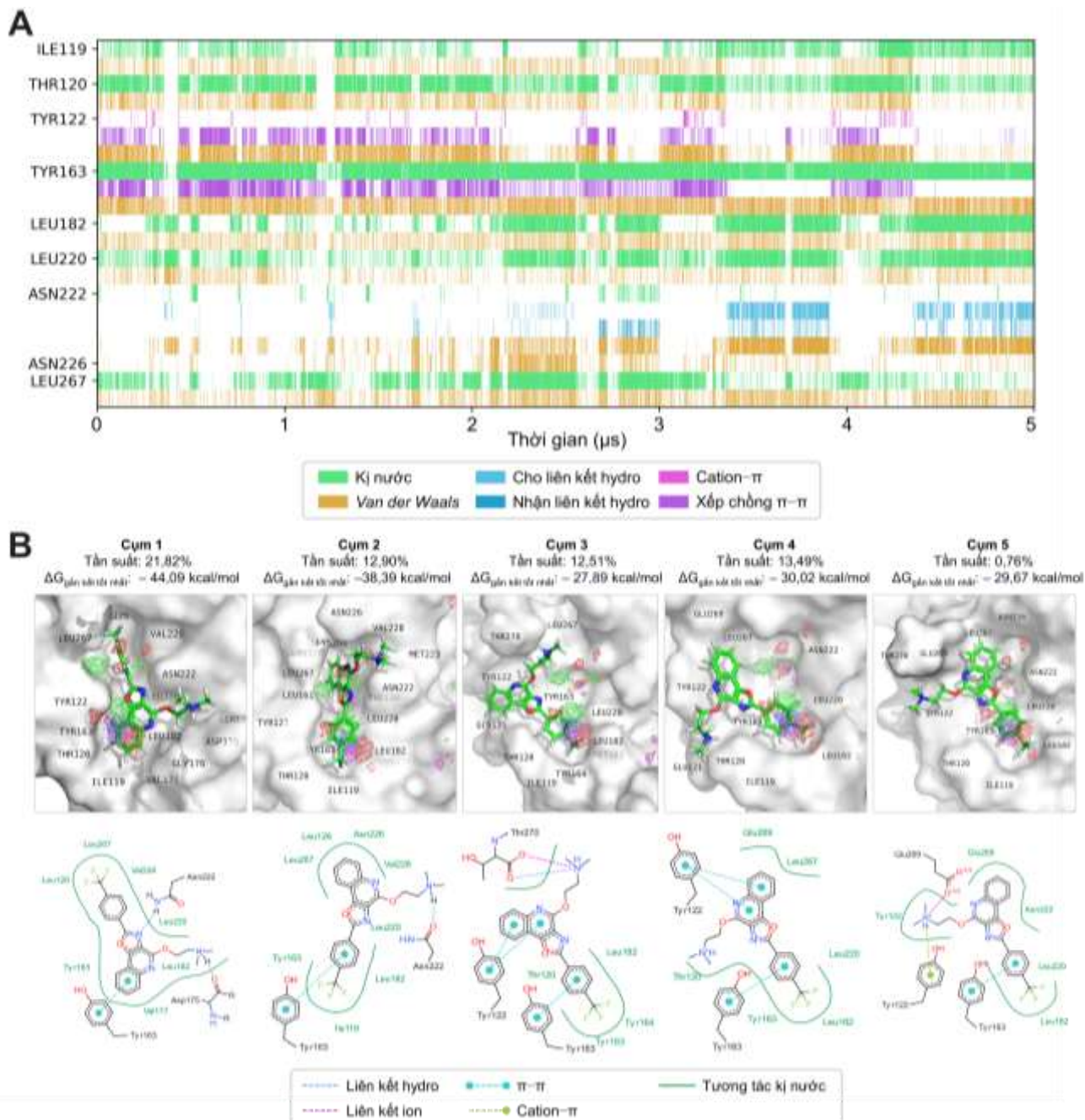
Tất cả các túi gắn kết bên ngoài 2 vị trí orthosteric của PPI IL-33/ST2 được khảo sát bằng phương pháp NoMA với sự có mặt của phối tử giả bất diện. Tuy nhiên, các phân tích hiện tại không cho thấy sự thay đổi có ý nghĩa thống kê giữa dao động của cấu trúc *apo* và *holo* của IL-33 để ủng hộ cho tính chất allosteric.

Túi ẩn trên IL-33 được xác định qua mô phỏng MD thời gian dài

Hợp chất **7c** đã được chứng minh sự gắn kết với IL-33 qua phổ NMR và tác động ức chế hiệu lực của cytokin này trên dòng tế bào HMC-1. Nhằm đề xuất một mô hình gắn kết protein–phối tử giữa IL-33 và **7c**, cũng như để khẳng định thêm vị trí 2 (được xếp hạng 1 bởi MixMD) là một túi gắn kết quan trọng trên IL-33, mô phỏng MD dài 5 μ s (gồm 5 quỹ đạo độc lập 1 μ s) đã được thực hiện cho phức hợp này. Cấu trúc bắt đầu cho quá trình MD là phức hợp gắn kết phân tử giữa IL-33 và **7c**.

Kết quả cho thấy **7c** duy trì sự định vị trong vị trí này trong quá trình mô phỏng, mặc dù có sự thay đổi nhất định về tư thế. Phân tích dấu vân tay tương tác cho thấy **7c** tương tác một cách mạnh mẽ với Tyr163, là một điểm nóng quan trọng trong PPI IL-33/ST2 (**Hình 3.5A**). Ngoài ra, khả năng tương tác của protein với **7c** còn được gia tăng bởi tương tác kỵ nước của Ile119, Thr120, Leu182, Leu220 và Leu267. Phối tử **7c** cũng tạo một số liên kết hydro quan trọng với Asn222 và tương tác π -cation với Tyr122. Quỹ đạo mô phỏng thời gian dài đã tạo ra nhiều cấu dạng liên kết khác nhau của **7c**. Các cấu dạng được phân cụm bằng thuật toán QT với ngưỡng RMSD = 3 Å và 5 cụm phổ biến nhất được minh họa tại **Hình 3.5B**. Trong đó, cụm 1 và cụm 2 chiếm tần suất phổ biến nhất (21,82 và 12,90%). Cấu dạng đại diện cho 2 cụm này có $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$ tốt nhất (−44,09 và −38,39 kcal/mol). Mặc dù chưa đạt được sự hội tụ và các nghiên cứu sâu hơn cần được thực hiện, trong nghiên cứu hiện tại, cụm 1 được đề xuất là cấu dạng gắn kết phù hợp của IL-33 và **7c**. Kết quả này cũng góp phần chứng minh vị trí 2 của IL-33 là một khoang phù hợp cho phân tử nhỏ gắn kết với ái lực cao. Đồng thời, khi quan sát túi gắn kết được hình thành giữa **7c** và IL-33

ở **Hình 3.5B**, đây cũng là một vị trí có thể được cảm ứng để tạo một túi ẩn vốn không thể quan sát thấy trong cấu trúc tinh thể của IL-33.



Hình 3.5. Kết quả mô phỏng MD thời gian dài 5 μs cho phức hợp IL-33 và hợp chất **7c** (A) Biểu đồ nhiệt minh họa sự tương tác giữa phối tử **7c** và IL-33 theo thời gian. (B) Năm cụm cấu dạng gắn kết phổ biến nhất được trích xuất từ quỹ đạo trong mô phỏng MD.

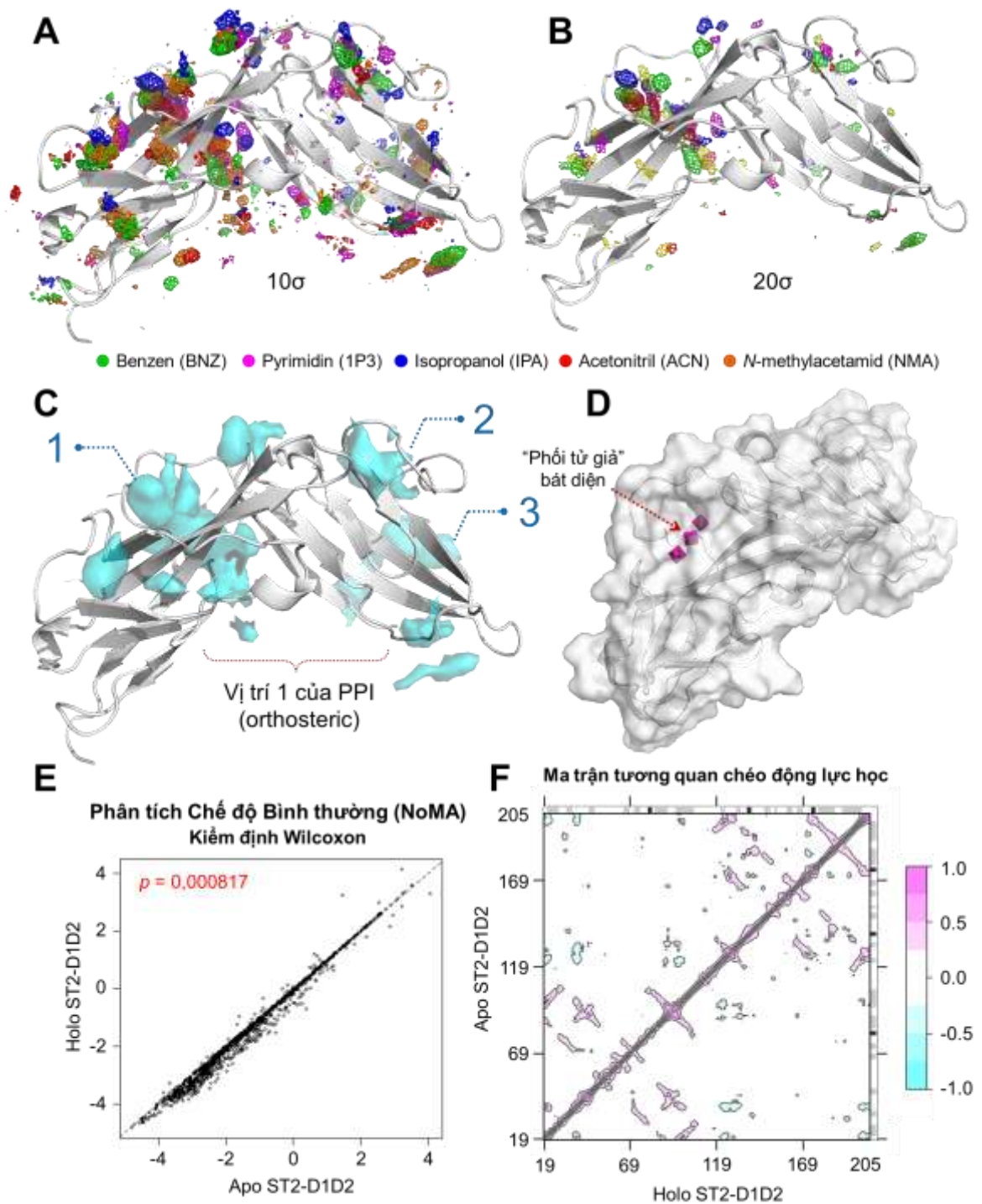
3.2.3.3. Xác định các vị trí gắn kết tiềm năng cho phối tử phân tử nhỏ trên ST2

Các phương pháp dự đoán vị trí gắn kết dựa trên cấu trúc tĩnh đã được áp dụng trên thụ thể ST2 (PDB: 4KC3). Kết quả được trình bày tại **Bảng 3.4** và các hình bổ sung tại **Hình PL16.1**, **PHỤ LỤC 16** cho thấy không có túi gắn kết nào được phát

hiện tại vị trí 2 của PPI, tức miền D3 của thụ thể ST2. Khác với IL-33, vị trí 1 của PPI trên ST2 được dự đoán là một khoang gắn kết phù hợp hơn cho phối tử phân tử nhỏ với sự đồng thuận cao từ các phần mềm. Do đó, vị trí orthosteric này có triển vọng để phát triển chất ức chế ST2.

Mô phỏng MixMD với tổng thời gian 1 μ s đã được thực hiện trên miền D1D2 từ cấu trúc tinh thể của ST2. Bản đồ chiếm giữ của các phân tử thăm dò tại $z = 10\sigma$ vẫn ảnh hưởng đến vị trí orthosteric 1 của PPI (**Hình 3.6A**), góp phần củng cố tiềm năng của vị trí này, dù tín hiệu giảm ở $z = 20\sigma$ (**Hình 3.6B**). Tuy nhiên, một vị trí gắn kết hoàn toàn mới trên ST2 đã được phát hiện bởi MixMD, với sự chiếm giữ mạnh mẽ của các phân tử thăm dò. Vị trí này được xếp hạng 1 (**Hình 3.6C**) và thể hiện đầy đủ các tiêu chí của một túi gắn kết phù hợp cho việc phát triển thuốc phân tử nhỏ: có hình dạng của một túi, được chiếm giữ bởi cả 5 loại phân tử thăm dò trong phần lớn thời gian mô phỏng CMD và có thể tích trung bình khoảng 1079 Å³ (**Hình PL16.2, PHỤ LỤC 16**). Các acid amin nằm trong túi gắn kết gồm Trp25–Leu32, Thr103, Tyr105–Leu117, Glu146–Ala153, Asp178, Thr180–Phe183, Tyr192–Thr197 (**Hình PL16.3, PHỤ LỤC 16**).

Do nằm ở một vị trí bên ngoài so với bề mặt PPI, vị trí này được giả thuyết là allosteric và NoMA được thực hiện để góp phần khẳng định. **Hình 3.6D–F** cho thấy sự có mặt của các phối tử giả tại vị trí này làm thay đổi sự dao động của ST2 giữa dạng *holo* và *apo* có ý nghĩa thống kê trong kiểm định Wilcoxon ($p = 0,000817$) và phân tích ma trận tương quan chéo động lực học (DCCM), gợi ý đây là một túi allosteric tiềm năng. NoMA cũng được thực hiện trên tất cả các vị trí khác được nhận diện bởi MixMD nhưng không có một vị trí nào cho kết quả tương tự. Từ những dự đoán trên, vị trí 1 của PPI IL-33/ST2 và vị trí allosteric trên miền D1D2 được đề xuất là hai vị trí tiềm năng để phát triển các chất ức chế phân tử nhỏ.



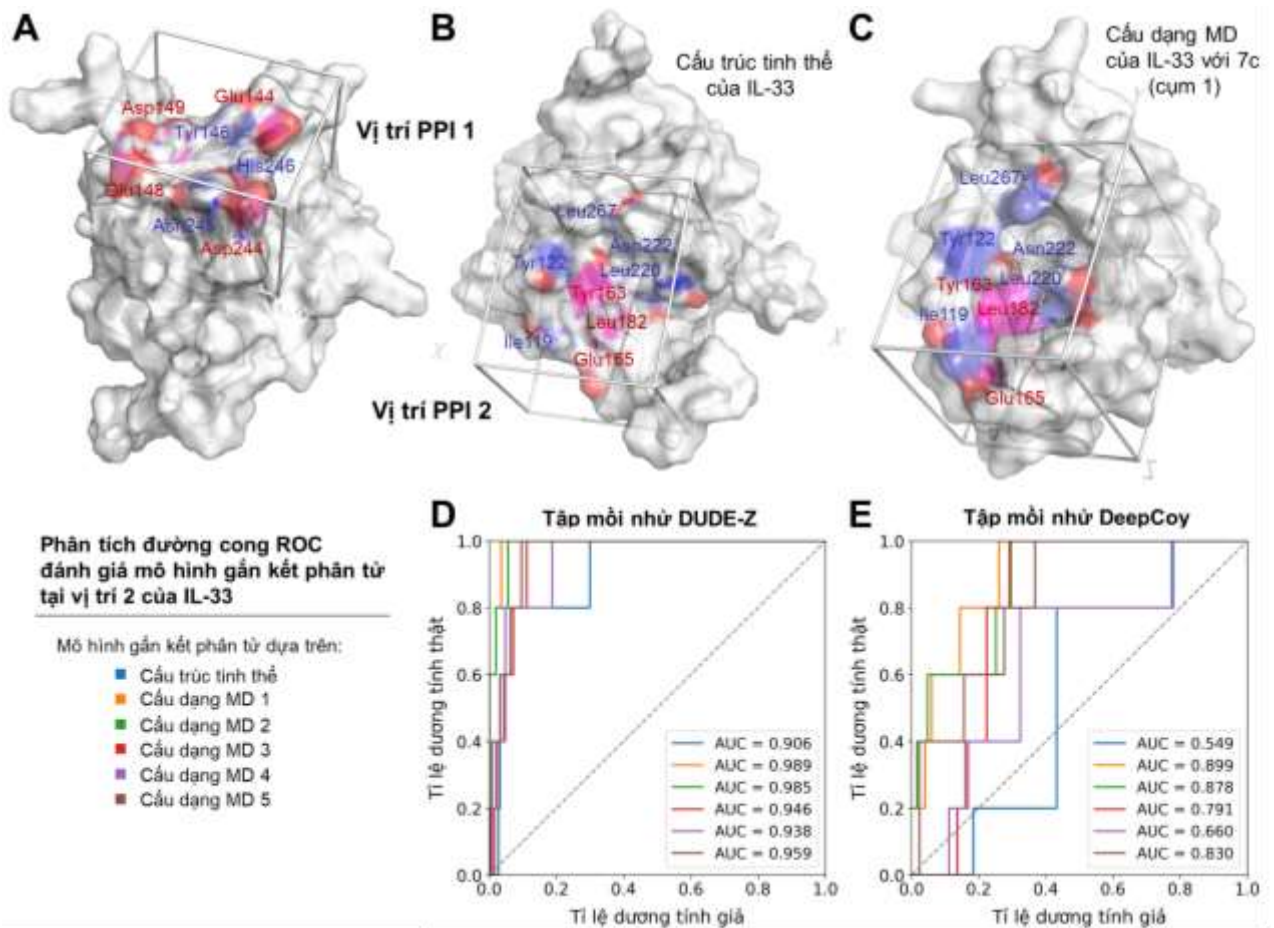
Hình 3.6. Xác định vị trí gắn kết trên thụ thể ST2 với mô phỏng MixMD và NoMA (A) và (B) Bản đồ chiếm giữ của các phân tử thăm dò trong mô phỏng MixMD ở σ bằng 10 và 20. (C) Sự xếp hạng các vị trí gắn kết trên miền D1D2 của ST2 bởi MixMD Probeview. (D) Các “phối tử giả” bất diện được đặt tại túi được xếp hạng 1 để chuẩn bị cho Phân tích Chế độ Bình thường (NoMA). (E và F) Biểu đồ kiểm định Wilcoxon và ma trận tương quan chéo động lực học (DCCM) để so sánh sự dao động của ST2 ở dạng không có (*apo*) và có (*holo*) phối tử giả trong NoMA.

3.3. Mô hình sàng lọc *in silico* dựa trên cấu trúc mục tiêu IL-33 và ST2

3.3.1. Mô hình gắn kết phân tử cho IL-33 và ST2

3.3.1.1. Mô hình gắn kết phân tử dựa trên các vị trí gắn kết của IL-33

Hai vị trí gắn kết tiềm năng trên IL-33, cũng là hai vị trí tại giao diện tương tác PPI, được sử dụng để xây dựng mô hình gắn kết phân tử. Dựa trên các acid amin điểm nóng đã xác định và kết quả từ các dự đoán về vị trí gắn kết, hai mô hình được xây dựng và minh họa tại **Hình 3.7**. Tại vị trí 1, hộp lưới có tọa độ tâm (45,782; -27,413; 16,362) và kích thước (20×15×22 Å³). Tại vị trí 2, hộp lưới có tọa độ tâm (45,879; -52,344; 11,740) và kích thước (22×26×22 Å³). Cả hai mô hình tại **Hình 3.7A** và **B** đều sử dụng cấu trúc tinh thể của IL-33 (PDB: 4KC3).



Hình 3.7. Mô hình gắn kết phân tử cho IL-33 tại hai vị trí của PPI với thụ thể ST2 (A và B) Hai mô hình gắn kết phân tử tại mỗi vị trí PPI được xây dựng dựa trên cấu trúc tinh thể của IL-33 (PDB: 4KC3). Các acid amin điểm nóng thực nghiệm được đánh dấu màu đỏ, các điểm nóng được phát hiện bổ sung bằng phương pháp *in silico* được đánh dấu màu xanh dương. (C) Mô hình gắn kết phân tử của IL-33 được xây dựng dựa trên cấu dạng phổ biến nhất trong các mô phỏng MD của IL-33 và chất ức chế **7c**, với sự hiện diện của túi ẩn. (D và E) Đường cong ROC đánh giá năng lực sàng lọc của các mô hình gắn kết phân tử của IL-33 tại vị trí 2 (1 mô hình dựa trên cấu trúc tinh thể, 5 mô hình dựa trên cấu dạng mô phỏng MD), sử dụng tập hoạt tính và tập mẫu như DUDE-Z và DeepCoy.

Mô hình gắn kết phân tử dựa trên cấu trúc tinh thể của IL-33 tại vị trí 2 (**Hình 3.7B**) được xác thực bằng cách sàng lọc trên tập hợp các chất gắn kết đã biết (**Bảng PL2.1, PHỤ LỤC 2**) và các hợp chất mới như được tạo bằng công cụ DUDE-Z. Sau quá trình sàng lọc, đường cong ROC được phân tích và giá trị AUC, $\overline{TG}$ và $EF_{1\%}$ thu được lần lượt là 0,906; 0,521 và 0 (**Hình 3.7D**).

Dựa vào kết quả phân cụm của các quỹ đạo mô phỏng MD 5 μs trên phức hợp IL-33 và chất ức chế **7c**, cấu dạng tốt nhất của 5 cụm phổ biến nhất (**Hình 3.5B**) được trích xuất để xây dựng mô hình gắn kết phân tử. Kết quả phân tích đường cong ROC cho thấy cấu dạng đại diện cho cụm phổ biến nhất trong mô phỏng MD (cấu dạng MD 1, **Hình 3.7C**) đã giúp làm tăng hiệu năng sàng lọc của mô hình, với ROC-AUC, $\overline{TG}$ và $EF_{1\%}$ lần lượt là 0,989; 0,883 và 51 (**Hình 3.7D**).

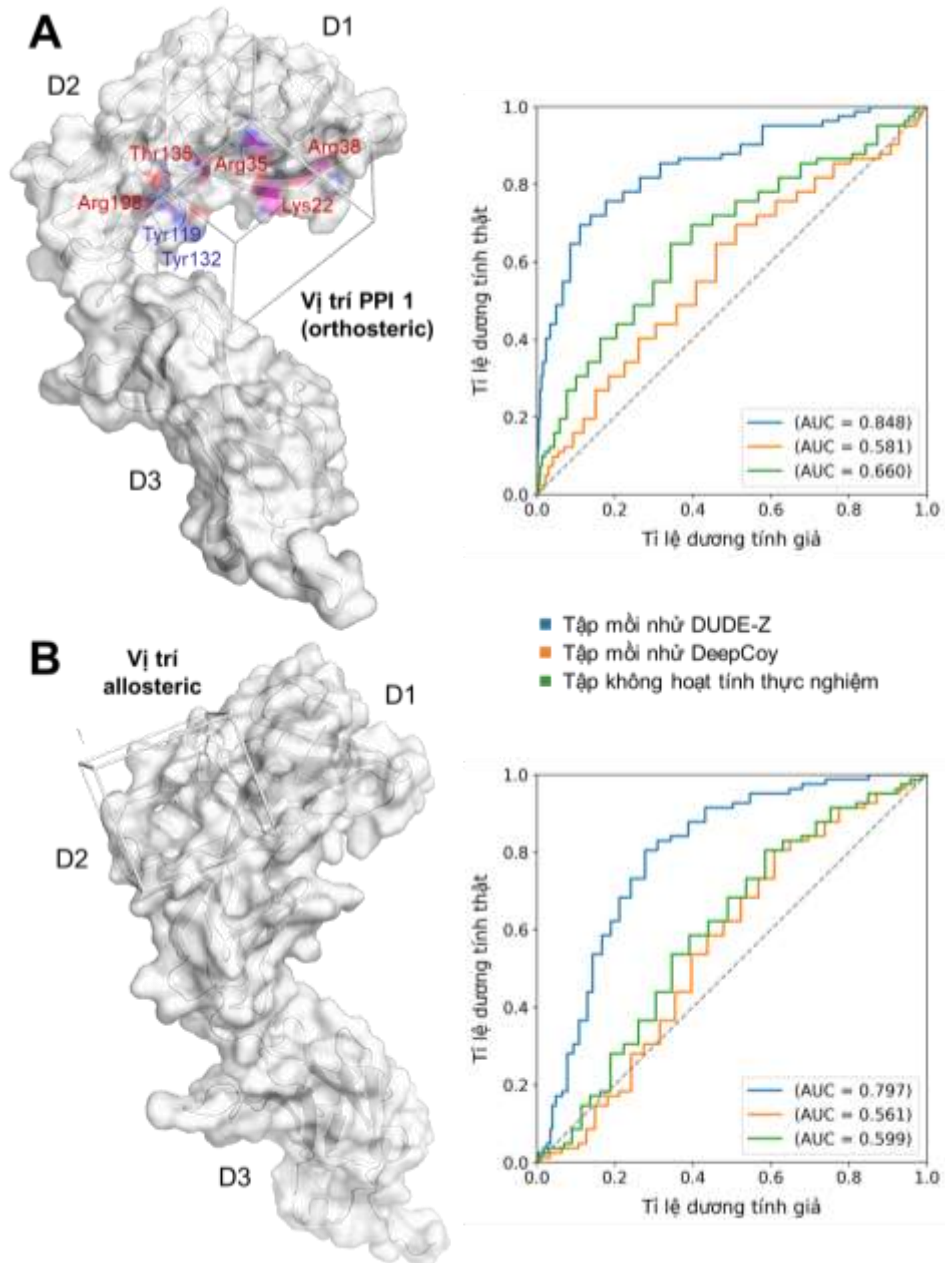
Để đánh giá mô hình chặt chẽ hơn, một tập chất mới như có “độ khó” cao hơn được tạo ra bằng DeepCoy với mục tiêu sao cho hợp chất mới như có tính chất lý hóa khớp với các chất hoạt tính. Kết quả đánh giá các mô hình được thể hiện ở **Hình 3.7E** cho thấy cấu dạng MD 1 vẫn cho kết quả tốt nhất, với ROC-AUC, $\overline{TG}$ và $EF_{1\%}$ lần lượt là 0,899; 0,615 và 17. Trong khi đó, mô hình dựa trên cấu trúc tinh thể chỉ đạt ROC-AUC = 0,549; $\overline{TG}$ = 0,101 và $EF_{1\%}$ = 0.

3.3.1.2. Mô hình gắn kết phân tử dựa trên các vị trí gắn kết của thụ thể ST2

Trên ST2, các mô hình gắn kết phân tử được xây dựng dựa trên cấu trúc tinh thể của thụ thể (PDB: 4KC3). Hai mô hình đã được xây dựng cho khoang orthosteric tại vị trí 1 (**Hình 3.8A**) và túi allosteric (**Hình 3.8B**). Cả hai vị trí gắn kết cùng nằm trên miền D1D2 của thụ thể ST2. Tại vị trí orthosteric, dựa trên các phân tích về acid amin điểm nóng, hộp lưới cho mô phỏng gắn kết được thiết lập với tọa độ tâm (47,012; -21,987; 11,093) và kích thước (26×24×32 Å³). Tại vị trí allosteric, dựa trên dự đoán của MixMD, hộp lưới có với tọa độ tâm (45,782; -27,413; 18,534) và kích thước (24×18×20 Å³). Khoảng cách giữa các điểm lưới trong hai mô hình là 1 Å.

Hiện nay, một số hợp chất gắn kết với ST2 đã được báo cáo (**Bảng PL2.2, PHỤ LỤC 2**). Tuy nhiên, vị trí gắn kết của các chất này vẫn chưa được xác định bằng thực nghiệm và chúng có thể gắn kết trên vị trí orthosteric hoặc allosteric của ST2. Để xác thực mô hình gắn kết phân tử, đồng thời góp phần xác định vị trí gắn kết của các phối tử phân tử nhỏ trên ST2, tập hợp các chất có hoạt tính từ thực nghiệm được sàng lọc qua cả hai mô hình gắn kết. Tập hợp này gồm 82 hợp chất được xác nhận tác động ức chế PPI giữa IL-33/ST2 qua thử nghiệm AlphaLISA và ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên tế bào HEK-Blue IL-33 (**Bảng PL2.2**). Từ 82 chất hoạt tính, các tập chất mới như được tạo bằng công cụ DUDE-Z và DeepCoy. Đặc biệt, hiện nay có 53.531 hợp

chất không hoạt tính trên ST2 đã được báo cáo và lưu trữ tại PubChem BioAssay (mã số 1259354). Từ dữ liệu này, 4100 hợp chất đã được lấy mẫu sao cho có tính chất lý hóa khớp với các chất có hoạt tính bằng công cụ DecoyFinder. Các tập chất này được sàng lọc qua 2 mô hình gắn kết phân tử đã xây dựng để đánh giá sự phù hợp của mỗi mô hình với bộ dữ liệu.



Hình 3.8. Các mô hình mô phỏng gắn kết phân tử trên ST2

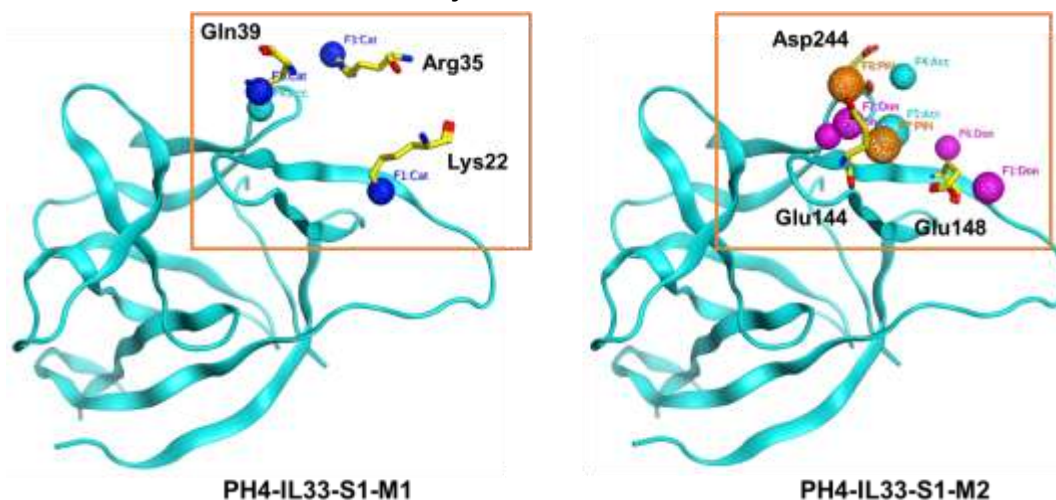
(A) Mô hình gắn kết phân tử trên khoang orthosteric của ST2 tại vị trí 1 ở bề mặt PPI, cùng với đánh giá ROC trên ba bộ dữ liệu chứa các hợp chất có hoạt tính và (i) các mẫu như được tạo bằng DUDE-Z, (ii) các mẫu như được tạo bằng DeepCoy, (iii) các hợp chất không có hoạt tính được xác định từ thực nghiệm. (B) Mô hình gắn kết phân tử cho túi allosteric của ST2, với đánh giá ROC trên các bộ dữ liệu tương tự.

Phân tích đường cong ROC tại **Hình 3.8A** cho thấy mô hình gắn kết phân tử tại vị trí orthosteric cho khả năng phân biệt các chất có hoạt tính và các chất nhiễu như DUDE-Z, DeepCoy lẫn các chất không có hoạt tính thực nghiệm, với ROC-AUC lần lượt là 0,848; 0,581 và 0,660; $\overline{TG}$ lần lượt là 0,575; 0,131 và 0,255; $EF_{1\%}$ lần lượt là 12,401; 1,214 và 4,856. Các kết quả này tốt hơn so với mô hình gắn kết phân tử ở túi allosteric (**Hình 3.8B**) và gợi ý rằng các chất có hoạt tính đã được báo cáo có ưu thế gắn kết với ST2 tại vị trí orthosteric. Ở hướng ngược lại, phân tích đường cong ROC góp phần chứng minh năng lực sàng lọc của mô hình được xây dựng tại khoang orthosteric. Trong khi đó, túi allosteric là một vị trí mới và mô hình gắn kết phân tử tại vị trí này có thể được sử dụng để sàng lọc các hợp chất ức chế ST2 theo một cơ chế mới.

3.3.2. Sàng lọc chất gắn kết với IL-33 và ST2 tại vị trí 1 của giao diện PPI bằng phương pháp pharmacophore

3.3.2.1. Sàng lọc với mô hình pharmacophore cho IL-33 tại vị trí 1

Dựa trên báo cáo về PPI giữa IL-33/ST2 của Liu và cộng sự tại vị trí 1 (**Hình 3.9A**), hai mô hình pharmacophore cho chất ức chế IL-33 được tạo ra dựa trên đặc tính của các acid amin tại bề mặt này.

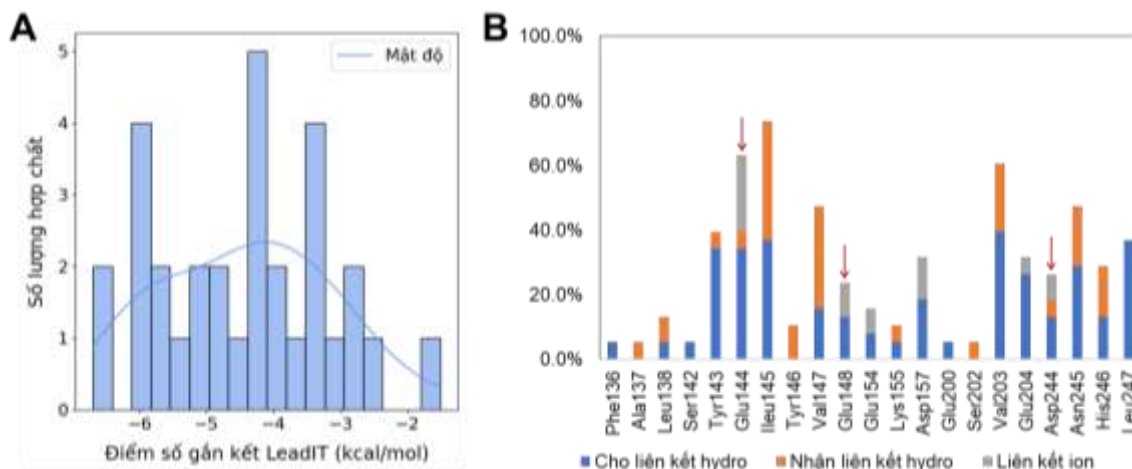


Hình 3.9. Các mô hình pharmacophore cho chất gắn kết IL-33 tại vị trí 1
(A) Mô hình PH4-IL33-S1-M1 được xây dựng bằng cách bắt chước các acid amin điểm nóng trên ST2. (B) Mô hình PH4-IL33-S1-M2 được xây dựng dựa trên các acid amin trên bề mặt tương tác của chính IL-33.

Đầu tiên, các điểm pharmacophore được đặt trên các nguyên tử tham gia tương tác của Gln39, Lys22 và Arg35 của ST2 nhằm bắt chước các liên kết ion và hydro giữa chúng với các acid amin điểm nóng Glu144, Glu148 và Asp244 trên IL-33. Mô hình pharmacophore thu được ban đầu được ký hiệu là PH4-IL33-S1-M1 (**Hình 3.9B**) chứa 4 điểm, trong đó các điểm F1, F2 và F3 mang đặc tính cation (Cat), điểm

F4 mang đặc tính nhận liên kết hydro (Acc). Bên cạnh đó, mô hình thứ hai dựa trên đặc tính của khoang gắn kết được xây dựng với sự gợi ý của công cụ MOE Pharmacophore Editor. Mô hình PH4-IL33-S1-M2 chứa 3 điểm bắt buộc (F1, F2, F3) có thuộc tính *Don* đại diện cho khả năng cho liên kết hydro của các acid amin Glu144, Glu148 và Asp244, và các điểm F4:Acceptor, F5:Acceptor, F6:Donor cùng F7: *PiN*, F8: *PiN* được ràng buộc thỏa mãn “ít nhất một” (**Hình 3.9C**). Do chưa có nghiên cứu thực nghiệm nào công bố các hợp chất phân tử nhỏ gắn kết với IL-33 tại vị trí 1 của PPI nên các mô hình pharmacophore PH4-IL33-S1-M1 và M2 không được đánh giá và là các mô hình hướng tới mục tiêu thiết kế thuốc *de novo*.

Hai mô hình pharmacophore được sử dụng để sàng lọc qua thư viện DrugBank và Maybridge, thu được 24 chất thỏa mô hình PH4-IL33-S1-M1 và 37 chất thỏa mô hình PH4-IL33-S1-M2. Các chất thỏa mãn mô hình được tiếp tục sàng lọc qua mô hình gắn kết phân tử bằng phần mềm LeadIT, thu được 31 chất gắn kết thành công vào vị trí 1 của IL-33 với điểm số gắn kết từ $-28,0$ đến $-6,3$ kJ/mol (tương đương $-6,7$ đến $-1,5$ kcal/mol) (**Hình 3.10A**). Dấu vân tay tương tác giữa các phối tử với IL-33 được phân tích bằng công cụ MOE PLIF cho kết quả như **Hình 3.10B**, cho thấy một số hợp chất có thể tương tác với các acid amin điểm nóng Glu144, Glu148 và Asp244 bằng liên kết hydro và ion.



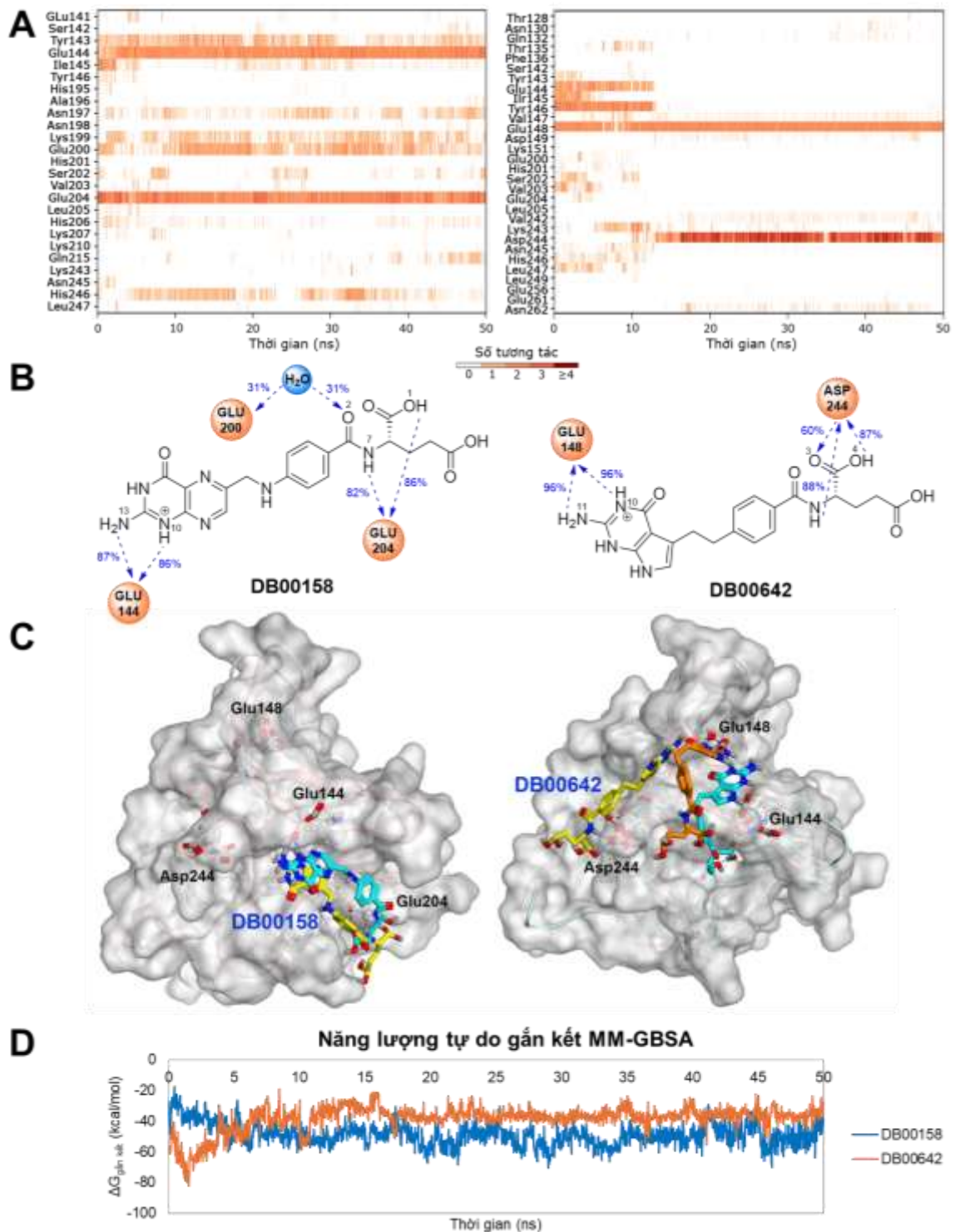
Hình 3.10. Kết quả mô phỏng gắn kết phân tử của các chất thỏa mãn các mô hình pharmacophore trên vị trí 1 tại bề mặt PPI của IL-33
(A) Sự phân bố điểm số gắn kết của các phối tử. (B) Thống kê tần suất tương tác của các phối tử với các acid amin tại vị trí 1 của IL-33 dựa trên phân tích dấu vân tay tương tác.

Trong số các hợp chất gắn kết thành công, 9 hợp chất tiềm năng (với điểm số gắn kết tốt và tương tác được với ít nhất một acid amin điểm nóng của IL-33) được lựa chọn để đưa vào các mô phỏng MD 10 ns (**Bảng PL17.1, PHỤ LỤC 17**). Phức hợp của IL-33 với các phối tử DB00116, DB00158, DB00314, và DB00642 có độ ổn định cao với biên độ dao động RMSD < 1 Å (**Hình PL17.1, PHỤ LỤC 17**). Biểu đồ

RMSF tại **Hình PL17.2, PHỤ LỤC 17** cho thấy các điểm nóng có độ dao động trung bình thấp, khoảng 0,8 Å đối với Glu144, Glu148 và khoảng 1,0 Å đối với Asp244. Từ dữ liệu của các quỹ đạo mô phỏng MD, tần suất hình thành các loại tương tác được phân tích và trình bày tại các biểu đồ ở **Hình PL17.3, PHỤ LỤC 17**. Các hợp chất tiềm năng bao gồm DB00158, DB00314 và DB00642 được chọn để thực hiện các mô phỏng MD dài bởi chúng có tần suất hình thành tương tác cao với các acid amin điểm nóng của IL-33.

Các mô phỏng MD 50 ns cho thấy 2 hợp chất DB00158 và DB00642 vẫn duy trì được sự liên kết ổn định với IL-33 tại vị trí 1. Đặc biệt, các phần cấu trúc như pterin của DB00158 và 2-amino-4-oxo-3,7-dihydropyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin của DB00642 đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì sự tương tác ổn định với các điểm nóng Glu144, Glu148 và Asp244 của IL-33 (**Hình 3.11A và B**). So với cấu dạng mô phỏng gắn kết phân tử, DB00158 chỉ có sự thay đổi nhỏ về vị trí để gắn kết tốt hơn với protein (phối tử được minh họa màu xanh lơ tại **Hình 3.11C**). Hợp chất này hình thành liên kết hydro ổn định với Glu144 (tần suất 173%) và Glu204 (168%). Đối với DB00642, mô phỏng gắn kết phân tử cho thấy phối tử này liên kết với IL-33 bằng các liên kết hydro với hai điểm nóng quan trọng là Glu144 và Glu148. Trong quá trình MD, DB00642 có sự chuyển động đáng kể ở thời điểm 13 ns (phối tử được minh họa màu nâu) để liên kết ổn định hơn với Glu148 và Asp244 trong suốt thời gian còn lại của quá trình mô phỏng (phối tử được minh họa màu vàng tại **Hình 3.11C**). Sau những thay đổi trong tư thế gắn kết với IL-33, DB00642 cho liên kết hydro với Glu148 (tần suất 192%) và Asp244 (tần suất 147%).

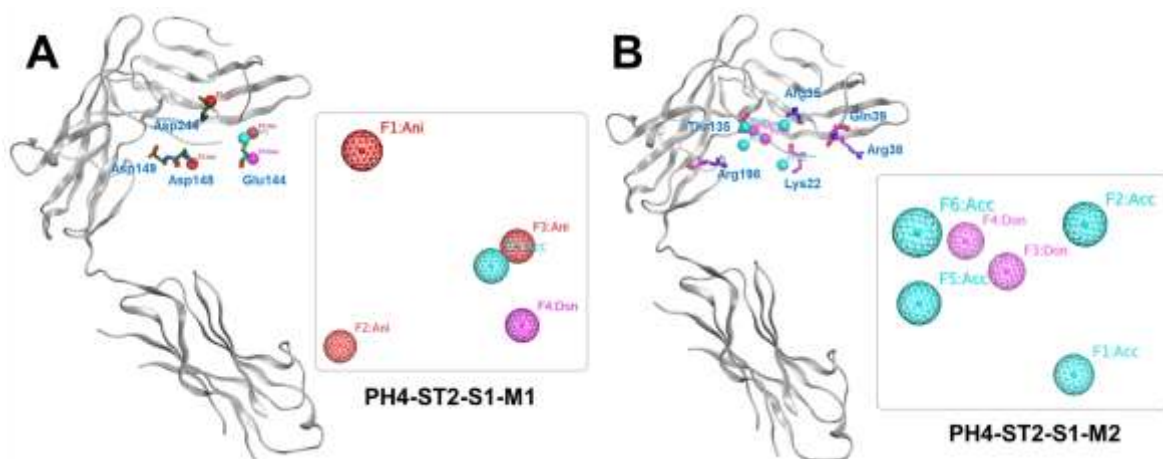
Dữ liệu từ quỹ đạo mô phỏng MD 50 ns của phức hợp IL-33 với hai hợp chất được sử dụng để tính toán năng lượng tự do gắn kết theo phương pháp MM-GBSA. DB00158 và DB00642 liên kết với IL-33 tại vị trí 1 của giao diện PPI với $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$ lần lượt là $-49,67 \pm 6,65$ và $-35,93 \pm 4,80$ kcal/mol. Biểu đồ tại **Hình 3.11D** cho thấy DB00158 có năng lượng tự do gắn kết mạnh và ổn định trong suốt quá trình mô phỏng. Trong khi đó, DB00642 có năng lượng tự do gắn kết ban đầu rất mạnh với IL-33 (có thời điểm đạt $-82,5$ kcal/mol). Tuy nhiên, cùng với sự thay đổi tư thế gắn kết như đã trình bày ở trên, DB00642 duy trì năng lượng tự do gắn kết ổn định khoảng -36 kcal/mol cho đến cuối thời gian mô phỏng.



Hình 3.11. Sự tương tác của DB00158 và DB00642 với IL-33 trong mô phỏng MD 50 ns (A) Biểu đồ nhiệt thể hiện sự tương tác của mỗi phối tử theo thời gian với các acid amin của của IL-33. (B) Sơ đồ 2D thể hiện tần suất tương tác protein–phối tử. (C) Sự gắn kết của phối tử trên IL-33 được minh họa ở hình ảnh 3D, với cấu trúc màu xanh lơ, màu nâu, màu vàng lần lượt là vị trí của phối tử ở các thời điểm 0; 13 và 50 ns. (D) Năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA giữa các phối tử và IL-33 được tính từ dữ liệu mô phỏng MD 50 ns.

3.3.2.2. Sàng lọc với mô hình pharmacophore cho thụ thể ST2 tại vị trí 1

Trên vị trí 1 của ST2, một truy vấn pharmacophore bắt chước các acid amin điểm nóng của IL-33 cũng được tạo ra nhằm tìm kiếm chất ức chế cho thụ thể này. Cụ thể, mô hình PH4-ST2-S1-M1 chứa 5 điểm (**Hình 3.12A**), gồm các điểm F1, F2, F3 có đặc tính anion (*Ani*), điểm F4 có đặc tính cho liên kết hydro (*Don*) và F5 có đặc tính nhận liên kết hydro (*Acc*). Tuy nhiên, các phân tử nhỏ phù hợp để làm thuốc thường khó thỏa mãn các yêu cầu về điện tích như trên, nên điểm F1 và F2 được đặt ràng buộc “ít nhất một”. Một mô hình đòi hỏi nhiều điểm điện tích âm cũng gây khó khăn cho quá trình sàng lọc ảo cũng như sẽ định hướng cho những phân tử ít có đặc tính “giống thuốc”. Vì vậy, một mô hình pharmacophore thứ hai được xây dựng dựa trên đặc tính của các acid amin của ST2 trên bề mặt PPI, gồm Lys22, Arg35, Arg38, Gln39, Tyr119, Thr135 và Arg198. Ngoài ra, các acid amin nằm ở trung tâm của vị trí gắn kết cũng được xem xét, gồm Gln23, Gln39, Met118, Ile136 và Leu138. Công cụ MOE Pharmacophore Editor được sử dụng để chỉ dẫn cho việc xây dựng mô hình này, dẫn đến truy vấn pharmacophore 6 điểm được minh họa ở **Hình 3.12B**.

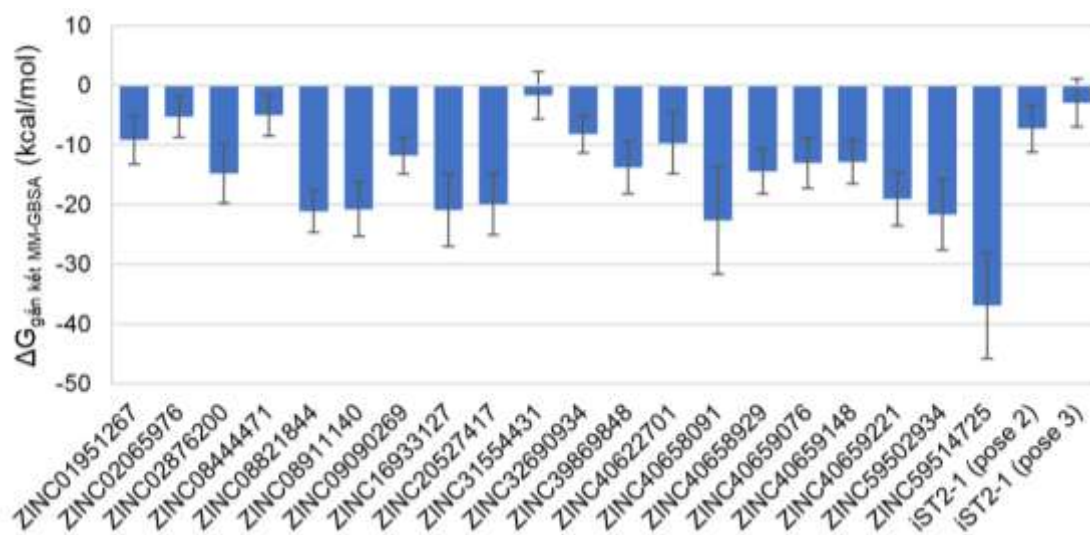


Hình 3.12. Các mô hình pharmacophore cho sàng lọc chất ức chế ST2 tại vị trí 1
(A) Mô hình PH4-ST2-S1-M1 được xây dựng bằng cách bắt chước các acid amin điểm nóng trên IL-33. (B) Mô hình PH4-ST2-S1-M2 được xây dựng dựa trên các acid amin trên bề mặt tương tác của chính thụ thể ST2.

Hai mô hình được tải lên máy chủ ZINCPharmer để sàng lọc nhanh chóng qua thư viện ZINC15 chứa hơn 200 triệu cấu dạng của hơn 20 triệu hợp chất. Kết quả sàng lọc đã thu được 1778 chất thỏa mãn mô hình, với 1438 chất thỏa mãn mô hình PH4-ST2-S1-M1 và 349 chất thỏa mãn mô hình PH4-ST2-S1-M2. Các chất này được tiếp tục sàng lọc qua mô hình mô phỏng gắn kết phân tử với phần mềm LeadIT, thu được 1755 chất gắn kết thành công với thụ thể ST2. Trong đó, 6 hợp chất gắn kết với ái lực dự đoán cao ($\Delta G_{\text{dock}} < -40$ kJ/mol) và 249 chất có điểm số gắn kết dưới -30

kJ/mol. Trong quá trình sàng lọc bằng mô phỏng gắn kết, chất đối chiếu được sử dụng là hợp chất iST2-1, với ΔG_{dock} tốt nhất là $-19,25$ kJ/mol.

Hai mươi phối tử xếp hạng cao nhất theo điểm số gắn kết (**Bảng PL18.1, PHỤ LỤC 18**) được chạy các mô phỏng MD ngắn (20 ns) để khảo sát sự ổn định khi gắn kết với miền D1D1 của ST2. Sự dao động của thụ thể ở dạng *apo* và dạng phức hợp với các phối tử khảo sát qua biểu đồ RMSD carbon mạch chính của protein được phân tích và trình bày chi tiết ở **Hình PL18.1**. Sự ổn định của protein còn được phản ánh qua biểu đồ bán kính quay (R_g) và diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi (SASA) được trình bày tại **Hình PL18.2**. Hầu hết các phối tử gắn kết ổn định với protein trong các mô phỏng MD 20 ns, với giá trị RMSD các nguyên tử nặng của phối tử dưới 2 Å, ngoại trừ ZINC02065976, ZINC02876200, ZINC20527417 và ZINC40659148. Đặc biệt, sự hiện diện của phối tử làm cho ST2 trở nên ổn định hơn so với dạng *apo*, thể hiện qua các biểu đồ RMSD tại **Hình PL18.1**. Từ các quỹ đạo mô phỏng 20 ns, năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA đã được tính toán cho giai đoạn phức hợp cân bằng (**Hình 3.13**). Cấu dạng gắn kết tốt nhất của chất đối chiếu iST2-1 đạt $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$ là $-7,28 \pm 3,96$ kcal/mol. Trong khi đó, nhiều phối tử khảo sát đạt giá trị năng lượng tự do tốt hơn, đáng chú ý là các hợp chất ZINC08821844, ZINC08911140, ZINC16933127, ZINC40658091, ZINC59502934 và ZINC59514725 đều có giá trị $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}} < -20$ kcal/mol.

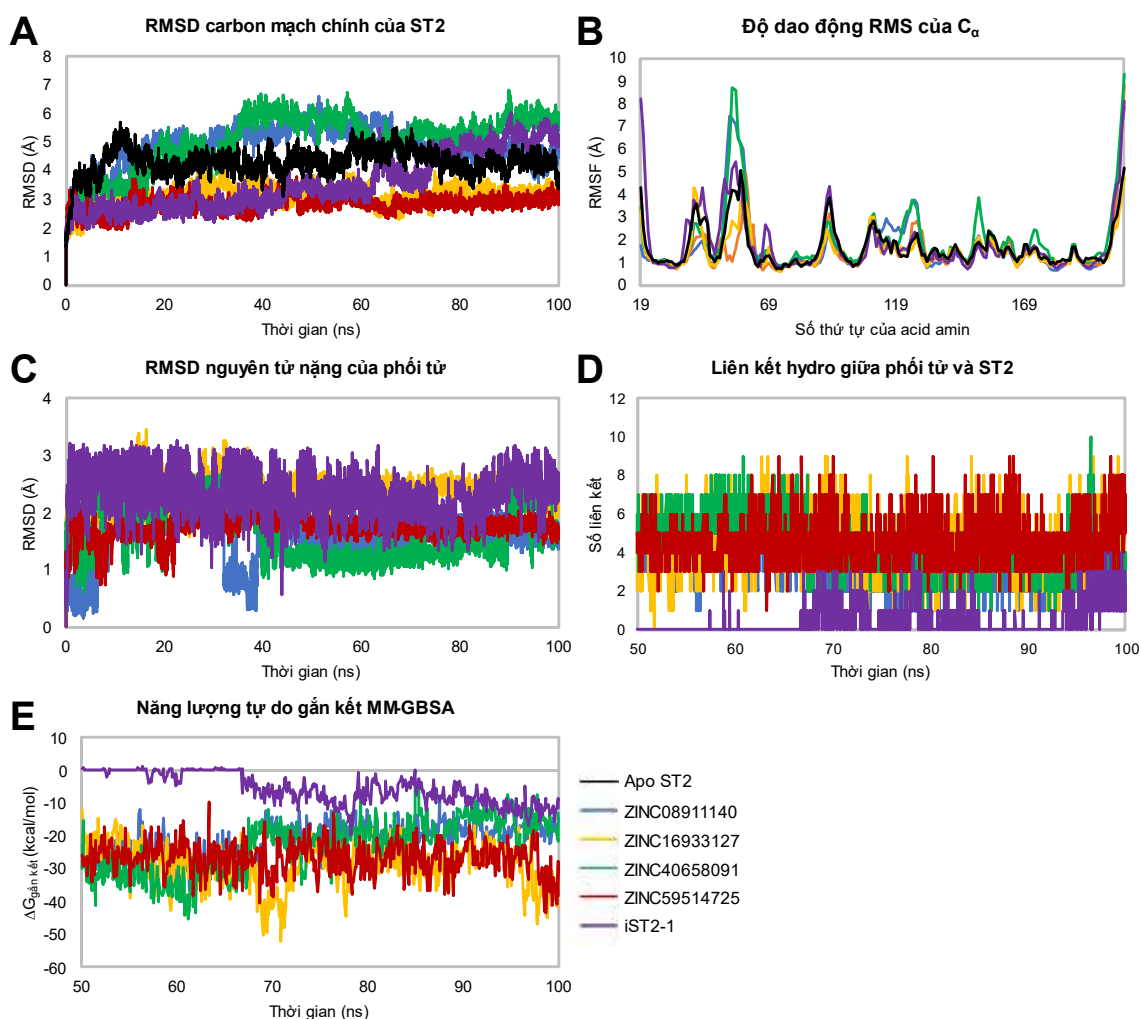


Hình 3.13. Năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA giữa ST2 và các phối tử được khảo sát.

Tần suất hình thành liên kết hydro giữa 20 phối tử và ST2 được phân tích và trình bày tại **Bảng PL18.2, PHỤ LỤC 18** cho thấy các hợp chất tương tác mạnh nhất với thụ thể bao gồm ZINC08911140, ZINC16933127, ZINC20527417, ZINC40658091 và ZINC59514725. Dựa trên khả năng tương tác với các acid amin điểm nóng, 4 hợp

chất ZINC08911140, ZINC16933127, ZINC40658091 và ZINC59514725 được lựa chọn để đưa vào các mô phỏng MD dài hơn (100 ns) nhằm khảo sát thêm.

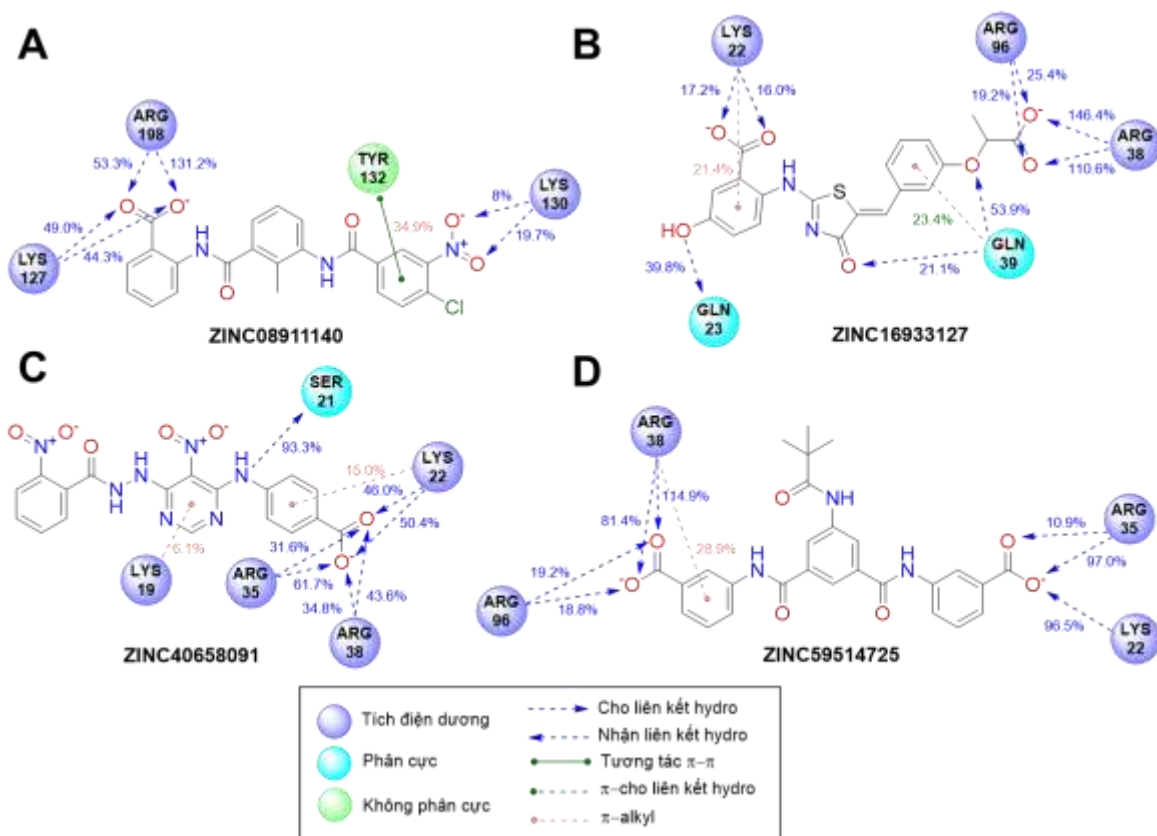
Phân tích quỹ đạo của các mô phỏng MD 100 ns cho thấy sự ổn định của phức hợp ST2 với các phối tử ZINC16933127 và ZINC59514725, thể hiện qua biên độ dao động RMSD < 1 Å (**Hình 3.14A**). Chính vì thế, hai phối tử đã giúp ổn định cấu trúc của các vòng trong cấu trúc bậc hai của protein, thể hiện qua đồ thị RMSF tại **Hình 3.14B**.



Hình 3.14. Phân tích quỹ đạo mô phỏng MD 100 ns và tính toán năng lượng tự do gắn kết của 4 hợp chất tiềm năng trên ST2

Sự chuyển động của các phối tử trong khoang gắn kết được phản ánh qua biểu đồ RMSD các nguyên tử nặng, các hợp chất đạt dần sự cân bằng sau 40 ns (**Hình 3.14C**). Các phối tử ZINC08911140, ZINC16933127 và ZINC59514725 có sự ổn định cao với biên độ dao động RMSD < 0,5 Å. Cả 4 phối tử được khảo sát đều có khả năng hình thành liên kết hydro với thụ thể cao hơn so với hợp chất iST2-1 (**Hình 3.14D**). Một nửa quỹ đạo cuối của quá trình mô phỏng (khi các phức hợp đạt độ ổn định) được sử dụng để tính toán sự hình thành của các loại tương tác protein–phối tử. **Hình**

3.15 cho thấy mỗi phối tử đều có thể tương tác với một hoặc nhiều acid amin điểm nóng của ST2 như Lys22, Arg35, Arg38 và Arg198. Năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA của các phối tử đều đạt giá trị âm, lần lượt là $-21,53 \pm 5,32$; $-28,93 \pm 6,66$; $-23,25 \pm 8,39$; $-26,84 \pm 5,07$ kcal/mol, tốt hơn so với hợp chất đối chiếu iST2-1, với $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}} = -5,46 \pm 4,68$ kcal/mol.



Hình 3.15. Tần suất hình thành tương tác giữa ST2 và 4 phối tử được khảo sát

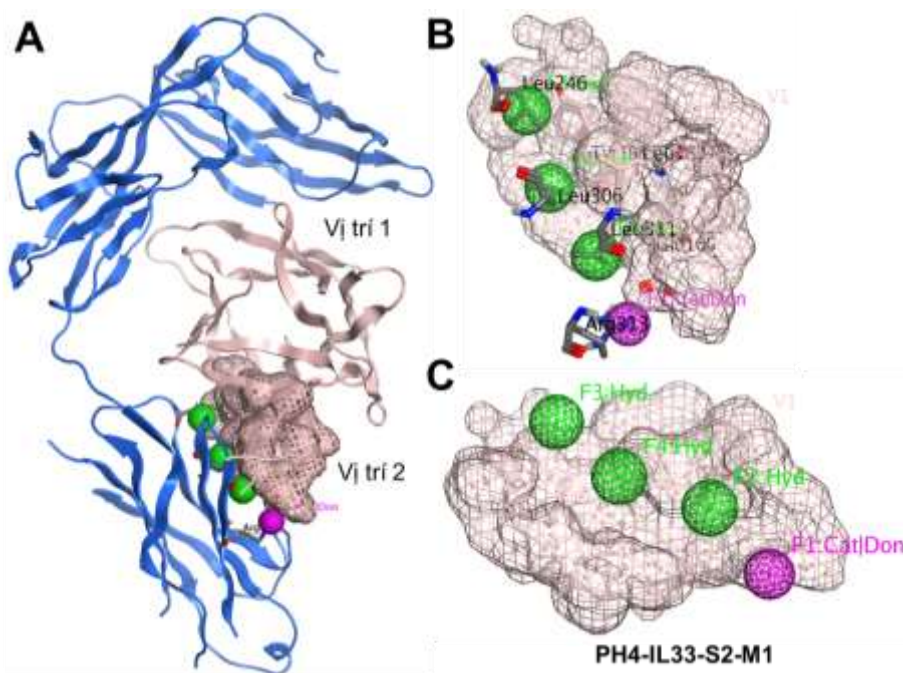
Ngoài ra, tính toán phân rã năng lượng tự do đã được thực hiện để đánh giá sự đóng góp của mỗi acid amin trong sự tương tác protein–phối tử. Kết quả tại **Bảng PL18.3, PHỤ LỤC 18** cho thấy ZINC59514725 là hợp chất tiềm năng khi tương tác với 3 acid amin quan trọng là Lys22, Arg35 và Arg38 với mức phân rã năng lượng tự do lần lượt là $-5,03$; $-5,88$ và $-8,92$ kcal/mol. Bên cạnh đó, ZINC16933127 cũng là một hợp chất triển vọng khi tương tác với Arg38 với mức năng lượng cao nhất trong các phối tử được khảo sát, với mức năng lượng đóng góp là $-11,26$ kcal/mol.

Hồ sơ tính chất ADMET cho 4 hợp chất tiềm năng tại **Hình 3.15** đã được lập bằng công cụ ADMETlab và trình bày chi tiết tại **Bảng PL18.4, PHỤ LỤC 18**. Các hợp chất đều thỏa mãn Luật 5 Lipinski, không phải là các hợp chất gây nhiễu liên thử nghiệm (pan-assay interference compounds – PAINS), được dự đoán khả năng hấp thu bằng đường uống từ trung bình đến tốt và dễ tổng hợp hóa học.

3.3.3. Sàng lọc chất gắn kết với IL-33 tại vị trí 2 của giao diện PPI bằng phương pháp pharmacophore

3.3.3.1. Mô hình pharmacophore tìm kiếm chất ức chế IL-33 tại vị trí 2 được xây dựng theo phương pháp bắt chước PPI

Nghiên cứu vị trí gắn kết đã chỉ ra vị trí 2 trên giao diện PPI của IL-33 có tiềm năng phát triển chất ức chế phân tử nhỏ hơn so với vị trí 1. Tại vị trí này, mô hình pharmacophore PH4-IL33-S2-M1 được xây dựng bằng cách bắt chước các nhóm tham gia tương tác của Leu246, Leu306, Leu311 và Arg313 trên ST2 với các acid amin điểm nóng Tyr163, Leu182 và Glu165 của IL-33 trên IL-33 (**Hình 3.16**). Mô hình chứa 4 điểm, gồm F1: *Cat|Don*, F2: *Hyd*, F3: *Hyd* và F4: *Hyd*. Ngoài ra, một vùng loại trừ thể tích dựa trên bề mặt của protein cũng được bổ sung để tăng độ chọn lọc cho mô hình.



Hình 3.16. Mô hình pharmacophore PH4-IL33-S2-1 tìm kiếm chất ức chế IL-33 tại vị trí 2 (A) Sự minh họa mô hình trên phức hợp cấu trúc tinh thể của IL-33/ST2 (PDB: 4KC3). (B) Các acid amin trên ST2 được sử dụng để bắt chước và tạo ra truy vấn. (C) Hình ảnh tổng thể của mô hình pharmacophore 4 điểm cùng với vùng loại trừ thể tích.

Mô hình được sử dụng để sàng lọc qua các thư viện hóa học trên các công cụ trực tuyến ZINCPharmer và PharmIT với số chất thỏa mãn truy vấn được trình bày tại **Bảng PL19.1, PHỤ LỤC 19**. Các chất được đưa vào cùng một tệp dữ liệu để loại trùng lặp. Trong đó, 2000 chất có độ khớp cao nhất với mô hình (giá trị RMSD thấp nhất) được tiếp tục sàng lọc bằng mô phỏng gắn kết với phần mềm AutoDock Vina.

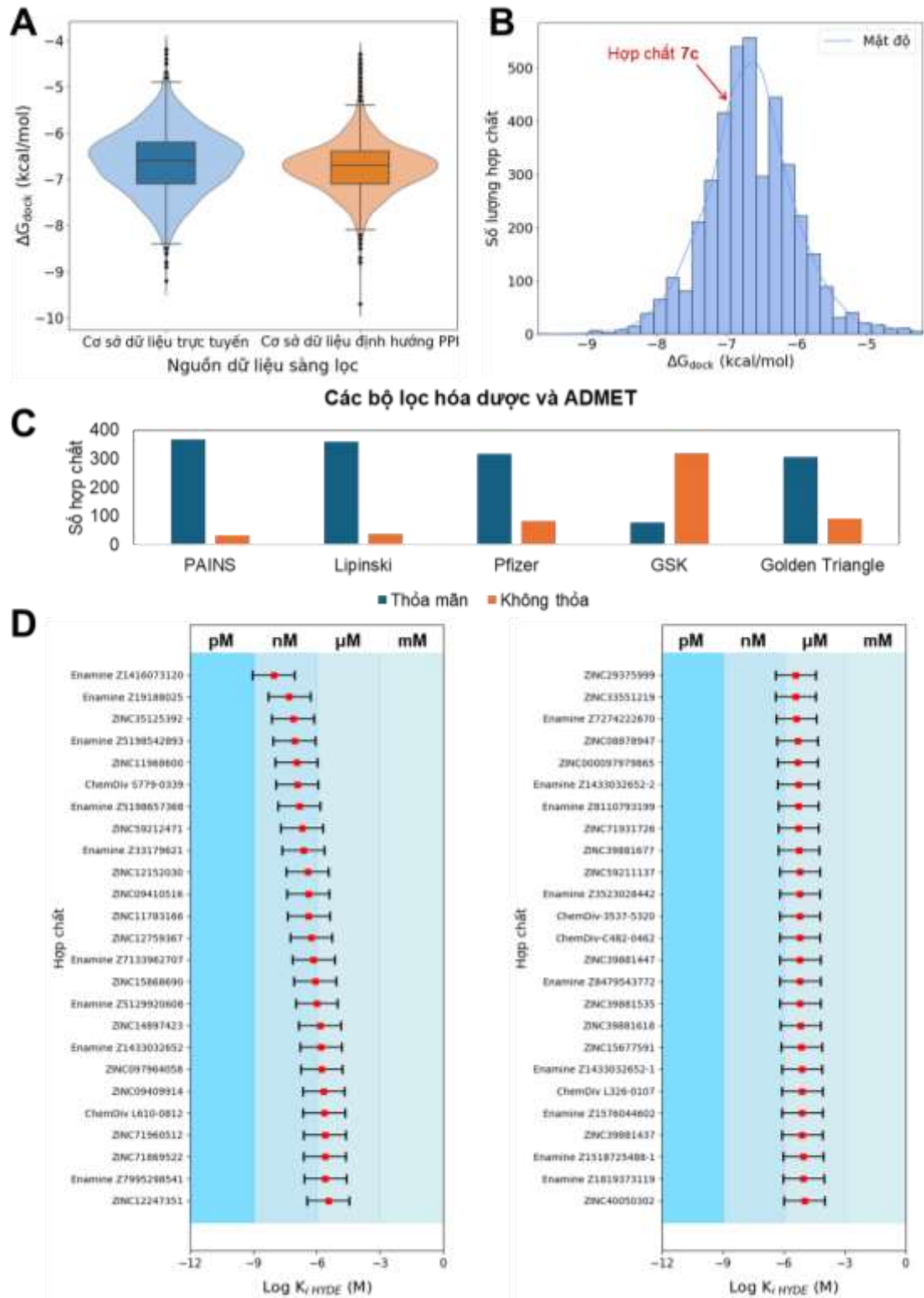
Song song đó, mô hình cũng được sử dụng để sàng lọc qua cơ sở dữ liệu định hướng PPI đã được xây dựng trong đề tài (**Bảng PL7.1, PHỤ LỤC 7**). Quá trình

sàng lọc được thực hiện trên máy tính cục bộ, với kết quả được trình bày tại **Bảng PL19.1, PHỤ LỤC 19**. Các chất thỏa mãn mô hình được gộp chung vào một tập tin và loại trùng lặp. Nhằm mục đích so sánh với kết quả sàng lọc qua các công cụ trực tuyến, 2000 hợp chất có RMSD thấp nhất so với truy vấn pharmacophore cũng được sàng lọc qua mô hình gắn kết phân tử.

Do mô hình PH4-IL33-S2-M1 được xây dựng trực tiếp trên các điểm nóng từ cấu trúc tinh thể của IL-33 (PDB: 4KC3), các hợp chất thỏa mô hình cũng được mô phỏng gắn kết trên cấu trúc này. **Hình 3.17A** cho thấy 2000 hợp chất từ cơ sở dữ liệu hóa học định hướng PPI có điểm số gắn kết trung bình tốt hơn có ý nghĩa thống kê so các hợp chất từ sàng lọc từ các công cụ trực tuyến như ZINCPharmer và PharmIT (kiểm định Mann-Whitney U, $p = 2,186 \times 10^{-13}$). Hai tập dữ liệu chia sẻ với nhau 6 hợp chất trùng lặp. Sự phân bố ΔG_{dock} của tất cả 3994 hợp chất cũng được minh họa tại **Hình 3.17B**. Trong đó, nhiều hợp chất đã cho ΔG_{dock} tốt hơn so với chất đối chiếu **7c** ($\Delta G_{\text{dock}} = -6,9$ kcal/mol) trên cấu trúc tinh thể của IL-33.

Các chất thuộc 10% có ΔG_{dock} tốt nhất được lập hồ sơ ADMET bằng công cụ ADMETlab. Sự phù hợp của các chất với các bộ quy tắc hóa dược được thống kê tại **Hình 3.17C**. Phần lớn các chất được sàng lọc thỏa mãn Luật 5 Lipinski (90%) và không vi phạm PAINS (92%). Với các bộ lọc có tiêu chí nghiêm ngặt hơn, số chất thỏa mãn luật Pfizer và GSK lần lượt là 79% và 20%. Đặc biệt, 77% số chất thỏa mãn tiêu chí “Golden Triangle”, gợi ý tính chất được động học thuận lợi. Đồng thời, 400 hợp chất này cũng được tính điểm lại với chương trình HYDE và ái lực gắn kết ước tính được minh họa tại **Hình 3.17D**.

Các hợp chất dẫn đầu về điểm số gắn kết (ΔG_{dock}) và có khả năng tạo liên kết hydro hoặc cầu muối với các acid amin tại vị trí 2 của IL-33 được chọn để đưa vào mô phỏng MD 100 ns, gồm Enamine Z8479543772, ZINC000009715199, Enamine Z5129920608, ZINC000097979009 và ZINC000003396261. Bên cạnh đó, dựa trên ái lực gắn kết K_i HYDE, các hợp chất dẫn đầu gồm Enamine Z1416073120, Enamine Z19188025, ChemDiv S779-0339, Enamine Z5198657368 và ZINC12152030 cũng được lựa chọn để khảo sát thêm qua các mô phỏng MD. Các hợp chất có cấu trúc được trình bày tại **Bảng PL19.2, PHỤ LỤC 19** và tính chất ADMET được trình bày tại **Bảng PL19.3, PHỤ LỤC 19**.

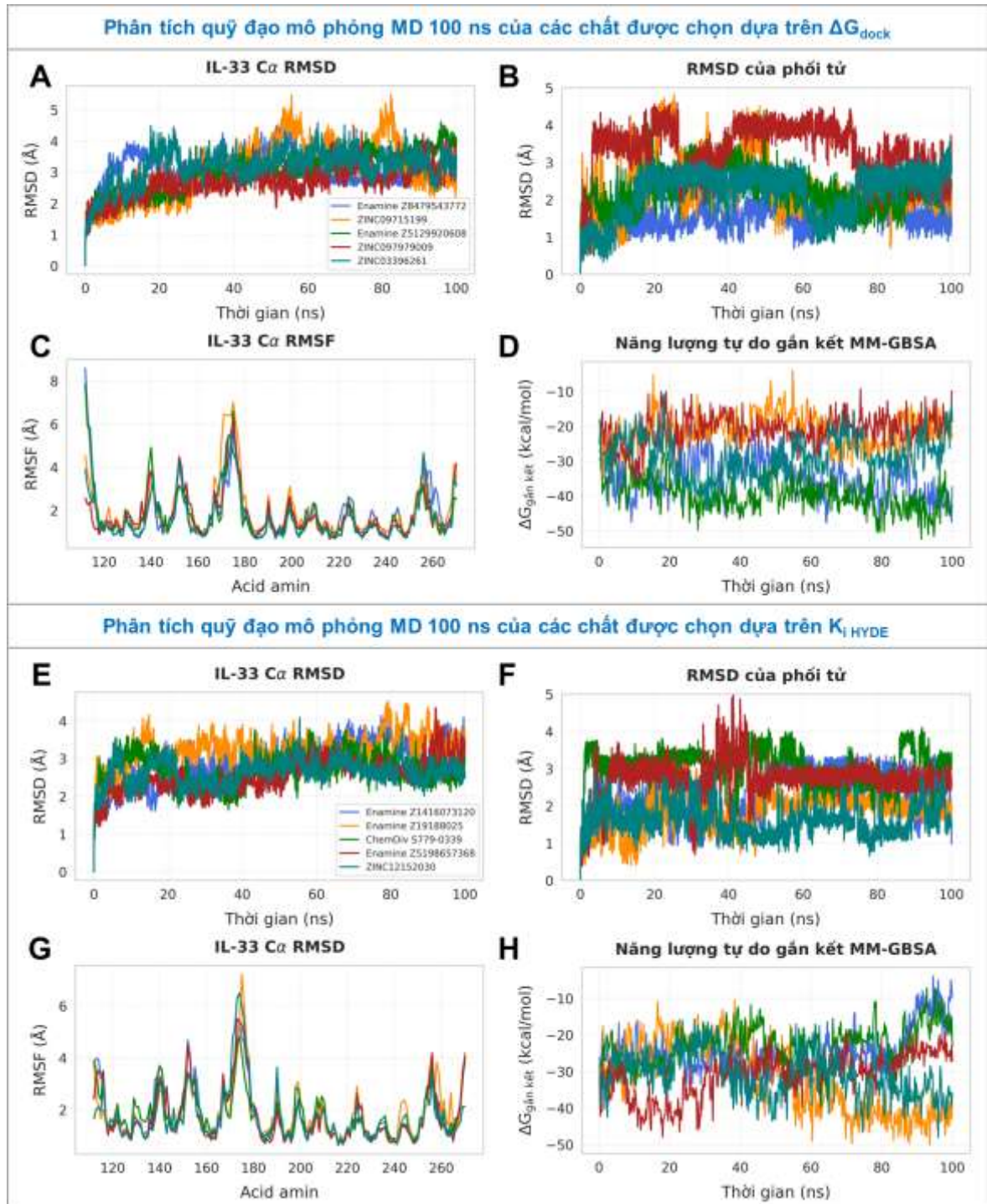


Hình 3.17. Các hợp chất dẫn đầu thu được từ quá trình sàng lọc ảo chất ức chế IL-33 tại vị trí 2 của PPI dựa trên mô hình pharmacophore PH4-IL33-S2-M1

(A) So sánh sự phân bố điểm số gắn kết của các chất được sàng lọc từ thư viện trực tuyến và từ cơ sở dữ liệu định hướng PPI. (B) Sự phân bố điểm số gắn kết của toàn bộ 3994 hợp chất kết hợp từ hai bộ cơ sở dữ liệu. (C) Sự phù hợp của các hợp chất với các bộ lọc hóa dược và ADMET. (D) Các hợp chất có ái lực gắn kết HYDE tốt nhất với IL-33.

Đối với 5 hợp chất được lựa chọn dựa trên ΔG_{dock} , phức hợp của IL-33 với các phối tử đạt sự ổn định với biên độ dao động RMSD $< 1 \text{ \AA}$, ngoại trừ phức hợp của ZINC09715199 (**Hình 3.18A**). Đối với sự chuyển động của từng phối tử, Enamine Z8479543772, Enamine Z5129920608 và ZINC03396261 có sự ổn định cao hơn so với hai phối tử còn lại. Đến nửa cuối thời gian mô phỏng, ZINC09715199 cũng đạt sự cân bằng nhưng ZINC097979009 vẫn còn dao động (**Hình 3.18B**). Độ dao động trung bình của các acid amin trên IL-33 không khác nhau đáng kể giữa các phức hợp, thể hiện qua biểu đồ RMSF ở **Hình 3.18C**. Cả 5 phối tử đều có khả năng tương tác kỵ nước với một hoặc nhiều acid amin điểm nóng của IL-33 (**Bảng PL19.2, PHỤ LỤC 19**). Phương pháp MM-GBSA được áp dụng để tính toán năng lượng tự do gắn kết giữa các phối tử và IL-33 dựa trên các quỹ đạo mô phỏng MD (**Hình 3.18D**). Tính từ thời điểm đạt trạng thái cân bằng, Enamine Z8479543772 và Enamine Z5129920608 là hai phối tử có ái lực gắn kết tốt nhất với IL-33, với $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$ lần lượt là $-38,4 \pm 4,3$ và $-41,4 \pm 3,9$ kcal/mol. Đặc biệt, Enamine Z8479543772 có thể hình thành tương tác với cả 3 điểm nóng thực nghiệm là Tyr163, Glu165 và Leu182. Trong khi đó, Enamine Z5129920608 tương tác mạnh mẽ với các điểm nóng Tyr163 và Leu182 với tần suất liên kết lên đến 98–100% trong suốt thời gian mô phỏng. Đặc biệt, cả hai phối tử đều có thể cho liên kết hydro với nhóm C=O mạch chính của Lys180, với tần suất hình thành tương tác của mỗi phối tử lần lượt là 75 và 97%. Đây là một acid amin quan trọng tham gia tương tác với Leu311 của thụ thể ST2 được quan sát trong các mô phỏng MD phức hợp IL-33/ST2 trước đó.

Với sự chỉ dẫn của chương trình tính điểm HYDE, 5 hợp chất tiềm năng đã được lựa chọn để mô phỏng MD 100 ns. IL-33 trong phức hợp với các phối tử đều đạt sự ổn định với biên độ dao động RMSD $< 2 \text{ \AA}$ (**Hình 3.18E**). Các phối tử sau một thời gian dao động cũng đạt được sự ổn định ở khoảng nửa cuối quỹ đạo mô phỏng (**Hình 3.18F**). Cả 5 phối tử đều có năng lượng tự do gắn kết âm, nhưng nổi bật là Enamine Z19188025 và ZINC12152030 với $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$ lần lượt là $-40,1 \pm 6,1$ và $-32,8 \pm 5,6$ kcal/mol. Các phối tử này đều tương tác kỵ nước mạnh với các acid amin điểm nóng như Tyr122, Tyr163, Leu182, Leu220, Asn222 và Leu267, nhưng đóng góp năng lượng quan trọng nhất là liên kết hydro và ion với Glu269 (**Bảng PL19.2, PHỤ LỤC 19**). Tần suất của Enamine Z19188025 khi cho liên kết hydro, ion và tương tác kỵ nước với Glu269 lần lượt là 90, 91 và 53%. Trong khi đó, liên kết hydro, ion và tương tác *Van der Waals* của ZINC12152030 với Glu269 được duy trì 100% trong suốt thời gian mô phỏng MD.

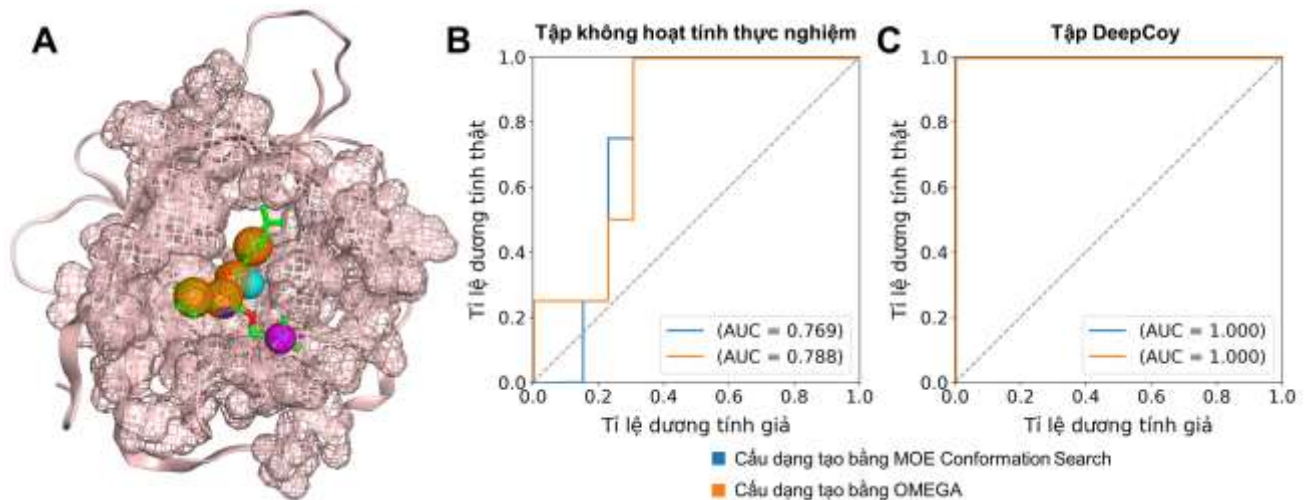


Hình 3.18. Phân tích quỹ đạo mô phỏng MD 100 ns và tính toán năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA của các chất tiềm năng được sàng lọc từ mô hình PH4-IL33-S2-M1.

(A, B, C và D) Kết quả phân tích RMSD carbon alpha của protein, RMSD của phối tử, RMSF carbon alpha và $\Delta G_{\text{gắn kết}}$ MM-GBSA của phức hợp IL-33 với 5 hợp chất được chọn dựa trên điểm số gắn kết. (E, F, G và H) Kết quả phân tích các quỹ đạo MD của phức hợp IL-33 với 5 hợp chất được chọn dựa trên ái lực gắn kết HYDE.

3.3.3.2. Mô hình pharmacophore tìm kiếm chất ức chế IL-33 tại vị trí 2 dựa trên phức hợp của protein với chất ức chế thực nghiệm 7c

Dựa trên mô phỏng MD dài 5 μ s cùng thuật toán phân cụm, cấu dạng gắn kết phổ biến và tốt nhất của IL-33 và chất ức chế **7c** đã được lấy mẫu (**Hình 3.5**). Phức hợp IL-33/**7c** được sử dụng để xây dựng mô hình pharmacophore một cách tự động bằng công cụ AutoPH4. Kết quả thu được mô hình PH4-IL33-S2-M2 chứa 6 điểm và một vùng loại trừ thể tích được minh họa tại **Hình 3.19A**.



Hình 3.19. Mô hình pharmacophore dựa trên cấu trúc phức hợp IL-33/**7c**
(A) Mô hình PH4-IL33-S2-M2 trong không gian 3 chiều. (B) Đường cong ROC đánh giá mô hình qua tập có và không có hoạt tính thật, cùng tập môi như DeepCoy.

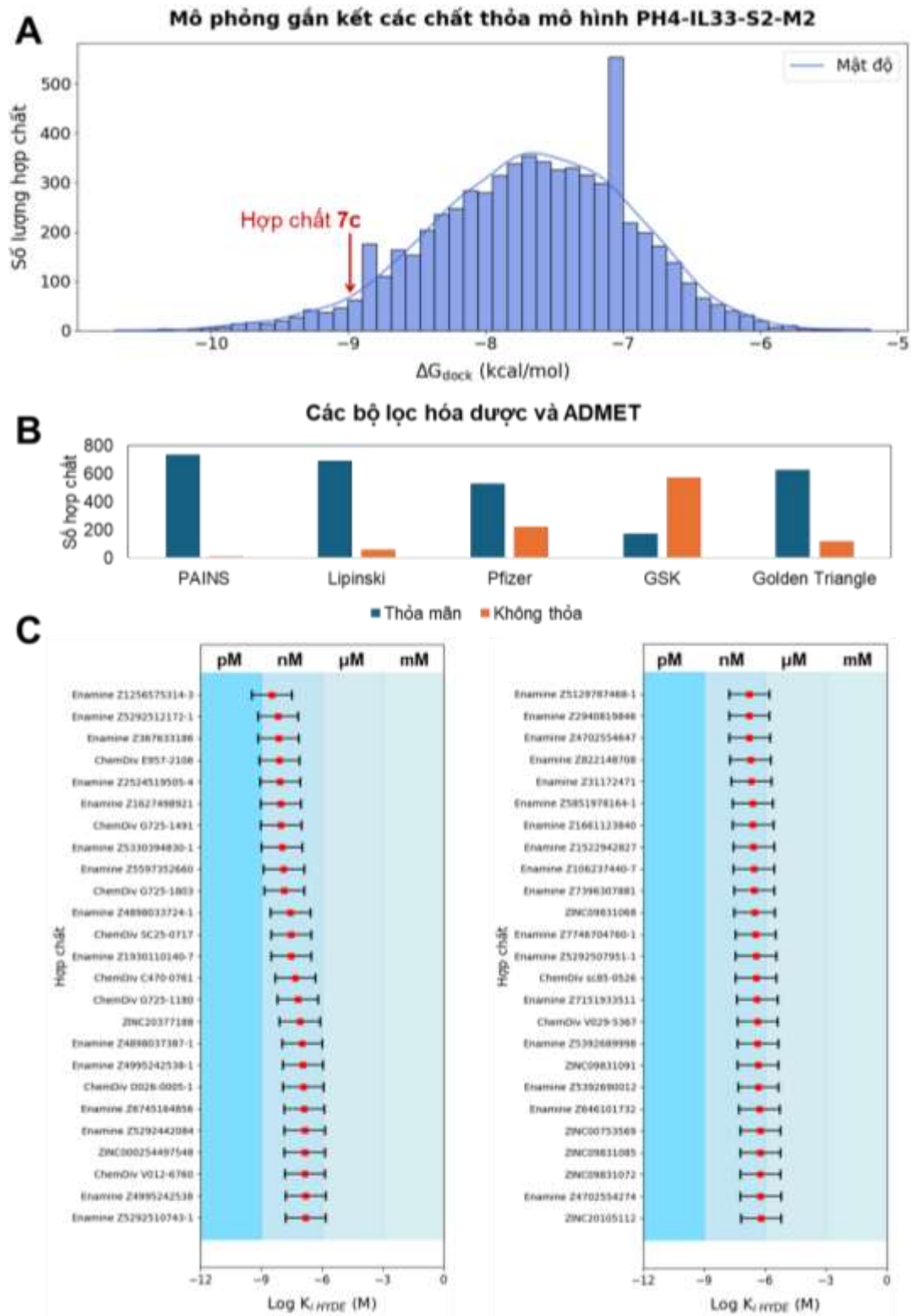
Mô hình được đánh giá bằng cách sàng lọc trên tập hoạt tính và tập không hoạt tính. Tập không hoạt tính trong trường hợp này bao gồm các chất không hoạt tính thực nghiệm được báo cáo bởi Kim và cộng sự, và một tập môi như DeepCoy. Các tập chất này được tạo cấu dạng bằng công cụ MOE Conformation Search. Đồng thời, phần mềm OMEGA cũng được sử dụng để tạo cấu dạng nhằm đánh giá sự phù hợp của việc sàng lọc trên các thư viện định hướng PPI với cấu dạng được tạo bằng chương trình này. Kết quả đánh giá tại **Hình 3.19B** và **C** cho thấy mô hình có thể phân biệt được chất có và không có hoạt tính với diện tích dưới đường cong ROC trong tất cả các lần đánh giá đều lớn hơn 0,70.

Do đó, mô hình PH4-IL33-S2-M2 được sử dụng để sàng lọc qua các cơ sở dữ liệu và kết quả được trình bày bổ sung tại **Bảng PL20.1, PHỤ LỤC 20**. Sau khi loại bỏ trùng lặp, có tổng cộng 694 chất từ các thư viện trực tuyến và 5697 chất từ cơ sở dữ liệu định hướng PPI thỏa mãn mô hình. Các chất được tập hợp chung thành một tệp dữ liệu duy nhất và sàng lọc qua mô hình mô phỏng gắn kết trên túi gắn kết được xác định trên vị trí 2 tại giao diện PPI của IL-33. Do mô hình pharmacophore được xây dựng dựa trên phức hợp gắn kết giữa IL-33 và hợp chất **7c** được lấy mẫu từ mô

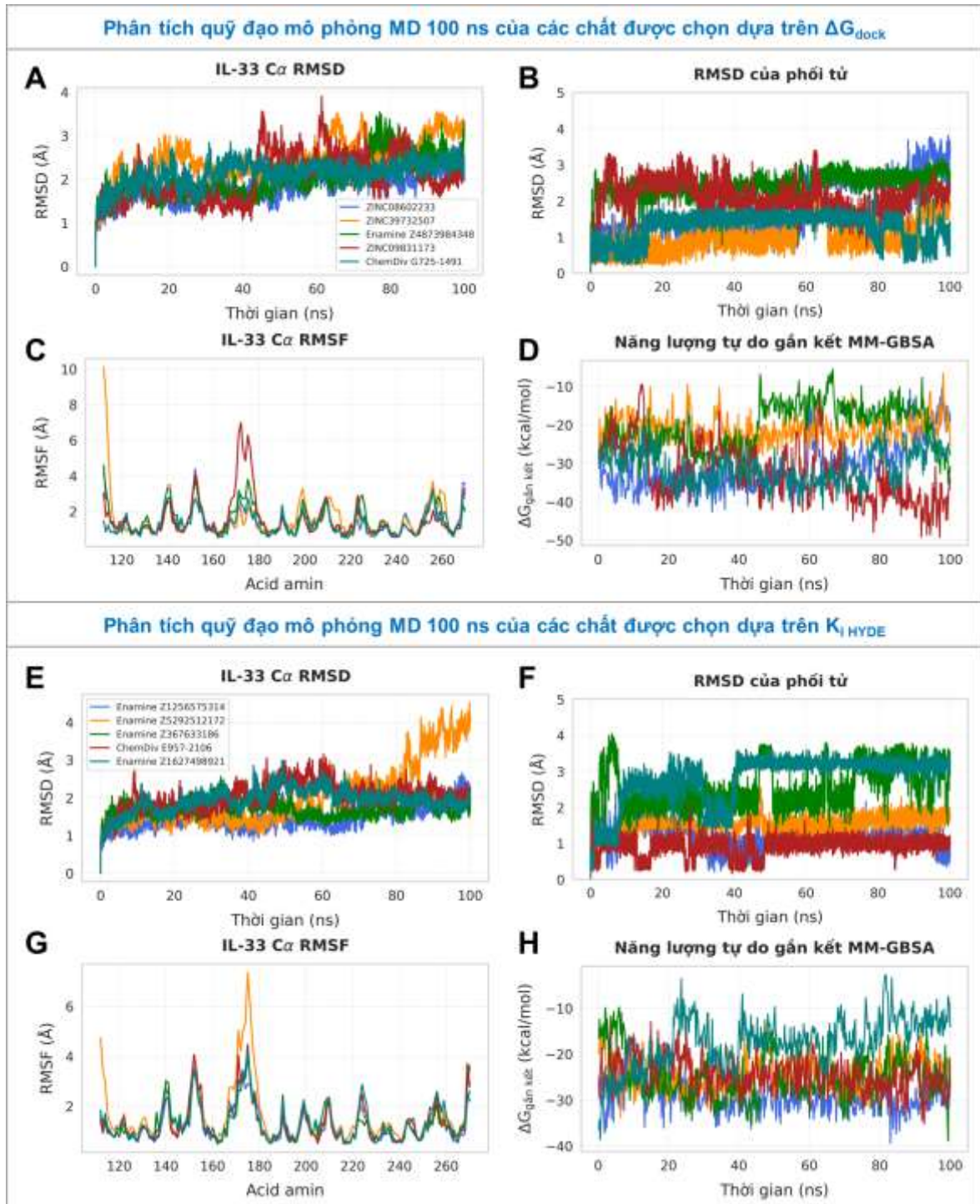
phòng MD nên quá trình gắn kết phân tử cũng sử dụng cấu dạng này của IL-33. Sự phân bố điểm số gắn kết 6391 hợp chất được trình bày tại **Hình 3.20A**, với nhiều hợp chất có ái lực cao hơn so với chất đối chiếu **7c** ($\Delta G_{\text{dock}} < -9,0$ kcal/mol). Trong đó, 10% số chất xếp hạng cao nhất được lập hồ sơ ADMET. Sự phù hợp của các chất này với các bộ lọc hóa dược như Luật 5 Lipinski, Pfizer và GSK lần lượt là 92, 71 và 24%. Hầu hết các hợp chất không vi phạm bộ lọc PAINS (98%) để tránh dương tính giả trong các thử nghiệm sinh học và tuân thủ bộ lọc Golden Triangle (84%) để có tính chất ADMET thuận lợi (**Hình 3.20B**). Sau khi tính điểm lại với HYDE, 50 hợp chất dẫn đầu với ái lực gắn kết ước tính tốt nhất được trình bày tại **Hình 3.20C**.

Các hợp chất tiềm năng được lựa chọn để khảo sát tính ổn định của sự gắn kết với IL-33 trong các mô phỏng MD 100 ns. Năm hợp chất ZINC08602233, ZINC39732507, Enamine Z4873984348, ZINC09831173 và ChemDiv G725-1491 được lựa chọn theo sự xếp hạng dựa trên ΔG_{dock} và sự tương tác với các acid amin quan trọng (đặc biệt là với các điểm nóng của IL-33). Bên cạnh đó, các chất Enamine Z1256575314, Enamine Z5292512172, Enamine Z367633186, ChemDiv E957-2106 và Enamine Z1627498921 cũng được lựa chọn để mô phỏng MD dựa trên sự xếp hạng bởi ái lực gắn kết HYDE và khả năng tương tác của chúng với các acid amin điểm nóng.

Trong các mô phỏng MD (**Hình 3.21**), cả 10 hợp chất tiềm năng được lựa chọn đều duy trì sự liên kết ổn định với IL-33 tại vị trí 2, được phản ánh qua biểu đồ RMSD của phối tử (**Hình 3.21B và F**). Trên các biểu đồ này, các phối tử có sự dịch chuyển so với vị trí bắt đầu và sau đó dần đạt được sự cân bằng. Tất cả các quỹ đạo được xem xét trực tiếp dưới dạng hình ảnh bằng phần mềm VMD để xác nhận các phối tử vẫn định vị tại túi gắn kết ở vị trí 2 của IL-33. Nửa cuối của quỹ đạo khi phức hợp protein–phối tử đạt sự cân bằng, năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA được tính toán và cho thấy cả 8 phối tử đều duy trì sự gắn kết tốt với IL-33 với $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$ âm và ổn định. Phần quỹ đạo này cũng được đưa vào phân tích tần suất tương tác giữa phối tử với các acid amin tại vị trí 2 của IL-33. Thống kê tại **Bảng PL20.2, PHỤ LỤC 20** cho thấy mỗi phối tử đều có khả năng duy trì tương tác với một hoặc nhiều điểm nóng, đặc biệt là các điểm nóng thực nghiệm như Tyr163, Leu182 và các điểm nóng được phát hiện qua nghiên cứu *in silico* như Ile119, Tyr122, Lys180, Leu267 và Asn222. Dựa trên năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA, các hợp chất nổi bật gắn kết ái lực cao với IL-33 gồm ZINC09831173, ChemDiv G725-1491 và Enamine Z1256575314 với $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$ dưới -30 kcal/mol. Tính chất ADMET của các hợp chất tiềm năng này được trình bày chi tiết tại **Bảng PL20.3, PHỤ LỤC 20**.



Hình 3.20. Các hợp chất dẫn đầu thu được từ quá trình sàng lọc ảo chất ức chế IL-33 tại vị trí 2 của PPI dựa trên mô hình pharmacophore PH4-IL33-S2-M2 (A) Sự phân bố điểm số gắn kết của các chất được sàng lọc từ mô hình pharmacophore. (B) Hồ sơ ADMET với một số đặc tính hóa dược tiêu biểu của 10% số chất có điểm số gắn kết tốt nhất. (C) Ái lực gắn kết của 50 hợp chất dẫn đầu khi tính điểm lại bằng HYDE.



Hình 3.21. Phân tích quỹ đạo mô phỏng MD 100 ns và tính toán năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA của các chất tiềm năng được sàng lọc từ mô hình PH4-IL33-S2-M2.

(A, B, C và D) Kết quả phân tích RMSD carbon alpha của protein, RMSD của phối tử, RMSF carbon alpha và $\Delta G_{\text{gắn kết}}$ MM-GBSA của phức hợp IL-33 với 4 hợp chất được chọn dựa trên điểm số gắn kết. (E, F, G và H) Kết quả phân tích các quỹ đạo MD của phức hợp IL-33 với 4 hợp chất được chọn dựa trên ái lực gắn kết HYDE.

3.4. Mô hình *in silico* dựa trên phối tử ức chế IL-33 và ST2

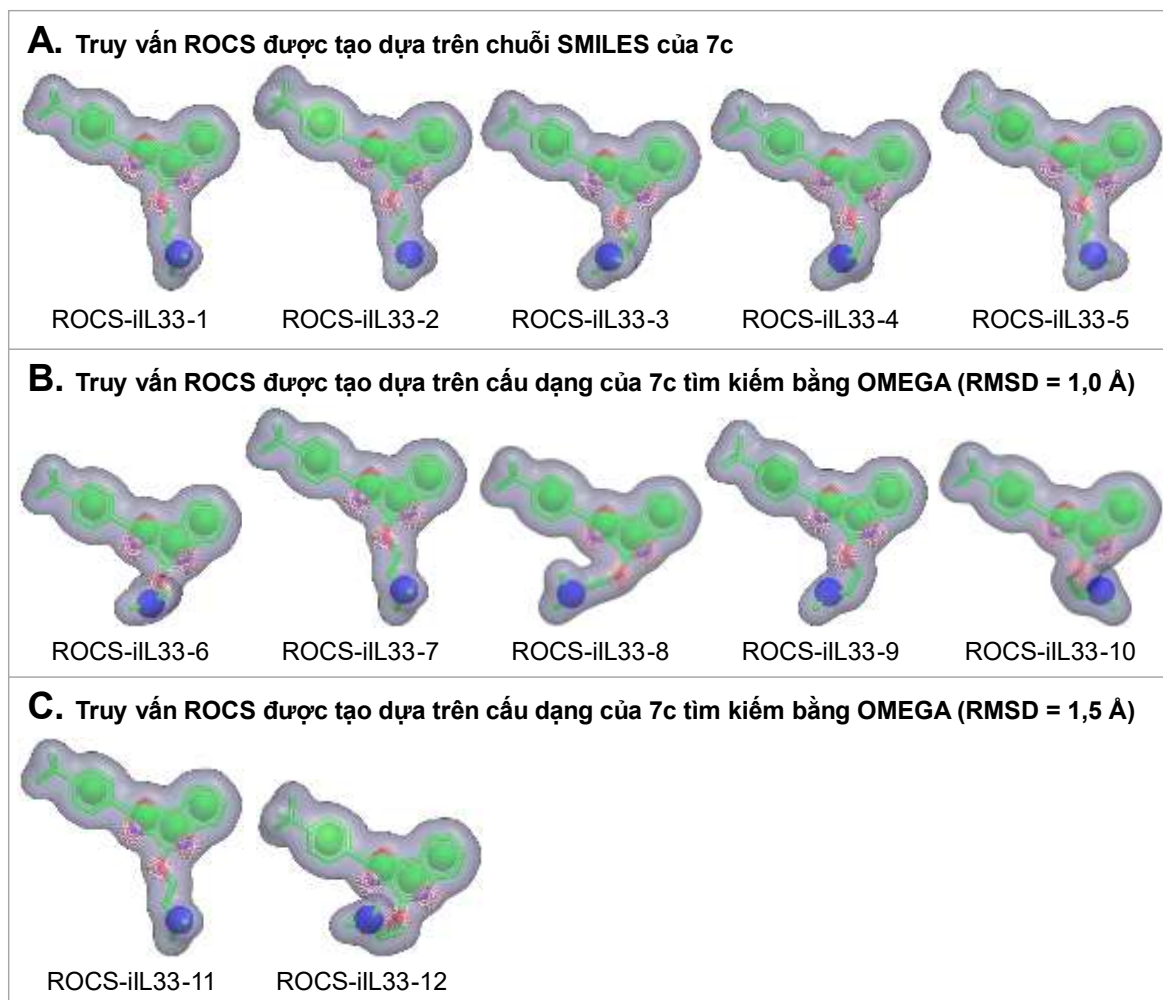
3.4.1. Truy vấn tương đồng hình dạng 3 chiều tìm kiếm chất ức chế IL-33

3.4.1.1. Tìm kiếm truy vấn

Cho đến nay, **7c** là chất ức chế tiềm năng nhất của IL-33, được chứng minh khả năng gắn kết với protein qua thử nghiệm đo nhiễu loạn độ dịch chuyển hóa học trên phổ NMR và hiệu lực ức chế trên dòng tế bào HMC-1. Trong nghiên cứu này, **7c** được sử dụng để tạo truy vấn ROCS như điểm khởi đầu cho việc tìm kiếm các hợp chất mới có sự tương đồng về hình dạng 3D và tính chất hóa học, góp phần làm giàu lượng hợp chất phân tử nhỏ ức chế IL-33. Từ chuỗi SMILES của **7c**, phần mềm vROCS tìm kiếm được 5 truy vấn (**Hình 3.22A**). Nhằm mục đích so sánh hiệu quả của việc tạo truy vấn ROCS từ chuỗi SMILES và từ cấu dạng 3D sẵn có, hợp chất **7c** được tìm kiếm cấu dạng trước bằng phần mềm OMEGA và đưa vào phần mềm vROCS để tìm kiếm truy vấn tương đồng hình dạng 3D. Trong quá trình tìm kiếm cấu dạng với OMEGA, ngưỡng RMSD cao hơn mặc định ($> 0,5$ Å) được cài đặt để thu được một tập hợp các cấu dạng đa dạng của **7c**. Với ngưỡng RMSD 1,0 và 1,5 Å, vROCS tìm kiếm được lần lượt 5 và 2 truy vấn (**Hình 3.22B và C**).

Hiệu năng sàng lọc của tất cả 12 truy vấn ROCS được đánh giá qua khả năng phân biệt các chất trong tập kiểm tra có hoạt tính và tập mồi như DeepCoy. Kết quả đánh giá các truy vấn được trình bày tại **Bảng PL21.1, PHỤ LỤC 21**, bao gồm các phân tích đường cong ROC và hệ số làm giàu. Kiểm định dấu-hạng Wilcoxon được thực hiện để so sánh sự khác biệt giữa các truy vấn dựa trên các điểm số Tanimoto và Overlap. **Hình PL21.1A, PHỤ LỤC 21** cho thấy khi sử dụng điểm số Tanimoto làm thước đo trong sàng lọc ảo, các truy vấn ROCS đều có hiệu năng tốt hơn có ý nghĩa thống kê so với phương pháp Lingos (tất cả các giá trị $p < 0,05$). **Hình PL21.1B** gợi ý ROCS-iIL33-6 là truy vấn tốt nhất, nhưng kiểm định Wilcoxon chỉ ra rằng truy vấn này khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với truy vấn ROCS-iIL33-1 và ROCS-iIL33-10. Do đó, truy vấn ROCS-iIL33-6 được chạy qua tập kiểm tra song song với từng truy vấn còn lại và giá trị p hiệu chỉnh (tính toán bởi phần mềm vROCS) được sử dụng để so sánh thống kê. Giá trị p hiệu chỉnh khi so sánh truy vấn ROCS-iIL33-6 với các truy vấn khác được trình bày tại **Bảng PL21.2, PHỤ LỤC 21**. Kết quả cho thấy truy vấn này có hiệu năng sàng lọc tốt hơn các truy vấn ROCS-iIL33-1, 2, 5, 8, 9 khi so sánh bằng điểm số TanimotoCombo ($p_{\text{hiệu chỉnh}} < 0,5$). Khi sử dụng điểm số Overlap để so sánh, truy vấn ROCS-iIL33-6 tốt hơn hết tất cả các truy vấn còn lại ở giá trị ROC-AUC và $EF_{0,5\%}$ ($p_{\text{hiệu chỉnh}} < 0,5$). Đánh giá trên tập decoy DUD-E và DUDE-Z bằng điểm số tương đồng Tanimoto tổng thể, truy vấn ROCS-iIL33-6 có

ROC-AUC lần lượt là 1,00 và 1,00; $EF_{1\%}$ lần lượt là 96,88 và 100. Như vậy, ROCS-iIL33-6 được xác định là truy vấn tối ưu nhất dựa trên hợp chất **7c** và được sử dụng cho sàng lọc ảo.



Hình 3.22. Các truy vấn ROCS cho chất ức chế IL-33 được tạo từ cấu trúc của hợp chất **7c** (A) Các truy vấn ROCS được tạo từ chuỗi SMILES của **7c**. (B và C) Các truy vấn được xây dựng từ cấu dạng 3D của **7c** được tạo bằng phần mềm OMEGA với RMSD lần lượt là 1,0 và 1,5 Å.

3.4.1.2. Sử dụng truy vấn ROCS sàng lọc ảo chất ức chế IL-33

Truy vấn ROCS-iIL33-6 được sử dụng để sàng lọc qua cơ sở dữ liệu định hướng PPI đã được chuẩn bị. Với mỗi lần chạy trên một tập dữ liệu, ngưỡng điểm Tanimoto tổng thể chọn vào là 1,0 và số hợp chất tối đa tốt nhất được giữ lại là 5000. Kết quả sàng lọc qua các thư viện được trình bày tại **Bảng PL21.3, PHỤ LỤC 21**.

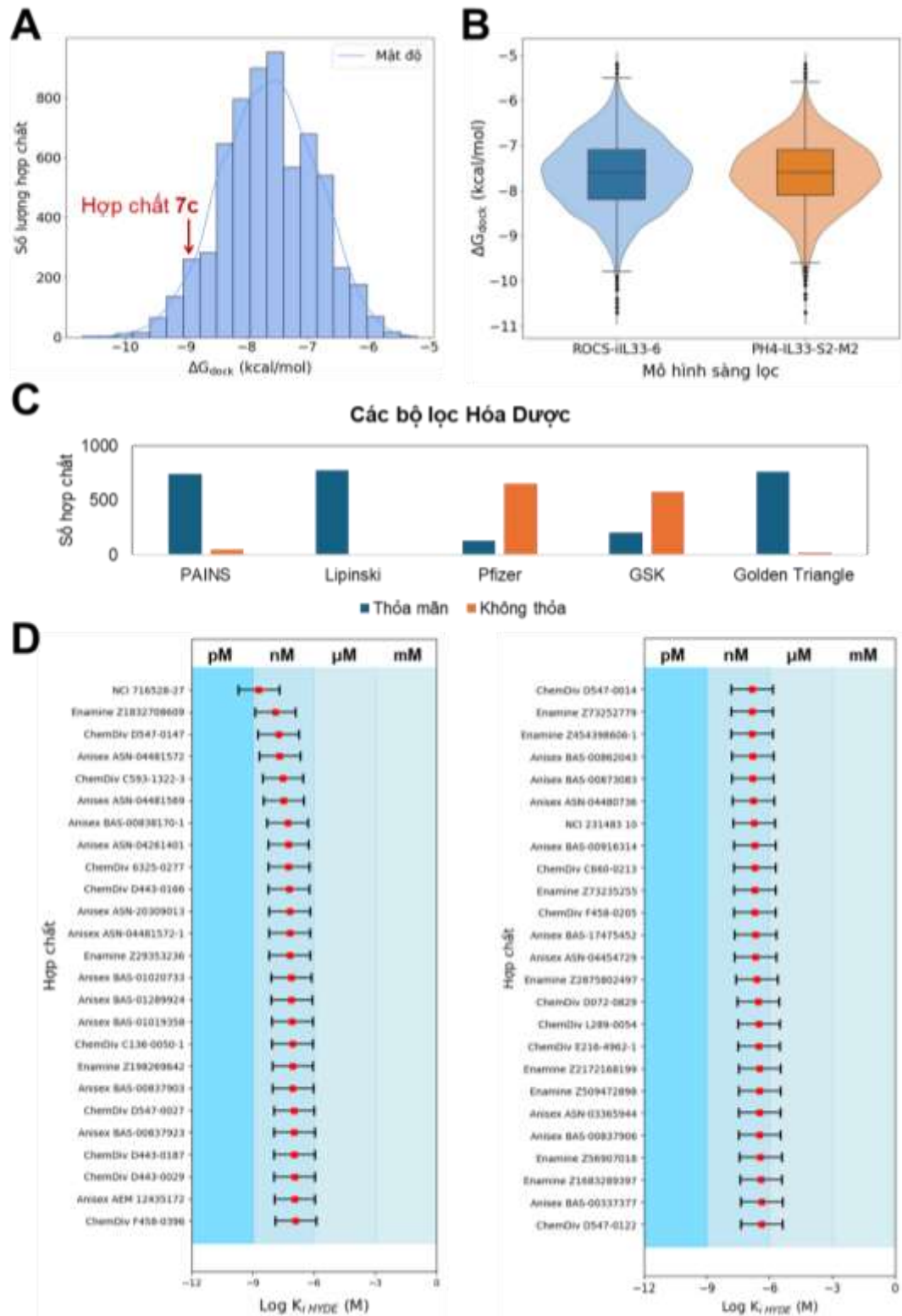
Để so sánh với mô hình pharmacophore cho chất ức chế IL-33 tại vị trí 2 dựa trên hợp chất **7c** (PH4-IL33-S2-M2), một lượng hợp chất thỏa mãn truy vấn ROCS tương đương được đưa vào mô phỏng gắn kết bằng phần mềm AutoDock Vina. Tổng cộng 6371 hợp chất với điểm số Tanimoto tổng thể lớn hơn 1,07 được sàng lọc và sự phân

bỏ điểm số gắn kết của chúng được minh họa tại **Hình 3.23A**. Khi so sánh truy vấn ROCS với mô hình pharmacophore PH4-IL33-S2-M2, **Hình 3.23B** cho thấy sự phân bố điểm số gắn kết của các chất được sàng lọc từ hai mô hình khác biệt không có ý nghĩa thống kê (kiểm định Mann-Whitney U, $p = 0,2141$).

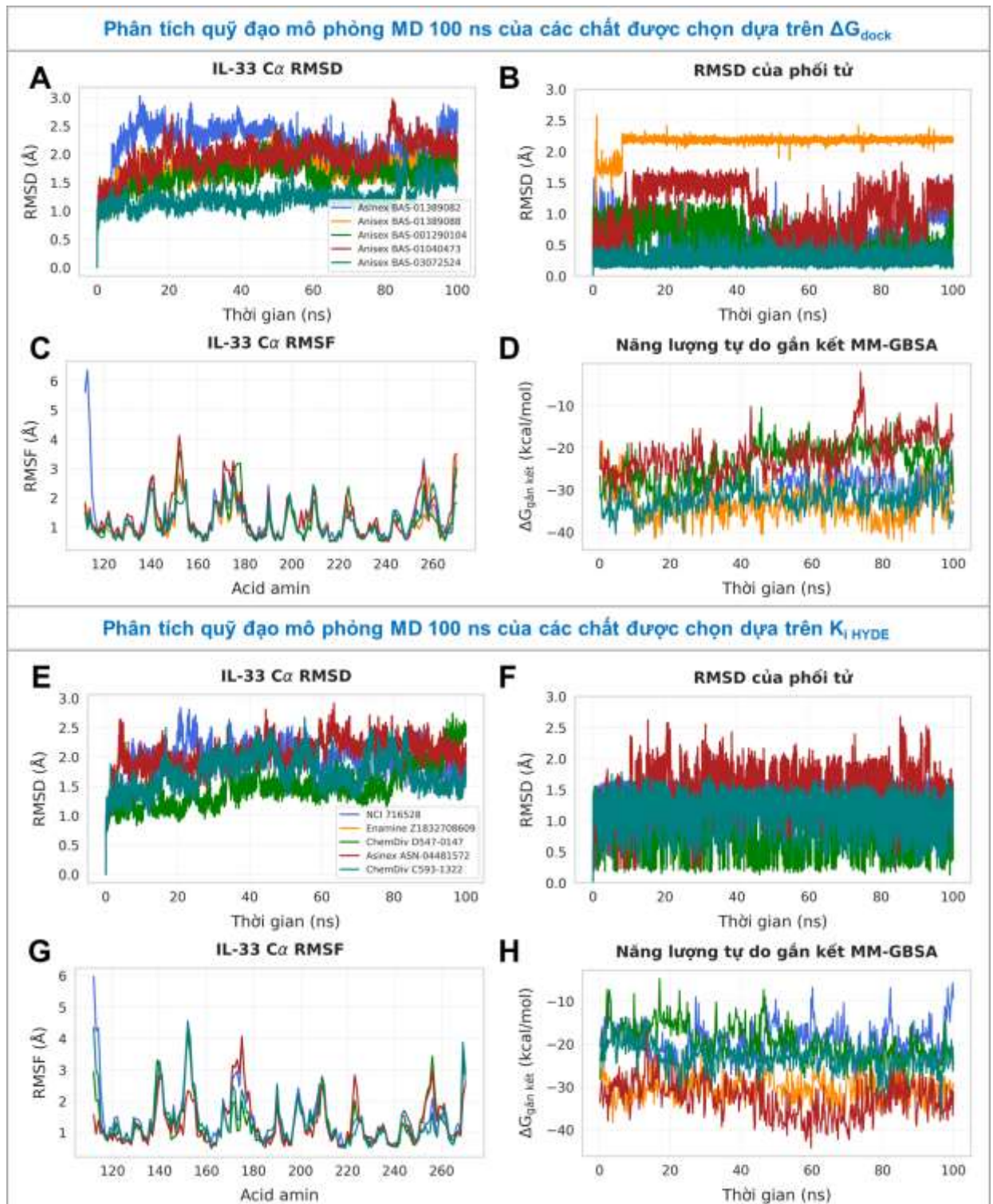
Trong số 6371 hợp chất được mô phỏng gắn kết sau khi sàng lọc qua truy vấn ROCS, 10% số chất có ái lực gắn kết tốt nhất (tương đương khoảng 785 chất có $\Delta G_{\text{dock}} < -8,0$ kcal/mol) được lập hồ sơ ADMET. Kết quả tại **Hình 3.23C** cho thấy 99% số hợp chất thỏa mãn Luật 5 Lipinski và 97% số chất thỏa quy tắc Golden Triangle. Đồng thời, 94% số hợp chất không vi phạm bộ lọc PAINS để gây dương tính giả trong các thử nghiệm sinh học. Các hợp chất này được đưa vào chương trình HYDE để tính điểm lại và ái lực gắn kết dự đoán với IL-33 của 50 chất dẫn đầu được minh họa tại **Hình 3.23D**. Tương tự các sàng lọc ảo trước, phức hợp của IL-33 với 5 hợp chất có ΔG_{dock} và 5 hợp chất có K_i HYDE tốt nhất được lựa chọn để mô phỏng MD 100 ns. Các chất có cấu trúc và tính chất ADMET được trình bày lần lượt tại **Bảng PL21.4** và **PL21.5, PHỤ LỤC 21**.

Năm hợp chất dẫn đầu về ΔG_{dock} đều có điểm số $< -10,0$ kcal/mol và đến từ thư viện Asinex. Phân tích RMSD của protein và phối tử cho thấy 5 hợp chất gắn kết ổn định với IL-33 tại túi gắn kết ở vị trí 2 của PPI (**Hình 3.24A và B**). Đặc biệt, Asinex BAS-01389088 và BAS-03072524 là những phối tử có biên độ dao động RMSD rất thấp. Biểu đồ RMSF ở **Hình 3.24C** cho thấy, ngoại trừ Asinex BAS-01389082, 4 phối tử còn lại đều làm giảm sự dao động của các acid amin ở đầu N của IL-33. **Hình 3.24D** thể hiện năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA của các phối tử với IL-33, trong đó Asinex BAS-01389088 và BAS-03072524 là những hợp chất nổi bật với $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$ lần lượt là $-33,79 \pm 3,97$ và $-31,65 \pm 2,95$ kcal/mol.

Các hợp chất được lựa chọn dựa trên K_i HYDE cũng thể hiện sự gắn kết ổn định với IL-33 trong các quỹ đạo mô phỏng MD 100 ns (**Hình 3.24E, F và G**). Trong đó, hợp chất gắn kết tiềm năng nhất là Enamine Z1832708609 và Asinex ASN-04481572 với $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$ lần lượt là $-30,65 \pm 2,76$ và $-34,66 \pm 4,04$ kcal/mol (**Hình 3.24H**).



Hình 3.23. Các hợp chất dẫn đầu thu được từ quá trình sàng lọc ảo chất ức chế IL-33 tại vị trí 2 của PPI dựa trên mô hình tương đồng hình dạng 3D ROCS-iIL33-6 (A) Sự phân bố điểm số gắn kết của các chất được sàng lọc từ truy vấn ROCS. (B) So sánh sự phân bố điểm số gắn kết của ~6000 hợp chất được sàng lọc từ truy vấn ROCS và mô hình pharmacophore PH4-IL33-S2-M2 qua cơ sở dữ liệu hóa học định hướng PPI. (C) Hồ sơ ADMET với một số đặc tính hóa dược tiêu biểu của 10% số chất có điểm số gắn kết tốt nhất. (D) Ái lực gắn kết của 50 hợp chất dẫn đầu khi tính điểm lại bằng HYDE.



Hình 3.24. Phân tích quỹ đạo mô phỏng MD 100 ns và tính toán năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA của các chất tiềm năng được sàng lọc từ mô hình ROCS-iIL33-6 (A, B, C và D) Kết quả phân tích RMSD carbon alpha của protein, RMSD của phối tử, RMSF carbon alpha và $\Delta G_{\text{gắn kết}}$ MM-GBSA của phức hợp IL-33 với 5 hợp chất được chọn dựa trên điểm số gắn kết. (E, F, G và H) Kết quả phân tích các quỹ đạo MD của phức hợp IL-33 với 5 hợp chất được chọn dựa trên ái lực gắn kết HYDE.

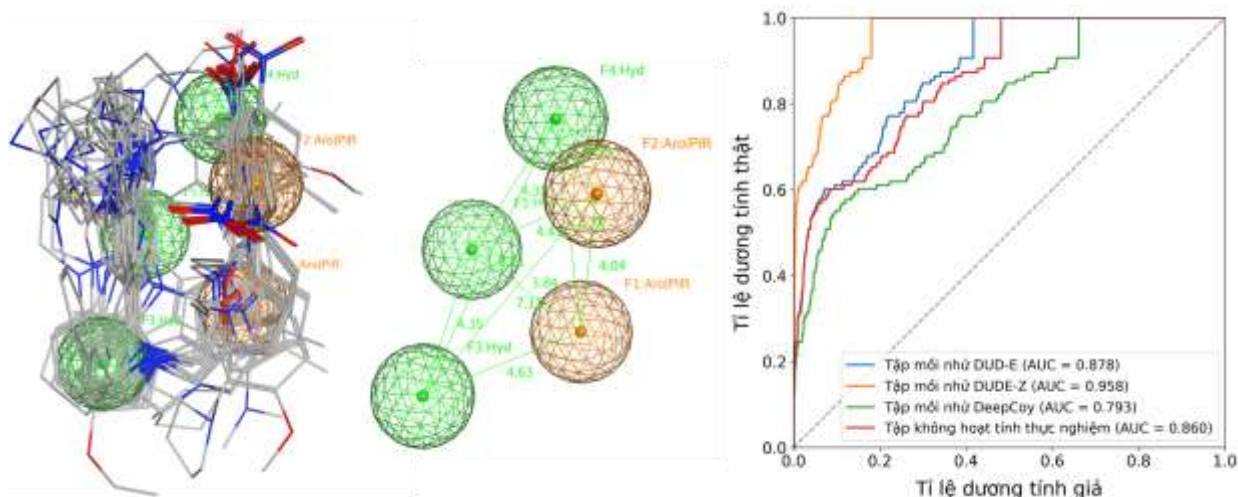
3.4.2. Mô hình pharmacophore dựa trên phối tử phân tử nhỏ ức chế IL-33/ST2

Dựa trên tập hợp 82 chất ức chế ST2 đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước (**Bảng PL2.2, PHỤ LỤC 2**), các mô hình pharmacophore dựa trên phối tử xây dựng dựa trên 17 chất trong tập huấn luyện và đánh giá dựa trên 65 chất có hoạt tính trong tập kiểm tra. Phân tích thành phần chính (PCA) tại **Hình PL22.1, PHỤ LỤC 22** cho thấy tập huấn luyện phân bố đều trong không gian hóa học của toàn tập dữ liệu. Tập kiểm tra không hoạt tính bao gồm một tập không hoạt tính thực nghiệm được lấy mẫu từ cơ sở dữ liệu PubChem BioAssay (mã số 1259354) và tập môi nhử được tạo bằng DUD-E, DUDE-Z và DeepCoy. Tổng cộng 74 truy vấn pharmacophore đã được tạo ra dựa trên điểm chung của các chất có hoạt tính mạnh trong tập huấn luyện. Tất cả các mô hình chứa từ 4–5 điểm, chủ yếu là các điểm vòng thơm và kỵ nước, cho thấy tầm quan trọng của đặc điểm cấu trúc này. Các truy vấn 5 điểm tốt nhất đã được đánh giá sơ bộ qua tập có hoạt tính và tập môi nhử DUDE-Z (**Bảng 3.5**). Dựa trên điểm số GH, truy vấn thứ 18 có kết quả đánh giá tốt nhất.

Bảng 3.5. Đánh giá các mô hình pharmacophore dựa trên phối tử ức chế ST2, với tập decoy được tạo bằng DUDE-Z

Mô hình	Truy vấn	Độ chồng phủ	Độ đúng	Se	Sp	Ya	GH
12	RRHHH_20	26,50	1,00	0,92	0,74	0,19	0,2763
45	RHHHH_6	24,08	1,00	0,94	0,81	0,24	0,3377
48	RHHHH_5	23,93	1,00	0,83	0,81	0,22	0,3030
49	RHHHH_18	23,83	1,00	0,83	0,79	0,21	0,2879
13	RRHHH_27	26,44	0,97	0,99	0,73	0,20	0,2909
18	RRHHH_29	26,26	0,97	0,91	0,82	0,25	0,3387
22	RRHHH_25	26,17	0,97	0,92	0,73	0,18	0,2663
25	RRHHH_19	25,82	0,97	0,89	0,75	0,19	0,2739
29	RRHHH_26	25,75	0,97	0,90	0,81	0,24	0,3257
30	RRHHH_12	25,61	0,97	0,84	0,84	0,26	0,3370

Mô hình 18 được ký hiệu là PH4-LB-iST2, tiếp tục được đánh giá qua phân tích đường cong ROC. Trên tập môi nhử DUD-E và DUDE-Z, mô hình có ROC-AUC lần lượt là 0,878 và 0,958; $\overline{TG}$ đạt 0,54 và 0,77 và hệ số làm giàu $EF_{1\%}$ đạt 24,41 và 16,16. Sử dụng tập chất môi nhử DeepCoy khó phân biệt hơn, mô hình đạt ROC-AUC = 0,793, $\overline{TG}$ = 0,29 và $EF_{1\%}$ = 18,59. Bên cạnh đó, một tập không hoạt tính thực nghiệm được sử dụng để đánh giá mô hình, thu được ROC-AUC = 0,860, $\overline{TG}$ = 0,47 và $EF_{1\%}$ = 24,62 (**Hình 3.25**). Những chỉ số này cho thấy mô hình có thể được chấp nhận bởi khả năng phân biệt tốt chất có và không có hoạt tính.



Hình 3.25. Mô hình pharmacophore PH4-LB-iST2 dựa trên phối tử ức chế ST2 được đánh giá bằng các tập mẫu khác nhau và tập không hoạt tính thực nghiệm

3.4.3. Mô hình QSAR dự đoán chất ức chế hoạt tính IL-33/ST2

Nghiên cứu QSAR sử dụng 82 hợp chất có hoạt tính ức chế IL-33/ST2, với điểm cuối của mô hình là hoạt tính trên tế bào HB ($\text{pIC}_{50(\text{HB})}$). Trong quá trình tiền xử lý dữ liệu, 4 hợp chất được báo cáo là ngoại lai về cấu trúc và hoạt tính được loại bỏ (gồm C11, C19, C26 và C48). Tập hợp cuối cùng chứa 78 hợp chất với 372 thông số mô tả phân tử 2D được phân chia thành tập huấn luyện và kiểm tra bằng phương pháp Kennard-Stone với tỉ lệ 80:20 (**Hình PL23.1, PHỤ LỤC 23**). Trên tập huấn luyện, các thông số mô tả được lựa chọn với sự hỗ trợ của thuật toán di truyền và Stepwise. Các bộ thông số mô tả phân tử với số lượng khác nhau đã được khảo sát, trong đó các mô hình chứa 7 biến số cho kết quả tốt nhất (so với 5, 6 hay 8 thông số mô tả).

Năm bộ 7 thông số mô tả tốt nhất đã được lựa chọn để xây dựng mô hình QSAR bằng phương pháp PLS và trình bày tại **Bảng 3.6**. Các thông số mô tả đều có tương quan chéo dưới 80% (**Hình PL23.2, PHỤ LỤC 23**). Trong phép phân chia dữ liệu theo phương pháp Kennard-Stone, cả 5 mô hình đều đạt các chỉ số đánh giá đối với một mô hình QSAR ($R^2 = 0,77\text{--}0,81$; $Q_{\text{LOO}}^2 = 0,71\text{--}0,76$; $\text{MAE}_{\text{LOO}} = 0,15\text{--}0,17$; $\overline{r_{\text{m(LOO)}}^2} = 0,60\text{--}0,67$ và $\Delta r_{\text{m(LOO)}}^2 = 0,13\text{--}0,18$ trên tập huấn luyện; $Q_{\text{F1}}^2 = 0,78\text{--}0,80$; $\text{MAE} = 0,16\text{--}0,19$; $\overline{r_{\text{m}}^2} = 0,63\text{--}0,69$; $\Delta r_{\text{m}}^2 = 0,17\text{--}0,20$ và $\text{CCC} = 0,85\text{--}0,88$ trên tập kiểm tra). Sự tương quan giữa giá trị hoạt tính dự đoán và thực nghiệm được minh họa ở **Hình PL23.3, PHỤ LỤC 23**. Miền ứng dụng của 5 mô hình được xác định bằng phương pháp DModX và minh họa tại **Hình PL23.4, PHỤ LỤC 23**. Phương pháp Y-ngẫu nhiên 100 lần đã được thực hiện và kết quả cho thấy các mô hình thu được không phải do ngẫu nhiên (**Hình PL23.5, PHỤ LỤC 23**).

Bảng 3.6. Các mô hình QSAR-HB dự đoán hoạt tính ức chế IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33 sử dụng thông số mô tả phân tử 2D

Phương trình PLS và các chỉ số đánh giá mô hình
Mô hình QSAR-HB-M1 (phân chia Kennard-Stone, $n_{train} = 62$, $n_{test} = 16$, $LV = 6$) $pIC_{50(HB)} = 2,81549 + 0,13958 \times VE3sign_D/Dt + 0,01098 \times P_VSA_s_4 + 0,13028 \times SM14_AEA(dm) - 0,24552 \times CATS2D_09_AA - 0,2938 \times F07[O-O] + 0,00187 \times ATSC7dv - 0,00474 \times ATSC7i$ Train: $R^2 = 0,81$; $Q_{LOO}^2 = 0,76$; $\overline{r_{m(LOO)}^2} = 0,67$; $\Delta r_{m(LOO)}^2 = 0,16$; $MAE = 0,13$; $MAE_{LOO} = 0,15$ Test: $Q_{F1}^2 = 0,78$; $Q_{F2}^2 = 0,77$; $\overline{r_m^2} = 0,68$; $\Delta r_m^2 = 0,18$; $MAE = 0,18$; $CCC = 0,87$ Phân chia theo thời gian ($n_{train} = 50$, $n_{test} = 28$, $LV = 6$) Train: $R^2 = 0,69$; $Q_{LOO}^2 = 0,59$; $MAE = 0,15$; Test: $Q_{F1}^2 = 0,93$; $MAE = 0,13$
Mô hình QSAR-HB-M2 (phân chia Kennard-Stone, $n_{train} = 62$, $n_{test} = 16$, $LV = 5$) $pIC_{50(HB)} = 3,31414 + 0,1673 \times VE3sign_D/Dt - 0,28314 \times VE1_B(p) + 0,01028 \times P_VSA_s_4 + 0,23636 \times SM14_AEA(dm) - 0,10091 \times SsssNH+ - 0,32146 \times CATS2D_09_AA - 0,24679 \times F07[O-O]$ Train: $R^2 = 0,81$; $Q_{LOO}^2 = 0,75$; $\overline{r_{m(LOO)}^2} = 0,65$; $\Delta r_{m(LOO)}^2 = 0,13$; $MAE = 0,14$; $MAE_{LOO} = 0,16$ Test: $Q_{F1}^2 = 0,79$; $Q_{F2}^2 = 0,78$; $\overline{r_m^2} = 0,66$; $\Delta r_m^2 = 0,19$; $MAE = 0,19$; $CCC = 0,87$ Phân chia theo thời gian ($n_{train} = 50$, $n_{test} = 28$, $LV = 3$) Train: $R^2 = 0,70$; $Q_{LOO}^2 = 0,57$; $MAE = 0,16$; Test: $Q_{F1}^2 = 0,88$; $MAE = 0,18$
Mô hình QSAR-HB-M3 (phân chia Kennard-Stone, $n_{train} = 62$, $n_{test} = 16$, $LV = 3$) $pIC_{50(HB)} = 2,12495 + 0,1853 \times VE3sign_D/Dt + 0,00567 \times P_VSA_LogP_2 + 0,01135 \times P_VSA_s_4 - 0,18725 \times CATS2D_09_AA - 0,22452 \times F07[O-O] + 0,0019 \times ATSC7dv + 0,01889 \times TSRW10$ Train: $R^2 = 0,80$; $Q_{LOO}^2 = 0,75$; $\overline{r_{m(LOO)}^2} = 0,64$; $\Delta r_{m(LOO)}^2 = 0,18$; $MAE = 0,13$; $MAE_{LOO} = 0,15$ Test: $Q_{F1}^2 = 0,79$; $Q_{F2}^2 = 0,78$; $\overline{r_m^2} = 0,64$; $\Delta r_m^2 = 0,19$; $MAE = 0,17$; $CCC = 0,87$ Phân chia theo thời gian ($n_{train} = 50$, $n_{test} = 28$, $LV = 6$) Train: $R^2 = 0,68$; $Q_{LOO}^2 = 0,57$; $MAE = 0,15$; Test: $Q_{F1}^2 = 0,88$; $MAE = 0,18$
Mô hình QSAR-HB-M4 (phân chia Kennard-Stone, $n_{train} = 62$, $n_{test} = 16$, $LV = 5$) $pIC_{50(HB)} = -2,49652 + 0,10992 \times VE3sign_D/Dt + 0,01448 \times P_VSA_s_4 + 0,02063 \times SssCH2 - 0,14833 \times SsssNH+ - 0,41443 \times CATS2D_09_AA + 0,34338 \times B06[N-N] + 0,03482 \times AATS8i$ Train: $R^2 = 0,81$; $Q_{LOO}^2 = 0,72$; $\overline{r_{m(LOO)}^2} = 0,62$; $\Delta r_{m(LOO)}^2 = 0,16$; $MAE = 0,14$; $MAE_{LOO} = 0,17$ Test: $Q_{F1}^2 = 0,78$; $Q_{F2}^2 = 0,76$; $\overline{r_m^2} = 0,63$; $\Delta r_m^2 = 0,20$; $MAE = 0,19$; $CCC = 0,85$ Phân chia theo thời gian ($n_{train} = 50$, $n_{test} = 28$, $LV = 3$) Train: $R^2 = 0,66$; $Q_{LOO}^2 = 0,53$; $MAE = 0,16$; Test: $Q_{F1}^2 = 0,85$; $MAE = 0,21$
Mô hình QSAR-HB-M5 (phân chia Kennard-Stone, $n_{train} = 62$, $n_{test} = 16$, $LV = 5$) $pIC_{50(HB)} = 3,18868 + 0,16897 \times VE3sign_D/Dt + 0,01316 \times P_VSA_s_4 + 0,00845 \times P_VSA_ppp_P - 0,21962 \times CATS2D_09_AA - 0,25625 \times F07[O-O] + 0,00204 \times ATSC7dv + 0,01617 \times VR3_Dzs$ Train: $R^2 = 0,77$; $Q_{LOO}^2 = 0,71$; $\overline{r_{m(LOO)}^2} = 0,60$; $\Delta r_{m(LOO)}^2 = 0,18$; $MAE = 0,14$; $MAE_{LOO} = 0,16$ Test: $Q_{F1}^2 = 0,80$; $Q_{F2}^2 = 0,79$; $\overline{r_m^2} = 0,69$; $\Delta r_m^2 = 0,17$; $MAE = 0,16$; $CCC = 0,88$ Phân chia theo thời gian ($n_{train} = 50$, $n_{test} = 28$, $LV = 5$) Train: $R^2 = 0,63$; $Q_{LOO}^2 = 0,50$; $MAE = 0,16$; Test: $Q_{F1}^2 = 0,93$; $MAE = 0,13$

Bên cạnh đó, phép phân chia dữ liệu theo thời gian cũng được thực hiện (**Bảng PL23.2, PHỤ LỤC 23**) và kết quả cho thấy các bộ 7 thông số mô tả phân tử đều cho các mô hình có thể dự đoán tốt trên tập kiểm tra với $Q_{F1}^2 = 0,85-0,93$ và $MAE = 0,13-0,21$ (**Bảng 3.6**). Các mô hình QSAR được đưa vào công cụ dự đoán đồng thuận và kết quả tại **Bảng PL23.3, PHỤ LỤC 23** cho thấy mô hình CM-0 cho kết quả tốt nhất trong cả hai phép chia dữ liệu ($Q_{F1}^2 = 0,91-0,95$ và $MAE = 0,12-0,16$).

3.5. Thử nghiệm *in vitro* đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2

3.5.1. Sàng lọc *in silico* chất ức chế IL-33/ST2 từ thư viện hợp chất nội bộ và lựa chọn hợp chất tiềm năng cho thử nghiệm *in vitro*

3.5.1.1. Kết quả sàng lọc thư viện hợp chất nội bộ qua các mô hình *in silico*

Thư viện hóa học nội bộ thu thập từ Bộ môn Hóa Dược, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh được sử dụng để sàng lọc qua các mô hình *in silico* nhằm tìm kiếm các hợp chất có tiềm năng ức chế tương tác IL-33/ST2. Thư viện chứa 825 hợp chất thuộc các khung cấu trúc đa dạng như flavonoid (chalcon, auron, flavon, flavanol, flavanon); hợp chứa dị vòng morpholin, pyrazol, pyrimidin, imidazol, triazol, oxadizol, benzimidazol; hợp chất chứa thiosemicarbazon, hydrazon, allylamin, sulfonamid; một số hoạt chất hóa dược và các hợp chất được phân lập từ tự nhiên. Sự phân bố các tính chất lý hóa và tính đa dạng về cấu trúc của các hợp chất trong thư viện được minh họa tại **Hình PL24.1, PHỤ LỤC 24**. Các hợp chất trong thư viện được sàng lọc qua các mô hình pharmacophore đã xây dựng trong đề tài, với kết quả được trình bày tại **Bảng 3.7**. Các chất thỏa mãn mô hình pharmacophore được tiếp tục mô phỏng gắn kết vào vị trí tương ứng trên protein và kết quả được trình bày tại **Bảng PL24.1, PL24.2, PL24.3 và PL24.4, PHỤ LỤC 24**.

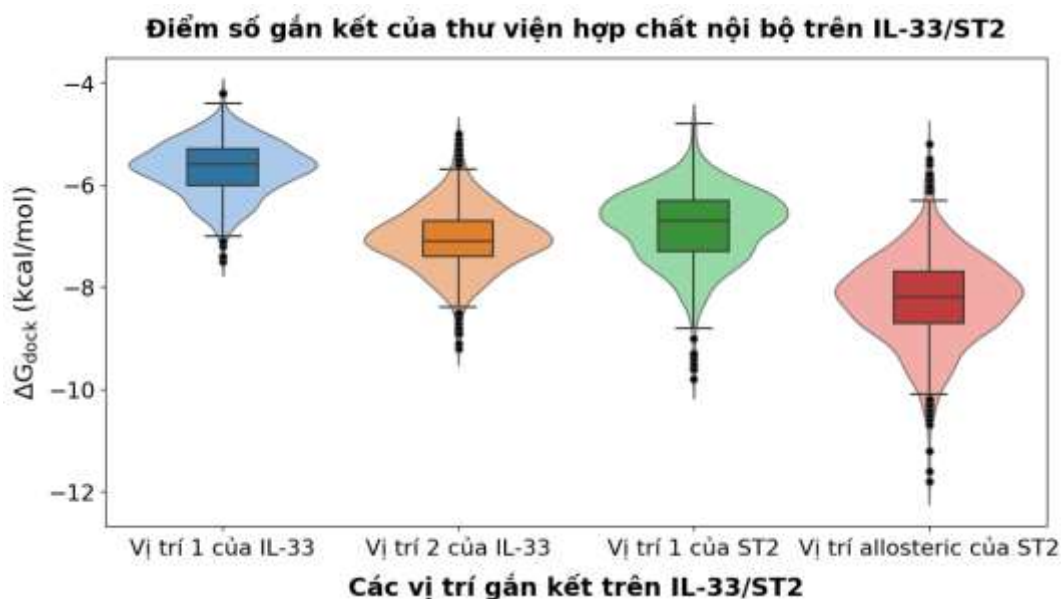
Bảng 3.7. Kết quả sàng lọc thư viện hợp chất nội bộ qua các mô hình pharmacophore

Vị trí trên IL-33/ST2	Mô hình	Số chất thỏa mô hình	Sự phân bố điểm số gắn kết (kcal/mol)
Vị trí 1 trên IL-33	PH4-IL33-S1-M1	0	-
	PH4-IL33-S1-M2	1	$\Delta G_{\text{dock IL-33}} = -7,0$
Vị trí 1 trên ST2	PH4-ST2-S1-M1	0	-
	PH4-ST2-S1-M2	1	$\Delta G_{\text{dock ST2}} = -8,5$
	PH4-LB-iST2	142	$\Delta G_{\text{dock ST2}} = -9,8$ đến $-5,8$
Vị trí 2 trên IL-33	PH4-IL33-S2-M1	68	$\Delta G_{\text{dock IL-33}} = -7,6$ đến $-6,3$
	PH4-IL33-S2-M2	0	-

Thư viện cũng được sàng lọc qua truy vấn ROCS-iIL33-6, thu được điểm số tương đồng Tanimoto tổng thể từ 0,514 đến 1,237. Các hợp chất có điểm số $>0,75$ tiếp tục được mô phỏng gắn kết vào vị trí 2 của IL-33, với giá trị $\Delta G_{\text{dock IL-33}}$ từ $-8,8$ đến $-5,1$ kcal/mol (**Bảng PL24.5, PHỤ LỤC 24**). Sàng lọc qua các mô hình QSAR-

HB để dự đoán hoạt tính ức chế IL-33/ST2 trên dòng tế bào HB, 128 hợp chất được dự đoán đồng thuận có giá trị $pIC_{50(HB)}$ tốt hơn hợp chất đối chứng dương iST2-1 (**Bảng PL24.6, PHỤ LỤC 24**).

Vị trí allosteric của thụ thể ST2 là một túi gắn kết tiềm năng. Do đó, toàn bộ các chất trong thư viện nội bộ được mô phỏng gắn kết tại vị trí này. Để so sánh, thư viện cũng được mô phỏng gắn kết trên IL-33 và ST2 tại các vị trí orthosteric. Biểu đồ tại **Hình 3.26** cho thấy sự phân phối điểm số gắn kết của các hợp chất từ thư viện nội bộ với túi allosteric của thụ thể ST2 là tốt nhất, với ΔG_{dock} từ $-11,8$ đến $-5,2$ kcal/mol.



Hình 3.26. Sự phân bố điểm số gắn kết của các hợp chất trong thư viện nội bộ với IL-33 và ST2 tại các vị trí trong mô phỏng gắn kết phân tử với Autodock Vina

Cấu dạng gắn kết tốt nhất của mỗi hợp chất trên 4 vị trí của IL-33 và ST2 được đưa vào chương trình HYDE để tính điểm lại (**Hình PL24.2, PHỤ LỤC 24**). Trong đó, túi allosteric của ST2 và túi ẩn tại vị trí 2 của IL-33 là những vị trí có các phối tử gắn kết với K_i HYDE hàng picomol. Đặc biệt, nhóm dẫn chất quercetin thể hiện khả năng kết tốt tại vị trí allosteric của ST2. Phức hợp của thụ thể và các phối tử dẫn đầu gồm T721, T718 được mô phỏng MD 100 ns. Kết quả tại **PHỤ LỤC 25** cho thấy hai hợp chất này gắn kết ổn định tại túi allosteric và có $\Delta G_{gắn kết}$ MM-GBSA lần lượt là $-41,7 \pm 3,4$ và $-41,9 \pm 4,3$ kcal/mol.

3.5.1.2. Lựa chọn hợp chất cho thử nghiệm *in vitro*

Với sự định hướng từ kết quả sàng lọc *in silico* và sự sẵn có của các hợp chất trong thư viện nội bộ, 32 hợp chất tại **Bảng 3.8** được đưa vào thử nghiệm *in vitro* đánh giá tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2. Thông tin bổ sung về cấu trúc hóa học, tính chất và độ tinh khiết của các hợp chất được trình bày tại **PHỤ LỤC 26**.

Bảng 3.8. Các hợp chất được lựa chọn để đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2 *in vitro*

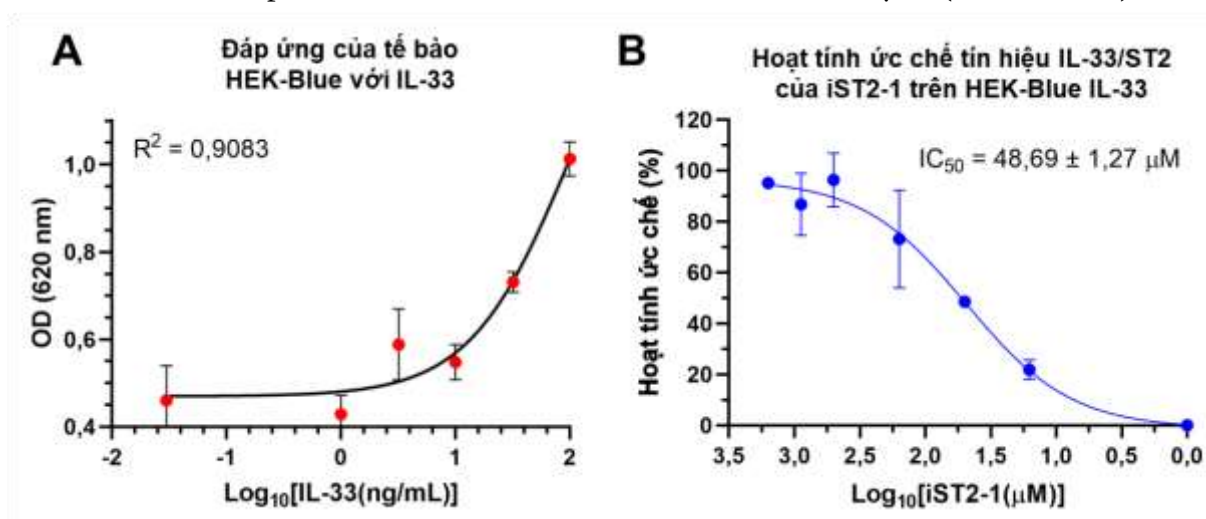
Hợp chất	Nhóm cấu trúc	Thỏa mô hình <i>in silico</i>	ΔG_{dock} (kcal/mol)	K_i HYDE*	
T789	Hợp chất tự nhiên	PH4-IL33-M2	$\Delta G_{\text{dock IL-33-S1}} = -7,0$	4,74 mM	
		PH4-ST2-S1-M2	$\Delta G_{\text{dock ST2-ortho}} = -8,5$	4,48 M	
T712	Dẫn chất quercetin	PH4-LB-iST2	$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -10,2$	328,0 nM	
T713			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -8,0$	259,9 nM	
T714			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -8,2$	69,6 nM	
T715			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -8,1$	1,9 nM	
T716			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -10,5$	228,1 nM	
T717			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -10,1$	64,2 nM	
T718		Gắn kết ái lực cao trên túi allosteric của thụ thể ST2	$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -11,6$	72,9 pM	
T719			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -11,2$	9,2 nM	
T720			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -9,8$	185,8 nM	
T721			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -11,8$	60,1 pM	
T723			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -7,6$	1,5 nM	
T724			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -8,2$	26,1 nM	
T725			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -8,8$	434,6 pM	
T726			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -7,5$	25,2 nM	
T822			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -10,3$	154,5 μ M	
T823			$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -10,6$	26,2 nM	
T296			Gắn kết phân tử trên ST2	$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -9,5$	15,43 nM
T824				$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -10,3$	24,18 nM
T825				$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -9,3$	90,3 μ M
T577	2-Aminopyrimidin	ROCS-iIL33-6 (TC = 1,020)	$\Delta G_{\text{dock IL-33-S2}} = -7,8^\dagger$	13,98 μ M	
T814	Hoạt chất hóa dược (loratadin)	ROCS-iIL33-6 (TC = 0,822)	$\Delta G_{\text{dock IL-33-S2}} = -9,8^\dagger$	8,4 μ M	
T815	Hoạt chất hóa dược (rupatadin)	ROCS-iIL33-6 (TC = 0,775)	$\Delta G_{\text{dock IL-33-S2}} = -10,1^\dagger$	188 nM	
		PH4-LB-iST2 (RMSD = 1,12 Å)	$\Delta G_{\text{dock ST2-ortho}} = -9,4$ $\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -10,0$	- -	
T821	Hoạt chất hóa dược (montelukast)	Gắn kết phân tử trên IL-33	$\Delta G_{\text{dock IL-33-S2}} = -8,9^\dagger$	33 nM	
		PH4-LB-iST2	$\Delta G_{\text{dock ST2-ortho}} = -7,2$	2,3 μ M	
		QSAR-HB	$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -8,6$	2,3 nM	
T651	Morpholinoalkoxychalcon	PH4-IL33-S2-M1	$\Delta G_{\text{dock IL-33-S2}} = -8,5^\dagger$	18,1 nM	
		Cấu dạng 3D	$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -7,5$	1,0 μ M	
T655	Morpholinoalkoxychalcon	tương đồng mô hình	$\Delta G_{\text{dock IL-33-S2}} = -7,4^\dagger$	6,2 μ M	
		PH4-LB-iST2	$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -8,0$	1,4 μ M	
T520	6-Alkoxyauron	PH4-LB-iST2	$\Delta G_{\text{dock ST2-ortho}} = -6,5$ $\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -7,5$	8,1 mM 7,7 μ M	
T521	6-Alkoxyauron	Cấu dạng 3D tương đồng mô hình	$\Delta G_{\text{dock ST2-ortho}} = -6,7$ $\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -5,2$	3,0 μ M 30,8 μ M	
T813	6-Alkoxyauron		PH4-LB-iST2	$\Delta G_{\text{dock ST2-ortho}} = -6,7$ $\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -7,4$	698 mM 3,7 nM
T491	4,6-dihydroxyauron	Gắn kết ái lực cao trên túi allosteric của thụ thể ST2	$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -10,7$	0,86 nM	
T802	4-hydroxyauron		$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -9,1$	1,57 nM	
T805	4,6-dihydroxyauron		$\Delta G_{\text{dock ST2-allo}} = -9,1$	0,61 nM	

* Ái lực HYDE được ước tính từ cấu dạng mô phỏng gắn kết; † Điểm số mô phỏng gắn kết linh động. IL-33-S2: vị trí 2 tại PPI của IL-33; ST2-ortho và ST2-allo: vị trí orthosteric và allosteric của ST2.

3.5.2. Đánh giá hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33 của các hợp chất từ thư viện nội bộ

3.5.2.1. Đáp ứng của tế bào HEK-Blue IL-33 với IL-33 tái tổ hợp và xác định hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 của hợp chất iST2-1

Trước khi được sử dụng cho các thử nghiệm *in vitro*, protein IL-33 người sản xuất bằng phương pháp tái tổ hợp được đánh giá chức năng thông qua tác động kích thích tế bào HB. **Hình 3.27A** cho thấy sự đáp ứng phụ thuộc nồng độ của tế bào với IL-33. Sau đó, IL-33 nồng độ 100 ng/mL được sử dụng cho thử nghiệm khảo sát hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên tế bào HB. Quy trình được áp dụng để xác định hoạt tính của hợp chất iST2-1, thu được $IC_{50} = 48,69 \pm 1,27 \mu M$ (**Hình 3.27B**).

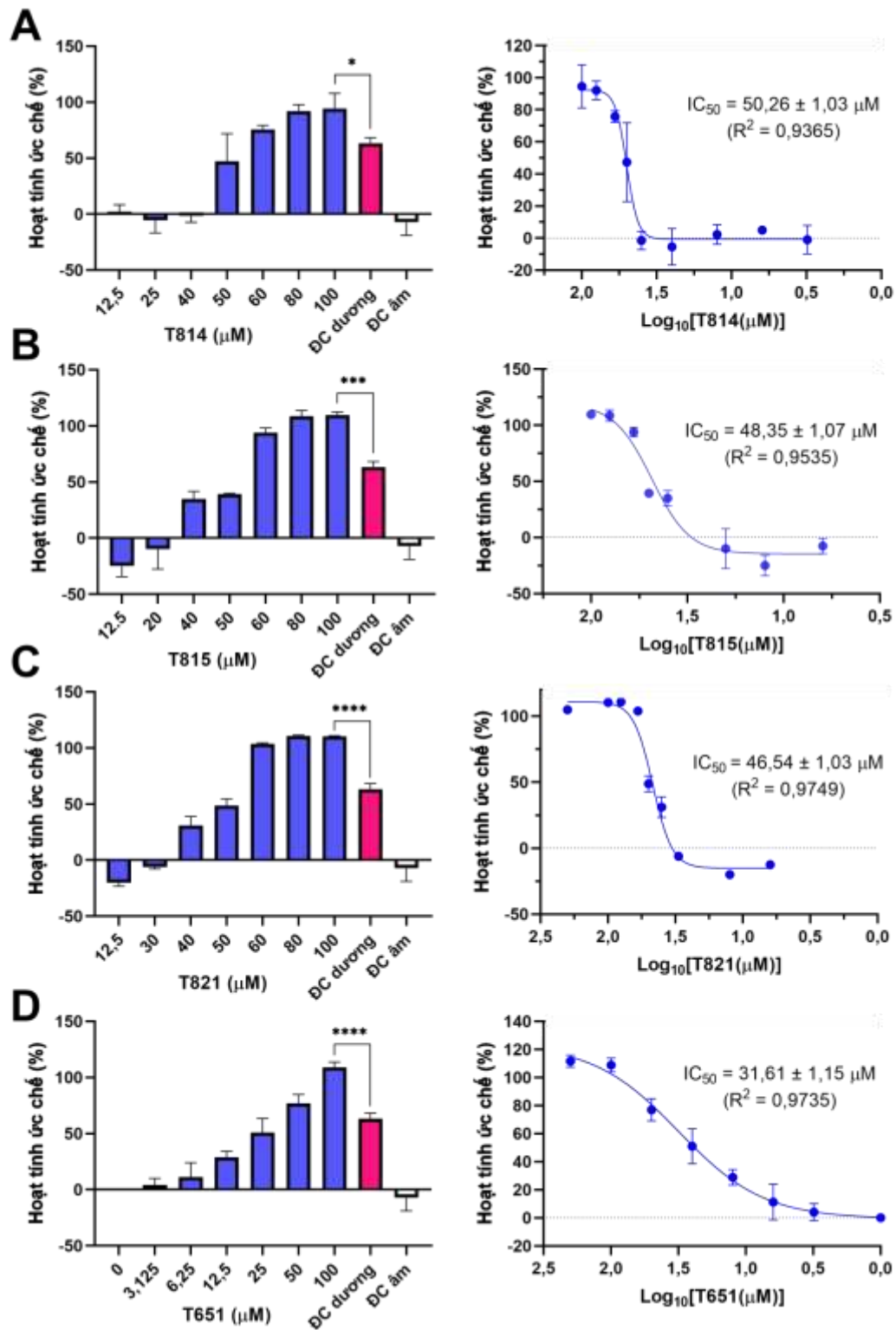


Hình 3.27. Đánh giá mô hình thử nghiệm *in vitro* khảo sát tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33

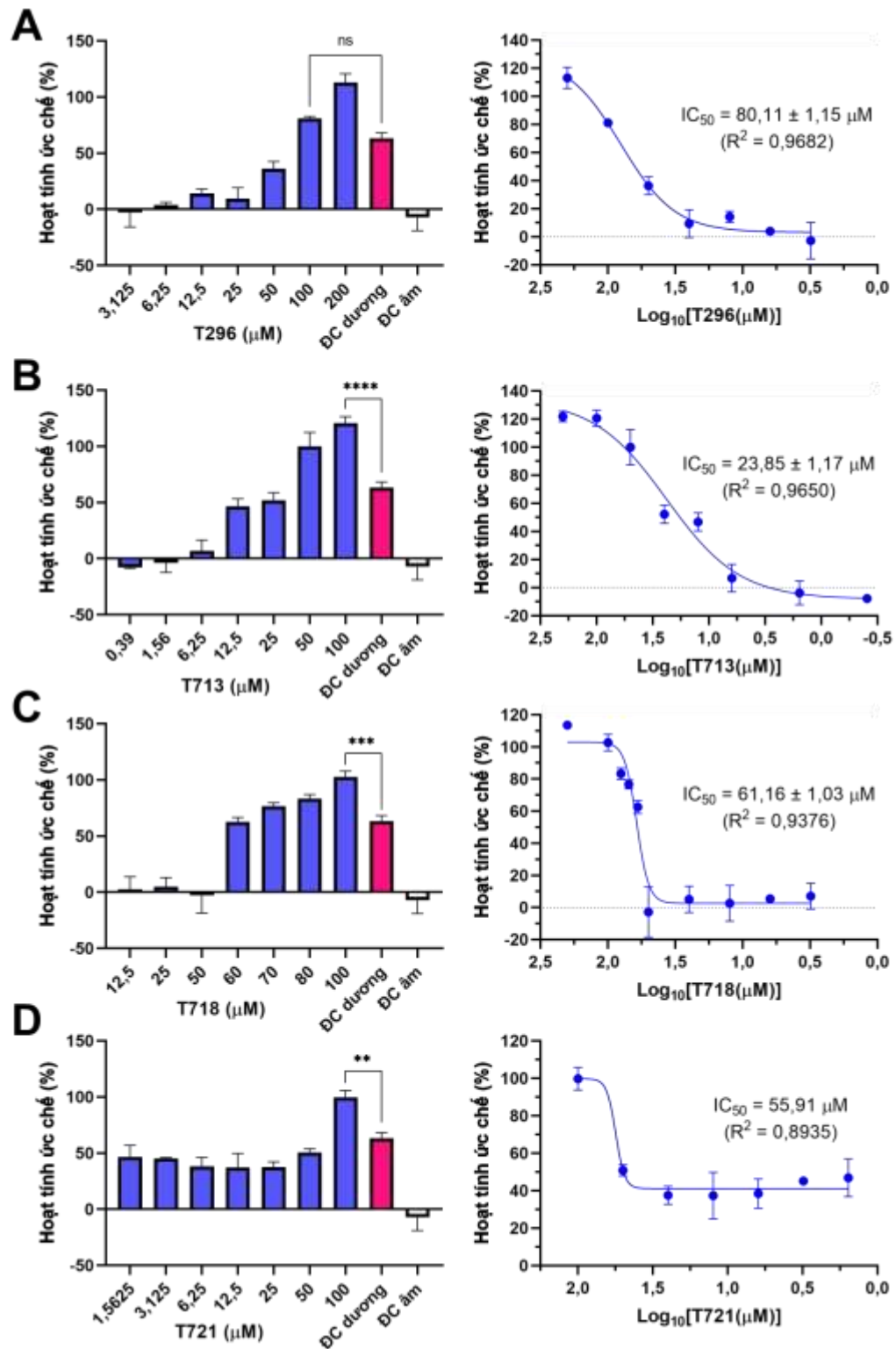
(A) Đáp ứng kích thích phụ thuộc nồng độ của tế bào với IL-33 (n = 3). (B) Hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên tế bào phụ thuộc nồng độ của hợp chất iST2-1 (n = 3).

3.5.2.2. Khảo sát hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33 của các hợp chất từ thư viện nội bộ

Các hợp chất thử nghiệm được đánh giá ban đầu hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên tế bào HB ở nồng độ 100 μM , với kết quả được trình bày tại **PHỤ LỤC 27**. Trong đó, một số hợp chất tiềm năng có hoạt tính ức chế tốt hơn đối chứng dương (%I = $63,5 \pm 3,9\%$) được tiếp tục thử nghiệm đánh giá tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 phụ thuộc nồng độ. Các chất này thuộc 3 nhóm chính, gồm 3 hoạt chất hóa dược (T814 – loratadin, T815 – rupatadin, T821 – montelukast), dẫn chất morpholinoalkoxychalcon (T651) và 4 dẫn chất quercetin (T296, T713, T718, T721). Qua đó, giá trị IC_{50} của các hợp chất được xác định và đường cong ức chế theo nồng độ được minh họa tại **Hình 3.28** và **Hình 3.29**.



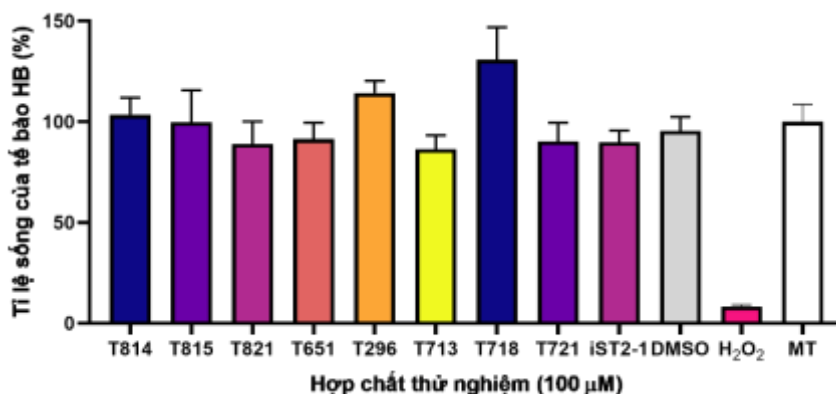
Hình 3.28. Tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên tế bào HB của các hoạt chất hóa được và dẫn chất morpholinalkoxychalcon từ thư viện hợp chất nội bộ (A) T814: loratadin, (B) T815: rupatadin, (C): T821: montelukast và (D): T651. ĐC: đối chứng, đối chứng dương là iST2-1 100 μM , đối chứng âm là DMSO 0,2%, thí nghiệm được lặp lại 3 lần (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).



Hình 3.29. Tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên tế bào HB một số dẫn chất quercetin (A) T296, (B) T713, (C) T718 và (D) T721. ĐC: đối chứng, đối chứng dương là iST2-1 nồng độ 100 μM , đối chứng âm là DMSO nồng độ 0,2%, thí nghiệm được lặp lại 3 lần (ns: không có ý nghĩa thống kê; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

3.5.2.3. Đánh giá khả năng gây độc tế bào HB của các hợp chất thử nghiệm

Thử nghiệm MTT được thực hiện để khảo sát tác động làm giảm hoạt tính SEAP của các hợp chất thử nghiệm là do ức chế con đường tín hiệu IL-33/ST2 hay do khả năng gây độc đối với tế bào HB. Tỷ lệ tế bào sống được trình bày tại **Hình 3.30**.



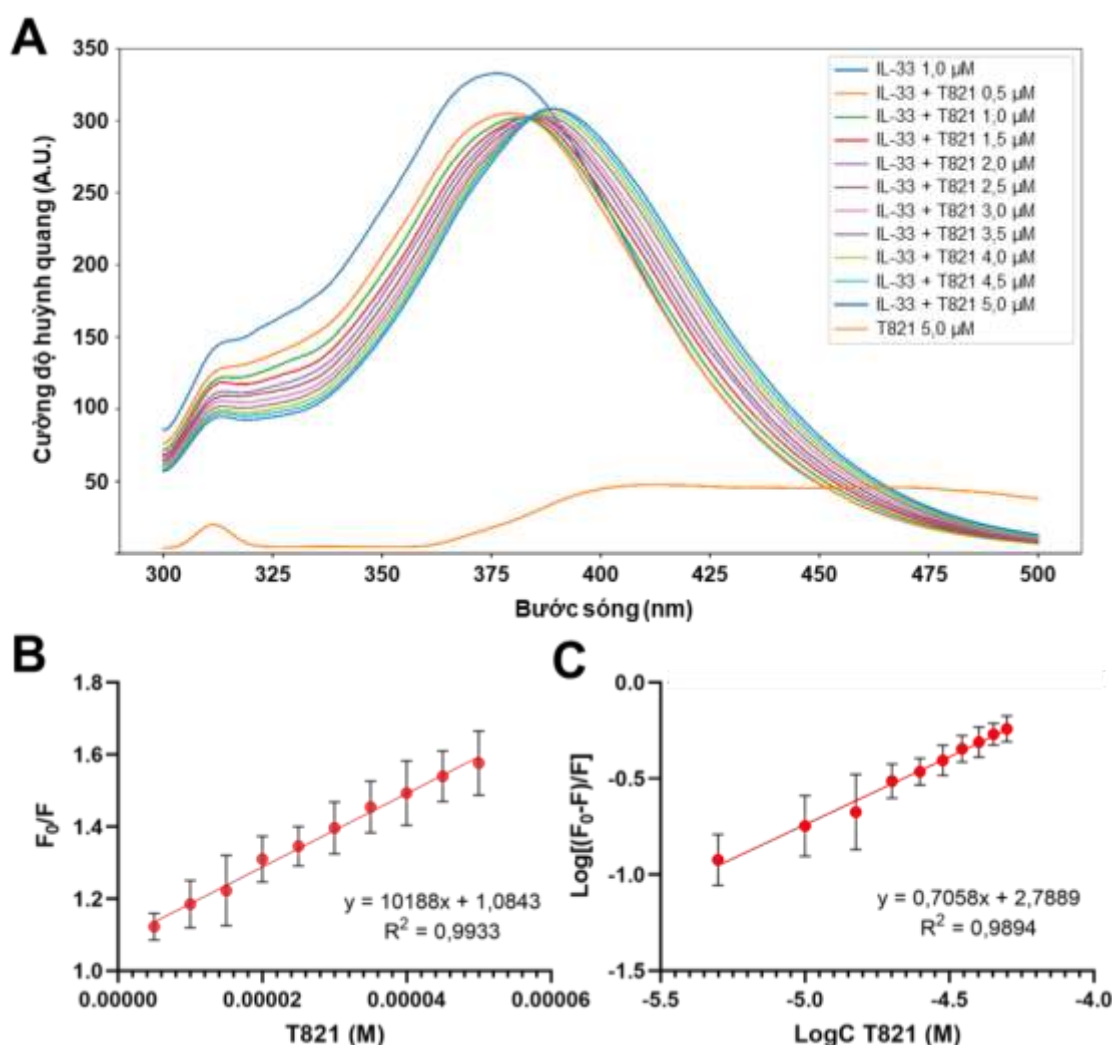
Hình 3.30. Tỷ lệ sống của tế bào HB khi được xử lý với các hợp chất ở nồng độ 100 μ M trong thử nghiệm MTT (các mẫu chứng: môi trường (MT), H₂O₂ 5mM, DMSO 0,2%)

3.5.3. Đánh giá khả năng gắn kết của phức tử phân tử nhỏ trên IL-33

Dung dịch IL-33 nồng độ 1 μ M trong đệm PBS được quét phổ 3 chiều bước sóng kích thích–phát xạ. **Hình PL28.1, PHỤ LỤC 28** cho thấy IL-33 cho phát xạ cực đại tại bước sóng 370 nm khi được kích thích ở bước sóng 280 nm. Do đó, bước sóng kích thích $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm được sử dụng để quét phổ bước sóng phát xạ λ_{em} trong khoảng 300–500 nm nhằm khảo sát sự phát huỳnh quang của IL-33 khi có mặt phức tử phân tử nhỏ. Hợp chất thử nghiệm được lựa chọn là T821 (montelukast), với nồng độ khảo sát từ 0,5–5,0 μ M. Để đánh giá hiệu ứng lọc nội tại của phức tử đối với thử nghiệm, phổ UV-Vis của T821 trong dải bước sóng và tại các nồng độ khảo sát được đo và trình bày tại **Hình PL28.2, PHỤ LỤC 28**. Kết quả cho thấy tại bước sóng kích thích $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm và trong dải bước sóng phát xạ $\lambda_{\text{em}} = 300$ –500 nm của IL-33, độ hấp thụ UV-Vis của T821 đều thấp hơn 0,1 và cho thấy hiệu ứng lọc nội tại ít ảnh hưởng. Do đó, sự điều chỉnh cường độ phát quang theo hiệu ứng này là không cần thiết.

Sau đó, phổ phát xạ huỳnh quang của IL-33 được đo với sự chuẩn độ T821 từ 0–5,0 μ M. Đồng thời, cường độ phát huỳnh quang riêng phần của T821 cũng được đo và kết quả được trình bày tại **Hình 3.31A**. Với sự tăng dần các nồng độ ban đầu của hợp chất thử nghiệm, cường độ phát huỳnh quang của IL-33 giảm dần, đồng thời có “sự dịch chuyển đỏ” của bước sóng phát xạ huỳnh quang cực đại (từ 370 nm). Tuy nhiên, khi càng tăng nồng độ của T821, cường độ phát huỳnh quang của dung dịch tăng bởi sự phát huỳnh quang tăng dần của phức tử từ 370–400 nm. Do sự ảnh hưởng này, cường độ phát huỳnh quang của dung dịch thử nghiệm được ghi nhận ở một đỉnh

phụ có bước sóng 320 nm để đánh giá khả năng làm tắt quang của T821 đối với IL-33. Biểu đồ Stern-Volmer của T821 được lập tại **Hình 3.31B** cho thấy sự tương quan của giá trị F_0/F với nồng độ hợp chất thử nghiệm ($R^2 = 0,9933$). Hệ số góc của phương trình là 10.188, giúp ước tính $k_q = 1,01 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Giá trị này lớn hơn rất nhiều so với k_q của tắt quang động ($2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), xác nhận đây là sự tắt quang tĩnh và có sự hình thành phức hợp giữa IL-33/T821 ở trạng thái nền. Biểu đồ Stern-Volmer biến đổi được lập tại **Hình 3.31C** cho thấy sự tương quan của giá trị $\log[(F_0 - F)/F]$ với $\log C$ của T821 ($R^2 = 0,9894$). Từ phương trình hồi quy, tỉ lệ gắn kết (n) giữa protein-phối tử gần bằng 1, logarit của hằng số kết hợp K_a bằng 2,7889. Từ đó, hằng số phân ly K_d được ước tính là $1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$.



Hình 3.31. Sự hình thành phức hợp giữa hợp chất T821 và IL-33 được xác định bởi cơ chế tắt quang tĩnh trong thử nghiệm sử dụng quang phổ huỳnh quang (A) Phổ phát xạ huỳnh quang của IL-33 nồng độ 1 μM khi được chuẩn độ bằng T821 với các nồng độ khác nhau và phổ phát xạ huỳnh quang của T821 nồng độ 5 μM . (B) Phương trình Stern-Volmer biểu diễn giá trị F_0/F theo nồng độ của T821. (C) Phương trình Stern-Volmer biến đổi biểu diễn giá trị $\log[(F_0 - F)/F]$ theo logarit nồng độ của T821.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Cơ sở dữ liệu cấu trúc hóa học định hướng cho nghiên cứu sàng lọc *in silico* chất ức chế PPI

Với mục tiêu sử dụng phương pháp sàng lọc ảo để tìm kiếm các hợp chất phân tử nhỏ ức chế tương tác IL-33/ST2, sự có sẵn của một cơ sở dữ liệu lớn là điều kiện cần thiết để gia tăng cơ hội thành công. Quy trình sàng lọc ảo trong đề tài này bắt đầu bằng mô hình pharmacophore, vốn đòi hỏi các tập cơ sở dữ liệu phải được tìm kiếm cấu dạng 3D cho từng hợp chất. Hiện nay, hai công cụ trực tuyến cung cấp cơ sở dữ liệu hóa học được tạo sẵn cấu dạng là ZINCPharmer và PharmIT.^{171,172} Cả hai đều là các công cụ tiện dụng, cho phép người dùng sử dụng mô hình pharmacophore để sàng lọc trực tiếp trên giao diện web.

Tuy nhiên, nhược điểm chính của các công cụ nói trên là: (i) không chấp nhận các mô hình pharmacophore chứa các điểm logic và ràng buộc, (ii) không tương thích với một số đặc tính pharmacophore được tạo bởi các phần mềm thiết kế thuốc thông dụng, (iii) sử dụng các thư viện hóa học có tính tổng quát và thiếu cập nhật. Để giải quyết những hạn chế này, tạo ra tính linh hoạt cao trong việc ứng dụng mô hình pharmacophore và tăng tính chuyên biệt cho nghiên cứu chất ức chế PPI, một cơ sở dữ liệu được vận hành trên máy tính cục bộ để giao tiếp trực tiếp với các phần mềm thiết kế thuốc là giải pháp hữu ích. Từ đề tài này, một bộ cơ sở dữ liệu đáp ứng các tiêu chí kể trên đã được xây dựng. Cơ sở dữ liệu chứa các thư viện hóa học được định hướng cho nghiên cứu PPI bởi các nhà cung cấp hóa chất phổ biến như Enamine, ChemDiv, Asinex và Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI). Điểm đặc biệt của bộ cơ sở dữ liệu này là các đồng phân quang học được tạo ra nếu các hợp chất trong thư viện ban đầu có chứa các nguyên tử bất đối xứng. Khi sử dụng để sàng lọc, người dùng có thể biết dạng đồng phân nào của hợp chất tiềm năng cho khả năng gắn kết tốt nhất trên protein mục tiêu. Các hợp chất trong cơ sở dữ liệu đã được tìm kiếm tập hợp cấu dạng 3D năng lượng thấp bằng OMEGA – một chương trình được chứng minh khả năng tạo cấu dạng 3D chất lượng cao.²⁴³ Bên cạnh đó, không như ZINCPharmer hay PharmIT chỉ được sử dụng để sàng lọc qua mô hình pharmacophore, bộ cơ sở dữ liệu được tạo ra trong nghiên cứu này còn có thể được ứng dụng cho các mục đích khác như mô phỏng gắn kết lượng lớn, sàng lọc qua truy vấn tương đồng hình dạng 3 chiều và dự đoán hoạt tính qua mô hình QSAR, mô hình học máy và học sâu. Tuy nhiên, người sử dụng cần chú ý rằng các thư viện hóa học có thể chứa một số hợp chất giống nhau nên cần loại bỏ trùng lặp trong kết quả sàng lọc ảo khi sử dụng bộ cơ sở dữ liệu này.

4.2. Khảo sát PPI của IL-33/ST2 và xác định các vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ trên mỗi protein bằng các công cụ máy tính

4.2.1. Sự cần thiết của việc khảo sát PPI và xác định vị trí gắn kết

Xác định các vị trí gắn kết phù hợp cho phối tử phân tử nhỏ trên các mục tiêu PPI là công việc tiên quyết trước khi thực hiện tất cả các thiết kế và xây dựng mô hình sàng lọc *in silico*. Đối với các phức hợp PPI đã được xác định cấu trúc không gian và công bố tại PDB, vị trí được nhắm mục tiêu đầu tiên chính là bề mặt tương tác giữa hai protein. Những giao diện này thường khá rộng và đặt ra nhu cầu xác định các acid amin điểm nóng để làm nền tảng cho các phương pháp thiết kế thuốc dựa trên cấu trúc mục tiêu. PPI của IL-33/ST2 là trường hợp mà một số acid amin điểm nóng đã được xác định bằng phương pháp thực nghiệm. Tuy nhiên, những dữ liệu này không phải bao giờ cũng sẵn có, đặc biệt ở các loại cytokin khác và hàng ngàn PPI tồn tại trong cơ thể người vốn chưa được khảo sát.

Đối với IL-33 và ST2, mặc dù các nghiên cứu đi trước đã đặt ra những tiền đề nhất định cho thiết kế thuốc,^{46,47} nhưng số lượng acid amin điểm nóng được khảo sát bằng phương pháp thực nghiệm còn giới hạn. Bên cạnh đó, các bề mặt của những vị trí PPI này có điểm số “phù hợp để làm thuốc” (druggability) còn khiêm tốn để có thể gắn kết ái lực cao với phối tử phân tử nhỏ, dù chỉ là trong mô phỏng gắn kết phân tử. Trong đề tài này, để giải quyết những tồn tại kể trên, một khảo sát toàn diện đã được thực hiện trên IL-33 và ST2 để phát hiện những vị trí gắn kết phù hợp nhằm phục vụ cho quá trình nghiên cứu chất ức chế phân tử nhỏ.

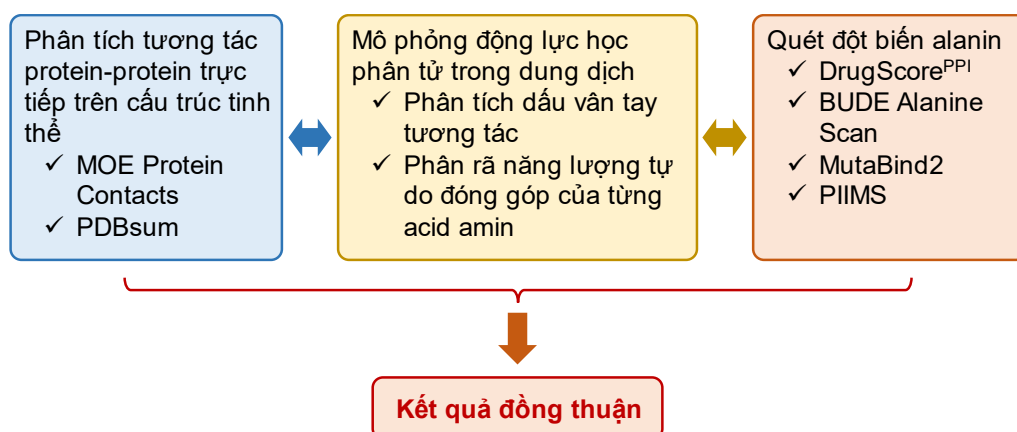
Là điểm bắt đầu của quá trình CADD, một cấu trúc 3D chất lượng cao của protein góp phần quan trọng cho tính chính xác của tất cả các dự đoán. Vì vậy, cấu trúc của IL-33 và ST2 đã được tinh chỉnh để đạt các chỉ số đánh giá chất lượng cao hơn so với mô hình cấu trúc tinh thể ban đầu (**Hình PL8.1** và **Bảng PL8.1, PHỤ LỤC 8**).

4.2.2. Xác định acid amin điểm nóng của PPI trên IL-33 và ST2 bằng các phương pháp tính toán

Xác định acid amin điểm nóng trong PPI bằng phương pháp thực nghiệm yêu cầu các quá trình thiết kế gen chuyên nhiệm, tái tổ hợp, tinh chế protein đột biến và xác định ái lực liên kết giữa dạng đột biến với protein thụ thể. Vì vậy, việc xác định tính chất “điểm nóng” của toàn bộ các acid amin trên bề mặt PPI là không khả thi. Với nhiều loại PPI, thông tin về điểm nóng còn hạn chế, thậm chí là không có. Trong nghiên cứu này, hai mục tiêu của việc xác định acid amin điểm nóng của PPI IL-33/ST2 bằng các phương pháp tính toán là:

- (i) Đánh giá khả năng của các phương pháp tính toán trong việc xác định đúng các acid amin điểm nóng thực nghiệm;
- (ii) Tìm kiếm các điểm nóng tiềm năng khác mà các nghiên cứu thực nghiệm chưa triển khai được.

Mục tiêu thứ hai có động lực xuất phát từ các acid amin điểm nóng thực nghiệm trên IL-33 đều là những acid amin phân cực và tích điện âm.⁴⁷ Đặc điểm này đã hướng dẫn phương pháp pharmaphore tạo ra các mô hình có đặc tính tương tự, từ đó không thể sàng lọc ra hợp chất thỏa mãn mô hình hoặc nếu có thì chỉ thu được những phân tử kém phù hợp để làm thuốc hóa dược. Quá trình phát hiện điểm nóng trong nghiên cứu này được thực hiện với những phương pháp tính toán từ đơn giản đến phức tạp như minh họa ở **Hình 4.1** và có thể được áp dụng cho các nghiên cứu PPI khác, đặc biệt là với những phức hợp phức tạp của các interleukin.



Hình 4.1. Quá trình xác định acid amin điểm nóng của PPI bằng các công cụ máy tính

4.2.2.1. Xác định acid amin điểm nóng từ cấu trúc tinh thể của protein

Chỉ từ cấu trúc tinh thể của phức hợp IL-33/ST2 (PDB: 4KC3), các công cụ máy tính có thể giúp phát hiện tương tác giữa các acid amin trên bề mặt PPI. Công cụ MOE Protein Contacts và PDBsum đã được ứng dụng để thực hiện tác vụ này và một số tương tác mạnh đáng kể đã được quan sát. Tuy nhiên, PDBsum chỉ cung cấp thông tin về loại và khoảng cách tương tác, trong khi MOE Protein Contacts có thể cung cấp thêm thông tin về năng lượng của tương tác. Trong trường hợp của IL-33/ST2, toàn bộ các acid amin điểm nóng thực nghiệm đã được báo cáo bởi hai công cụ. Độ quan trọng của các acid amin được phản ánh qua năng lượng và độ dài liên kết. Do đó, nếu một dự án nghiên cứu PPI không có sẵn năng lực tính toán lớn để thực hiện các mô phỏng MD dài, các công cụ phân tích PPI dựa trên cấu trúc PDB kể trên có thể được áp dụng.

Với cách tiếp cận này trên IL-33/ST2, một số cặp tương tác mới có năng lượng mạnh đáng kể đã được phát hiện. Đó là các cầu muối giữa Lys152_{IL-33} với Asp115_{ST2};

giữa Glu139_{IL-33} và Arg38_{ST2} tại vị trí 1; và giữa Glu121_{IL-33} và Lys257_{ST2} tại vị trí 2. Với mức năng lượng từ $-24,43$ đến $-5,61$ kcal/mol, các cặp acid amin này đóng góp tương đương các acid amin điểm nóng thực nghiệm. Nhưng để kết luận đây có phải là những điểm nóng thực sự hay không, các phương pháp tính toán sâu hơn cần được thực hiện để khẳng định. Mô phỏng MD và quét đột biến alanin được thực hiện sau đó đã chứng minh 2 trong 3 cặp tương tác kể trên có tiềm năng là các điểm nóng (**Bảng 3.3**). Mặc dù chưa được khai thác trong nghiên cứu hiện tại, những điểm nóng mới này vẫn có nhiều tiềm năng trong việc phát triển chất ức chế IL-33/ST2 và cần được khảo sát thêm trong các nghiên cứu tương lai.

Hiệu quả của chương trình MOE Protein Contacts và công cụ trực tuyến PDBsum trong việc khai thác thông tin PPI là như nhau. MOE có ưu điểm trong việc cung cấp thông tin chi tiết hơn về giá trị năng lượng liên kết, giúp người dùng dễ dàng lựa chọn các acid amin quan trọng. Tuy nhiên, giá trị năng lượng này rất thay đổi ở các trạng thái khác nhau của protein (**Bảng 3.1**). Sự khác biệt này đến từ tình trạng proton hóa ở các pH xác định, sự tối thiểu hóa năng lượng khi chuẩn bị cấu trúc và điện tích từng phần của protein. Do đó, phức hợp PPI cần được chuẩn bị và đánh giá chất lượng cẩn thận trước khi áp dụng những phân tích đơn giản như các công cụ này. Để khắc phục nhược điểm đó, mô phỏng MD cho phức hợp PPI là lựa chọn phù hợp để tính đến sự linh động của các protein trong môi trường dung dịch gần với sinh lý.

4.2.2.2. *Xác định acid amin điểm nóng từ mô phỏng MD*

Trong nghiên cứu hiện tại, các mô phỏng MD 500 ns trên phức hợp IL-33/ST2 đã được sử dụng để khảo sát tính linh động của PPI giữa hai protein. Mô phỏng MD với nhiều quỹ đạo độc lập và đủ dài là cần thiết để tìm kiếm trạng thái hội tụ của phức hợp PPI và từ đó khảo sát các tương tác mong muốn với độ tin cậy cao hơn. Quan sát đầu tiên được ghi nhận là sự chuyển động nội tại của phức hợp protein rất ổn định, thể hiện qua biểu đồ RMSD của carbon alpha trong cả 5 quỹ đạo mô phỏng (**Hình PL9.2, PHỤ LỤC 9**). Phức hợp protein nhanh chóng đạt trạng thái cân bằng. Bán kính quay cùng diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi giảm và hội tụ ở nửa cuối của 5 quỹ đạo mô phỏng. Các quỹ đạo mô phỏng đã cung cấp một lượng dữ liệu lớn chứa các ảnh chụp nhanh của phức hợp IL-33/ST2 trong dung dịch và có thể sử dụng cho nhiều phân tích khác nhau.

Với mục tiêu ban đầu nhằm khảo sát tính linh động của sự tương tác giữa IL-33 và ST2, biểu đồ RMSF thể hiện độ dao động trung bình của các acid amin trong phức hợp được tập trung phân tích (**Hình PL9.2, PHỤ LỤC 9**). Độ dao động của các acid amin điểm nóng thực nghiệm trên IL-33 như Glu144, Glu148, Asp149, Asp244, Tyr163, Glu165 và Leu182 lần lượt là 0,81; 1,97; 1,90; 1,12; 0,90; 1,05 và 1,06 Å.

Các acid amin liên kết tương ứng trên ST2 gồm Lys22, Arg35, Arg38, Gln39, Leu246, Leu306, Leu311, Arg313 có giá trị RMSF lần lượt là 1,48; 1,28; 1,00; 1,43; 0,95; 0,99; 1,12 và 0,99 Å. Như vậy, từ cấu trúc kết tinh được hòa vào dung dịch trong mô phỏng MD, các điểm nóng thực nghiệm vẫn duy trì sự ổn định với biên độ dao động trung bình thấp hơn 2 Å. Các acid amin khác có năng lượng liên kết đáng kể được quan sát trước đó trên cấu trúc tinh thể như Glu121, Glu139 và Lys152 có độ dao động trung bình lần lượt là 1,39; 2,09 và 2,69 Å, Asp115 và Lys257 có độ dao động 2,66 và 3,25 Å. Các dao động trên 2 Å có thể không đảm bảo sự ổn định cho tương tác giữa các acid amin này.

Phân tích tần suất hình thành các loại tương tác giữa các acid amin của IL-33 và ST2 tại **Bảng 3.2** cho thấy mô phỏng MD đã ghi lại tất cả các liên kết quan trọng giữa các acid amin điểm nóng thực nghiệm của IL-33 (Glu144, Glu148, Glu149, Asp244, Tyr163, Leu182, Glu165) và ST2 (Lys22, Arg35, Arg38, Arg198, Leu246, Leu306, Leu311, Arg313). Các cặp tương tác này đều duy trì tần suất liên kết cao hơn 80%. Kết quả này gợi ý rằng mô phỏng MD có thể là một phương pháp tiếp cận phù hợp cho những dự án khám phá chất ức chế các mục tiêu PPI chỉ có cấu trúc PDB mà chưa biết các điểm nóng thực nghiệm. Những tương tác mới được quan sát trên cấu trúc tinh thể của protein được báo cáo bởi công cụ MOE Protein Contacts vẫn xuất hiện trong phân tích mô phỏng MD nhưng không duy trì với một tần suất đáng kể. Kết quả này gợi ý rằng các phương pháp tính có thể hữu ích trong việc xác định các điểm nóng PPI, nhưng sự hỗ trợ của MD có thể xét đến tính linh động của phức hợp protein và cho kết quả đáng tin cậy hơn.

Bên cạnh các acid amin điểm nóng thực nghiệm, các acid amin tham gia tương tác trên 80% trong mô phỏng MD đã được lựa chọn để đưa vào quá trình tính toán phân rã năng lượng tự do MM-GBSA. Trừ Asp244 có đóng góp năng lượng dương, tất cả các acid amin được khảo sát đều có mức đóng góp năng lượng âm (**Hình 3.1**) để có thể liệt kê vào danh sách các acid amin quan trọng của PPI giữa IL-33 và ST2.

4.2.2.3. Xác định acid amin điểm nóng bằng phương pháp quét đột biến alanin

Nhìn chung, 4 công cụ quét đột biến alanin được sử dụng trong đề tài này đều là những dịch vụ trực tuyến có tốc độ hoạt động nhanh chóng. Với chi phí tính toán hợp lý về thời gian và tài nguyên máy tính, các công cụ này có thể dễ dàng áp dụng cho các nghiên cứu chất ức chế PPI. Tuy nhiên, mỗi công cụ lại sử dụng một thuật toán khác nhau để ước tính sự thay đổi năng lượng tự do gắn kết giữa hai protein sau đột biến, việc sử dụng kết hợp các phương pháp và tính điểm đồng thuận là cần thiết.

Cũng cần chú ý rằng nghiên cứu thực nghiệm của Lingel và cộng sự (2009), Liu và cộng sự (2013) thực hiện đột biến cho các acid amin điểm nóng có tính acid như

Glu hay Asp thành Lys có tính base.^{46,47} Cách tiếp cận này có thể dẫn đến sự thay đổi ái lực PPI lớn hơn đáng kể so với chỉ quét đột biến alanin đơn thuần. Do đó, nếu chỉ quét alanin mà acid amin nào cho $\Delta\Delta G$ càng dương thì càng có tiềm năng là một điểm nóng quan trọng. Trong nghiên cứu này, cả 4 công cụ đều có thể phát hiện các điểm nóng Glu144, Glu148, Asp149, Tyr163, Glu165 và Leu182 trên IL-33 (**Hình 3.2**). Asp244 không được nhận diện là điểm nóng bởi DrugScore^{PPI} và PIIMS. Kết quả này cũng phù hợp với mô phỏng MD phức hợp IL-33/ST2, khi acid amin này lại có mức đóng góp năng lượng tự do dương (**Hình 3.1**). Các acid amin ở bề mặt đối diện trên ST2 cũng được nhận diện là những điểm nóng tương ứng.

Trong kết quả hiện tại, công cụ BUDE Alanine Scan còn cung cấp các dự đoán về những cụm điểm nóng chứa 3, 4 hoặc 5 acid amin (**Bảng PL10.3** và **PL10.4, PHỤ LỤC 10**) và có thể được sử dụng cho các nghiên cứu trong tương lai. Các cụm điểm nóng này có thể hình thành một vị trí gắn kết phù hợp cho phân tử nhỏ. Nếu chúng là những vùng cấu trúc lõi thì cũng có thể được ứng dụng trong thiết kế thuốc với phương pháp bắt chước hình dạng 3D nhằm sàng lọc các phân tử nhỏ có tính chất tương tự và từ đó ức chế PPI.

4.2.2.4. *Sự bổ sung các acid amin điểm nóng cho PPI giữa IL-33/ST2*

Những nỗ lực của Lingel và cộng sự (2009), Liu và cộng sự (2013) đã cung cấp nền tảng quan trọng cho quá trình khám phá chất ức chế IL-33/ST2.^{46,47} Với mong muốn đóng góp thêm các dữ kiện hữu ích nhằm thúc đẩy các tiến bộ mới trong lĩnh vực này, kết quả của đề tài đã bổ sung một số acid amin điểm nóng tiềm năng, mà chủ yếu là các acid amin kỵ nước. Điều này có ý nghĩa quan trọng đối với trường hợp của IL-33 và ST2. Bởi nếu chỉ dựa trên các báo cáo từ y văn, tại vị trí 1 của PPI, hai protein liên kết với nhau phần lớn bằng các tương tác phân cực bởi các acid amin tích điện trái dấu. Nếu thiết kế phân tử ức chế dựa trên phương pháp “bắt chước” PPI, kết quả sẽ dẫn đến những hợp chất quá phân cực và ion hóa. Điều này đặt ra thách thức lớn cho việc thiết kế một phân tử ức chế có đặc tính “giống thuốc”, vốn đòi hỏi tính thân dầu nhất định để đảm bảo tính thấm và hơn nữa là sinh khả dụng đường uống.

Tại vị trí 1 của PPI IL-33/ST2, kết quả của đề tài đã bổ sung các acid amin điểm nóng có kỵ nước gồm Tyr146 và His246 cho IL-33; Tyr119, Tyr132 và Pro37 cho ST2 (**Bảng 3.3**). Một số acid amin phân cực khác cũng được bổ sung gồm Lys152, Asp131 và Asn245 cho IL-33; Asp115 và Thr135 cho ST2. Tại vị trí 2, mặc dù hai protein tương tác với nhau chủ yếu bằng các tương tác kỵ nước cùng một cầu muối duy nhất, đề tài cũng đã bổ sung các điểm nóng gồm Ile119, Asn222, Tyr122, Leu267 và Leu20 cho IL-33; Phe245, Leu308, His309, Met118 và Leu250 cho ST2. Đặc biệt, vai trò của Asn222 được ủng hộ bởi thực nghiệm của Lingel và cộng sự. Trong thử

nghiệm đột biến trên IL-33 và xác định ái lực với ST2 bằng phương pháp giao thoa kế lớp sinh học, đột biến Asn222 thành Ala làm giảm ái lực của IL-33/ST2 đứng thứ hai chỉ sau đột biến Glu144 thành Lys.⁴⁶

Trong đề tài này, cách tiếp cận từng bước theo chi phí tính toán đã được áp dụng để xác định acid amin điểm nóng cho PPI của IL-33/ST2. Từ kết quả thu được và đối chiếu với thực nghiệm, các dự án mới trên những mục tiêu PPI khác trong tương lai có thể tiến hành theo một quy trình tương tự, làm cơ sở cho việc xác định các acid amin quan trọng và xây dựng các mô hình sàng lọc ảo.

Đối với nghiên cứu tìm kiếm chất ức chế IL-33/ST2 tại bề mặt PPI, các acid amin điểm nóng từ thực nghiệm và những điểm nóng mới được đề xuất từ các phương pháp tính toán có thể được ứng dụng để xây dựng mô hình pharmacophore và đánh giá kết quả mô phỏng gắn kết phân tử. Theo đó, dựa trên phương pháp “bắt chước”, một chất ức chế tiềm năng cần “khóa” được các acid amin điểm nóng của PPI.

4.2.3. Khả năng phát triển thuốc phân tử nhỏ của các bề mặt PPI và xác định các vị trí gắn kết phù hợp cho phối tử phân tử nhỏ trên IL-33 và ST2

4.2.3.1. Hạn chế của các công cụ dự đoán vị trí gắn kết dựa trên cấu trúc tĩnh của protein

Qua khảo sát tính hiệu quả các công cụ phát hiện vị trí gắn kết trên hai trường hợp của IL-1 β và IL-36 γ , nhiều phần mềm đã thất bại trong việc phát hiện vị trí gắn kết của phối tử thực nghiệm trên cấu trúc *apo*. Liên hệ đến IL-33 và ST2, đây cũng là các protein chưa có phối tử gắn kết thực nghiệm (tức chỉ có dạng *apo*) và các phần mềm dựa trên cấu trúc tĩnh có thể lặp lại các thất bại tương tự. Trong các công cụ dựa trên cấu trúc tĩnh của protein, các thuật toán dựa trên hình học và năng lượng đường như hoạt động ổn định hơn. Ngược lại, các công cụ dựa trên mô hình học máy như P2Rank không thể dự đoán đúng vị trí liên kết của phối tử, ngay cả trong cấu trúc *holo* đã mở sẵn túi ẩn như trong trường hợp của IL-36 γ . Kết quả này có thể được giải thích bởi chúng phụ thuộc vào dữ liệu đã được huấn luyện ban đầu, có thể không bao gồm các mục tiêu PPI như interleukin.

Những đánh giá hiện tại cho thấy các công cụ truyền thống dựa trên hình học và năng lượng có thể được áp dụng trên các protein PPI với tốc độ dự đoán nhanh chóng. Tuy nhiên, các công cụ này có thể không xác định được vị trí túi ẩn bởi tính linh hoạt của protein không được xét đến. Công cụ hiệu quả nhất được nhận thấy trong phạm vi khảo sát của đề tài là PocketMiner. Chương trình đã dự đoán tốt vị trí chứa túi ẩn trong cấu trúc *apo* của IL-1 β (xếp hạng 2/3) và IL-36 γ (xếp hạng 1/3). Trên IL-33, vị trí được PocketMiner xếp hạng 1/3 sau đó cũng được xác nhận là một túi ẩn dựa trên

mô phỏng MD thời gian dài với chất ức chế thực nghiệm **7c**. Tuy nhiên, PockMiner có một hạn chế là không cung cấp một chức năng nào khác để khai thác thêm các đặc điểm của vị trí gắn kết.

4.2.3.2. *Tiềm năng của phương pháp mô phỏng MD đồng dung môi trong việc xác định vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ*

Cấu trúc tinh thể, dù là dạng *apo* hay *holo*, đều có tính chất “tĩnh” và cũng chỉ là một “mô hình” 3D của protein. Để vượt qua những trở ngại của việc sử dụng cấu trúc apoprotein ở trạng thái tĩnh, đề tài đã áp dụng phương pháp CMD. Đặc trưng của cách tiếp cận này là có thể xét đến tính linh hoạt của protein và khả năng lập bản đồ vị trí gắn kết dựa trên sự cạnh tranh của các phân tử thăm dò hữu cơ với nước trong một môi trường động lực học và theo thời gian. Trong các phương pháp mô phỏng CMD khác nhau, MixMD và CrypticScout đã được sử dụng trong nghiên cứu này bởi chúng sử dụng các loại phân tử thăm dò có thể phân tán đều trong nước mà không bị kết tụ, giúp phát hiện hiệu quả vị trí gắn kết ở nồng độ thấp của phân tử thăm dò đã được chứng minh qua các nghiên cứu trước, và có sẵn chức năng lập bản đồ điểm nóng cũng như xếp hạng các vị trí gắn kết tiềm năng.^{208,244,245}

Mô phỏng CMD với phương pháp MixMD và CrypticScout đã thể hiện sự hiệu quả trong việc xác định các vị trí gắn kết của phối tử thực nghiệm trên cấu trúc *apo* của IL-1 β và IL-36 γ . IL-1 β có 4 vị trí gắn kết gồm: 2 vị trí PPI, 1 vị trí của kháng thể đơn dòng canakinumab và 1 vị trí allosteric chứa túi ẩn của chất ức chế **2**. MixMD đã xác định chính xác các vị trí 1, 2, 3 và ánh xạ hạn chế vị trí của túi ẩn 4. Với sự hỗ trợ của CrypticScout, mô phỏng CMD với BNZ ở nồng độ 0,2 M đã ánh xạ được đến vị trí túi ẩn này và xếp hạng 2. Đối với IL-36 γ , cả MixMD và CrypticScout đều có thể phát hiện túi ẩn được cảm ứng bởi chất ức chế A-552 (**PHỤ LỤC 14**). Trong khi đó, không một phương pháp “tĩnh” nào có thể phát hiện được vị trí của phối tử thực nghiệm trên cấu trúc *apo* của IL-36 γ (**PHỤ LỤC 12 và 13**). Vào tháng 5 năm 2024, Vulpetti và cộng sự đã công bố một số phối tử mới ức chế IL-1 β , trong đó có một chất ức chế cộng hóa trị (S)-**10** và một hợp chất đại vòng **11**.²⁴⁶ Như một đánh giá tiên cứu, các phối tử này được trích xuất từ phức hợp với IL-1 β (PDB: 8RZB và 8RYK) và kiểm tra sự ánh xạ trên kết quả MixMD của đề tài. **Hình PL14.4, PHỤ LỤC 14** cho thấy hợp chất **11** gắn kết tại vị trí được MixMD xếp hạng 1, (S)-**10** ánh xạ tại vị trí được xếp hạng 2 và 9. Như vậy, việc xác lập và xếp hạng được các điểm nóng gắn kết tại vị trí của phối tử thực nghiệm đã xác nhận ưu điểm của CMD.

Túi ẩn trên IL-1 β là một trường hợp khó phát hiện, kể cả với MixMD. Sự cảm ứng mạnh mẽ của phối tử thực nghiệm **2** làm cho các vòng của protein có sự chuyển động lớn. Bằng cách ứng dụng CrypticScout với hỗn hợp đồng dung môi của BNZ

và nước (nồng độ BNZ 0,2 M), bản đồ điểm nóng đã sự ánh xạ chính xác đến vị trí của phối tử thực nghiệm trên cấu trúc *apo* của IL-1 β (**Hình PL14.3, PHỤ LỤC 14**). Đồng thời, CrypticScout cũng ánh xạ thành công vị trí túi ẩn của phối tử thực nghiệm trên IL-36 γ , tương tự như MixMD. Kết quả của đề tài góp phần củng cố kết luận của Martinez-Rosell và cộng sự về tính hiệu quả của quy trình sử dụng mô phỏng CMD với hỗn hợp dung môi BNZ 0,2 M bằng CrypticScout trong việc xác định túi ẩn.²⁰⁸

Mặc dù thể hiện hiệu quả tốt hơn MixMD trong trường hợp của IL-1 β , nhưng CrypticScout không nên là giải pháp thay thế hoàn toàn cho MixMD bởi hai lý do. Thứ nhất, hiệu quả cao hơn của CrypticScout so với MixMD có thể đến từ thời gian mô phỏng dài hơn cho một loại phân tử thăm dò (400 so với 200 ns). *Apo* IL-1 β được trích xuất từ phức hợp với thụ thể IL-1R1 (PDB: 4DEP). Cấu dạng này đang ở tình trạng gắn kết phù hợp với thụ thể chứ không phải ở trạng thái tự do như *apo* IL-36 γ (PDB: 4IZE). Do đó, thời gian mô phỏng dài hơn có thể giúp *apo* IL-1 β trở về trạng thái tự nhiên và quá trình tương tác với phân tử thăm dò sẽ thuận lợi hơn. Nhận xét này gợi ý rằng, trong tương lai, sự tăng thời gian mô phỏng trong quy trình MixMD có thể làm tăng hiệu quả phát hiện túi ẩn tương tự CrypticScout. Thứ hai, về mặt kỹ thuật, CrypticScout là một công cụ trực tuyến và các mô phỏng kéo dài có thể bị lỗi trong quá trình chạy trên máy chủ. Đồng thời, nhiều tính năng chuyên nghiệp hơn của công cụ này yêu cầu quyền truy cập thương mại. Trong khi đó, MixMD là một quy trình miễn phí, dễ dàng tùy biến, có chức năng xếp hạng vị trí gắn kết, được chạy trên máy tính cục bộ và đáng tin cậy hơn về khả năng vận hành. Đặc biệt, trong đề tài này, phân tử thăm dò BNZ với sự tham số hóa phù hợp đã được bổ sung để có thể áp dụng trong MixMD mà không gặp phải hiện tượng kết tụ như báo cáo bởi Lexa và cộng sự.²⁴⁵ Trong tương lai, quy trình sử dụng BNZ trong MixMD có thể được phát triển thêm để đạt được những kết quả tương tự CrypticScout.

Khám phá túi ẩn mở ra một số cơ hội mới trong khám phá thuốc. Các túi này cung cấp một vị trí gắn kết mới để phát triển các loại phân tử mới. Bên cạnh đó, các phân tử ức chế định vị tại túi ẩn cũng tăng tác động chọn lọc của chúng khi không ảnh hưởng đến các protein cùng họ. Sự gắn kết chọn lọc của A-552 trên IL-36 γ mà không liên kết với các thành viên khác của phân họ IL-36 là một ví dụ điển hình. Mở rộng trong lĩnh vực của kháng sinh hay thuốc kháng ung thư, túi ẩn có thể góp phần giải quyết tình trạng đề kháng của vi khuẩn hay tế bào với các thuốc hóa trị liệu gắn kết tại các vị trí hoạt động kinh điển.

Cho đến hiện nay, các túi ẩn thường chỉ được phát hiện từ chụp nhiễu xạ tinh thể tia X các phức hợp protein–phối tử. Trong nghiên cứu này, các túi ẩn có thể được phát hiện thông qua mô phỏng CMD. Thành công này đạt được nhờ protein được giữ

cho linh hoạt hoàn toàn và sự cảm ứng của các phân tử hữu cơ thăm dò, đặc biệt là BNZ. Tuy nhiên, chi phí tính toán cho các mô phỏng CMD khá lớn. Với sự phát triển của phần cứng máy tính trong tương lai, túi ẩn sẽ là một lĩnh vực hấp dẫn được khai phá nhiều hơn. Bên cạnh đó, hạn chế của mô phỏng CMD là chỉ mở phần nào túi ẩn bởi kích thước hạn chế của các phân tử thăm dò. Sự ánh xạ chỉ góp phần gợi ý các vị trí tiềm năng. Muốn mở đầy đủ túi ẩn, sự hiện diện của phân tử ức chế là cần thiết.

Việc áp dụng các công cụ tính toán trong xác định vị trí gắn kết trên IL-1 β và IL-36 γ có mục tiêu trước hết là khảo sát tính hiệu quả các phương pháp này để từ đó áp dụng lên cấu trúc của IL-33 và ST2. Tuy nhiên, những kết quả thu được về vị trí gắn kết, nhất là từ các mô phỏng CMD, cũng có thể là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm kiếm chất ức chế mới cho các cytokin họ IL-1. Điều này đặc biệt hữu ích trong trường hợp của IL-36 γ , khi các túi gắn kết mới bên ngoài vị trí của phối tử A-552 đã được báo cáo trong nghiên cứu này.

4.2.3.3. *Áp dụng các phương pháp xác định vị trí gắn kết cho IL-33 và ST2*

Dựa trên cấu trúc tinh thể của apoprotein, các phần mềm dự đoán vị trí gắn kết đã được áp dụng để phát hiện và đánh giá ban đầu khả năng làm thuốc của các túi gắn kết tiềm năng trên IL-33 và ST2. Kết quả cho thấy vị trí 1 trên bề mặt PPI của IL-33 không được đánh giá cao. Ngoại trừ được FTSite xếp hạng 1, vị trí này được các công cụ khác xếp hạng 3–8 (**Bảng 3.4**). Ngược lại, ở bề mặt đối diện trên ST2, vị trí PPI được xếp hạng cao hơn một cách đồng thuận bởi các phần mềm. Có 8/11 chương trình xếp hạng 1 và 3/11 chương trình xếp hạng 2 cho vị trí này.

Đối với vị trí 2 của PPI, khoang orthosteric của IL-33 đã được xếp hạng 1 bởi 3/11 chương trình, hạng 2 bởi 2/11 chương trình. Sự không đồng nhất này là do vị trí 2 của IL-33 khá rộng và không được nhận diện đầy đủ hoặc đánh giá cao bởi các thuật toán khác nhau (**Hình PL15.1, PHỤ LỤC 15**). Đối với vị trí 2 của thụ thể ST2, từ tổng quan tài liệu đến các phép tính toán đều cho thấy đây không phải là vị trí phù hợp để phát triển thuốc phân tử nhỏ.⁴⁷ Hai lý do cho nhận xét này là vị trí 2 của ST2 định vị trên miền D3 rất linh động kết hợp với tính chất lồi của bề mặt liên kết. Tự thân miền D3 khó có thể cho một túi gắn kết phù hợp với phân tử nhỏ. Điều này chỉ có thể đạt được khi miền D3 cần có những chuyển động phù hợp để cùng với miền D1 hoặc D2 tạo ra túi gắn kết, như báo cáo của Yang và cộng sự.¹⁶³

Như vậy, nếu chỉ dựa trên cấu trúc tĩnh của protein, vị trí 2 của IL-33 và vị trí 1 của ST2 tại giao diện PPI là những nơi cung cấp túi gắn kết phù hợp cho việc phát triển thuốc phân tử nhỏ. Khả năng gắn kết với phân tử nhỏ có thể được định lượng bằng các thông số kết quả của các phần mềm. Ví dụ, hai vị trí được đề cập có điểm số “xu hướng của sự gắn kết với phối tử” (Propensity for Ligand Binding – PLB) dự

đoán bởi MOE Site Finder lần lượt là 3,20 và 2,10; hay điểm số “phù hợp để làm thuốc” (DrugScore) dự đoán công cụ DoGSiteScorer là 0,813 và 0,798 (**PHỤ LỤC 15 và 16**). Vị trí 1 tại giao diện PPI của IL-33 không bị phủ nhận, được chương trình DoGSiteScorer dự đoán gồm 3 túi con với điểm số DrugScore lần lượt là 0,275; 0,240 và 0,200 (**PHỤ LỤC 15**). Với sự cảm ứng của một phối tử phù hợp, vị trí này có thể hình thành một túi gắn kết rõ ràng và cho khả năng liên kết ái lực cao.

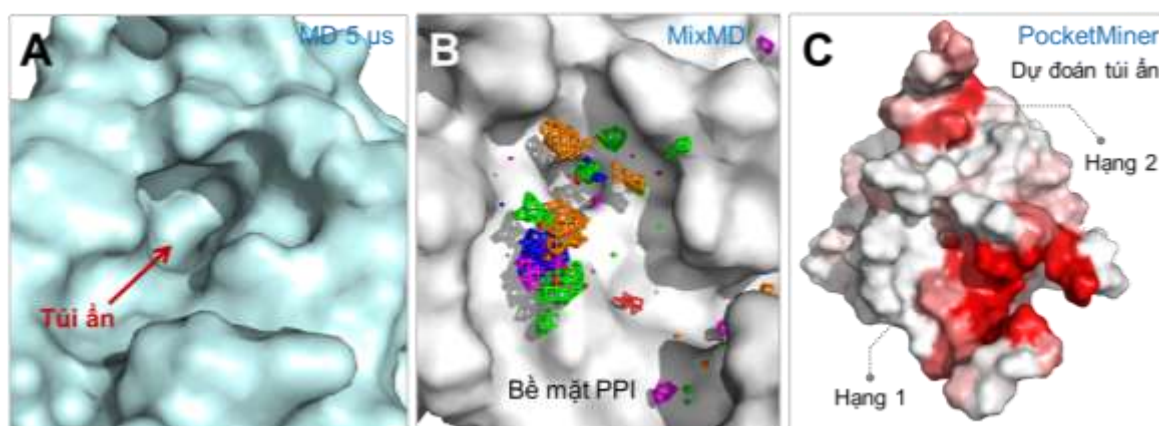
Từ những nhận xét trên, có thể thấy rằng việc xác định được các acid amin điểm nóng của PPI là chưa đủ và không phải bao giờ cũng hữu dụng để xác định vị trí gắn kết trong quá trình khám phá thuốc mới. Các điểm nóng đôi khi nằm trên những mặt phẳng hoặc bề lõm của protein và hoàn toàn không đóng góp cho một vị trí gắn kết phù hợp với phân tử nhỏ. Ủng hộ cho luận điểm này chính là trường hợp của các điểm nóng của thụ thể ST2 tại vị trí 2 của bề mặt PPI (**Bảng 3.3**). Thậm chí, dù cho acid amin điểm nóng định vị ở khoang lõm của protein nhưng nếu chúng nằm ở miệng của khoang thì cũng không giúp ích cho sự gắn kết của phối tử phân tử nhỏ. Hiện tượng này có thể quan sát được trên IL-33. Glu165 là acid amin điểm nóng quan trọng tại vị trí 2 của IL-33 và được xác định bởi cả nghiên cứu *in silico* và thực nghiệm. Tuy nhiên, bởi sự định vị trên phần bờ của khoang gắn kết nên acid amin này không thể liên kết với phối tử một cách hiệu quả.

4.2.4. Túi ẩn trên IL-33 được xác định bởi mô phỏng CMD và MD thời gian dài

Kết quả của đề tài cho thấy vị trí 2 tại bề mặt PPI của IL-33 được xác định một cách đồng thuận bởi các phương pháp phát hiện vị trí gắn kết tĩnh và động (**Bảng 3.4 và Hình 3.4**). Nghiên cứu thực nghiệm của Kim và cộng sự đã chỉ ra rằng đây là vị trí gắn kết của chất ức chế **7c** được chứng minh bằng cách theo dõi độ dịch chuyển hóa học của các acid amin IL-33 trên phổ NMR.²¹ Bên cạnh đó, tính xác thực của vị trí này còn được ủng hộ bởi nghiên cứu của Jamwal và cộng sự.²⁴⁷ Trong đó, các tác giả công bố cấu trúc tinh thể của protein đối vận HpARI2 gắn kết với IL-33 (PDB: 8Q5R) tại vị trí 2 bằng một cấu trúc vòng lớn (**Hình PL15.3, PHỤ LỤC 15**) và ức chế sự tương tác của cytokin này với thụ thể ST2.

Với kiến thức đã biết về chất ức chế **7c** được báo cáo bởi Kim và cộng sự,²¹ sự tương tác của phức hợp IL-33 và phối tử này đã được mô phỏng MD với 5 quỹ đạo dài 1 μ s. Hợp chất **7c** được phát triển dựa trên hợp chất ban đầu, BTB11086, gắn kết yếu với IL-33. Mặc dù Kim và cộng sự đã đề xuất một mô hình gắn kết giữa BTB11086 và IL-33, tương tác ở mức độ nguyên tử giữa các phân tử này vẫn còn chưa được làm rõ.²⁰ Vì vậy, với một thời gian mô phỏng MD dài 5 μ s, cấu dạng gắn kết của IL-33/**7c** được kỳ vọng sẽ hội tụ và phương thức gắn kết được làm rõ. Tuy nhiên, sự hội tụ tuyệt đối đã không thể quan sát trong kết quả mô phỏng. Hợp chất **7c**

liên kết với IL-33 với nhiều tư thế khác nhau, đòi hỏi một thuật toán phân cụm phù hợp để xác định các kiểu gắn kết phổ biến nhất. Nghiên cứu đã sử dụng thuật toán phân cụm QT và thu được 5 cụm phổ biến, trong đó cụm 1 và cụm 2 chiếm tỉ lệ xuất hiện cao nhất. Trong cấu dạng gắn kết tốt nhất (theo $\Delta G_{\text{gắn kết}}$ MM-GBSA) được lấy mẫu từ cụm 1, nhóm trifluorophenyl của **7c** đã được đưa sâu vào lõi của IL-33 với một túi ẩn kỵ nước vốn không thể quan sát được trên cấu trúc tinh thể (**Hình 4.2A**). Túi này được bao quanh bởi Leu161 và Leu267, tạo điều kiện cho **7c** tương tác với lõi kỵ nước gồm Leu126 và Phe230. Sự hình thành túi ẩn này đòi hỏi sự chuyển động của Leu267 và Asn226, mở ra không gian đi vào cho phối tử để tương tác với lõi kỵ nước. Đối chiếu với bản đồ chiếm giữ của BNZ trong MixMD (**Hình 4.2B**), túi ẩn này đã được ánh xạ ở vị trí trung tâm, cho thấy hiệu quả của phương pháp trong việc phát hiện các túi ẩn vốn không thể dự đoán trên cấu trúc tinh thể. Khi sử dụng dữ liệu mô phỏng MD để khảo sát đặc điểm của khoang gắn kết tại vị trí 2 của IL-33 với sự hình thành túi ẩn theo thời gian, MDpocket đã báo cáo thể tích trung bình của khoang là $\sim 400 \text{ \AA}^3$ (**Hình PL15.4, PHỤ LỤC 15**). Trong đó, cấu dạng gắn kết tốt nhất trong cụm 1 cho thể tích túi là $637 \text{ \AA}^3$ và điểm số phù hợp làm thuốc là 0,932.



Hình 4.2. Sự dự đoán túi ẩn tại vị trí 2 của IL-33 từ mô phỏng MD dài với phối tử thực nghiệm **7c**, mô phỏng MixMD và PocketMiner

(A) Mô hình túi ẩn tại vị trí 2 của IL-33 với sự cảm ứng của chất ức chế **7c** được lấy mẫu từ mô phỏng MD dài 5 μ s. (B) Sự ánh xạ của BNZ (các lưới màu xanh lá cây) trên vị trí túi ẩn trong MixMD. (C) Các vị trí túi ẩn được dự đoán và xếp hạng bởi PocketMiner.

Kết quả dự đoán của PocketMiner, một công cụ dựa trên mô hình học sâu được huấn luyện để phát hiện các túi ẩn, đã cho thấy sự đồng thuận quan trọng. Chỉ dựa trên cấu trúc tinh thể của IL-33, PocketMiner đã dự đoán vị trí 2 của PPI là vị trí hàng đầu cho sự xuất hiện của túi ẩn (**Hình 4.2C**). Như vậy, PocketMiner đã thể hiện khả năng dự đoán tốt trên cả 3 cytokin họ IL-1, gồm IL-1 β , IL-36 γ và IL-33. Với sự hữu ích của PocketMiner, túi ẩn có thể được xác định sơ khởi. Sau đó, mô phỏng gắn kết phân tử, MD thời gian dài và CMD có thể được áp dụng để khẳng định và khai thác

các đặc điểm của túi ẩn. Sự xác định qua từng bước giúp giảm chi phí tính toán và tăng tính hiệu quả trong việc khai phá các túi ẩn trên bề mặt protein. Với sự trợ giúp của các công cụ máy tính, việc xác định túi ẩn ngày nay đã trở nên khả dĩ hơn thay vì tình cờ được phát hiện từ nghiên cứu tinh thể học tia X như trước đây.

Sự mở túi ẩn tại vị trí 2 của IL-33 làm tăng khả năng gắn kết với phối tử phân tử nhỏ, từ đó làm tăng khả năng phát triển thuốc của mục tiêu tác động. Tuy nhiên, tư thế của **7c** được trình bày ở trên có đại diện cho phương thức gắn kết thực sự của phối tử với IL-33 hay không. Hai câu hỏi quan trọng được đặt ra khi diễn giải kết quả mô phỏng là: (i) liệu các chương trình mô phỏng phân tử khác nhau, cụ thể là chức năng tính điểm của chúng, có nhận diện tư thế gắn kết của **7c** được báo cáo ở trên là thuận lợi nhất hay không và (ii) liệu túi gắn kết này có thích hợp hơn để làm giàu các hợp chất có hoạt tính so với túi gắn kết của cấu trúc tinh thể hay không. Để giải quyết những câu hỏi này, đề tài đã thực hiện việc “gắn kết lại” **7c** vào mô hình túi ẩn bằng các phần mềm khác nhau. **Hình PL15.5A, PHỤ LỤC 15** minh họa kết quả gắn kết lại bởi các phần mềm AutoDock Vina, LeDock và MOE Dock. Tất cả các chương trình đều tái lập cấu dạng gắn kết của **7c** như trong cụm 1 của mô phỏng MD với RMSD < 1,0 Å. Sự đồng thuận giữa các thuật toán gắn kết khác nhau gợi ý rằng **7c** có thể gắn kết với IL-33 theo phương thức như được đề xuất bởi mô phỏng MD. Tuy nhiên, bằng chứng về cấu trúc thực nghiệm vẫn cần thiết để xác nhận giả thuyết này. Trong đánh giá hồi cứu về khả năng làm giàu các hợp chất gắn kết với IL-33 tương tự như **7c**, **Hình 3.7D và E** đã cho thấy mô hình gắn kết trên túi ẩn thể hiện năng lực phân biệt chất hoạt tính và môi trường tốt hơn, gồm cả DUDE-Z và DeepCoy.

Bên cạnh đó, các mô phỏng MD thời gian dài đòi hỏi tài nguyên tính toán rất lớn. Liệu cấu dạng của IL-33 trong tư thế gắn kết với **7c** ở cụm 1 của mô phỏng MD có thể được lấy mẫu bởi các chương trình gắn kết linh động với chi phí tính toán ít hơn hay không. Đề tài đã thực hiện mô phỏng gắn kết với chuỗi bên của IL-33 được giữ linh động bằng phần mềm AutoDock Vina. Kết quả cho thấy chỉ cần giữ cho chuỗi bên của các acid amin Tyr163, Leu182, Leu220 và Leu267 linh động là có thể tìm kiếm được tư thế gắn kết tương tự như mô phỏng MD. Động lực chính của sự gắn kết là sự hình thành túi ẩn để chứa nhóm trifluorophenyl của **7c**, phụ thuộc phần lớn vào sự chuyển động chuỗi bên của Leu267 (**Hình PL15.5B, PHỤ LỤC 15**). Điều thú vị là các acid amin kể trên đều là các điểm nóng quan trọng tại vị trí 2 của IL-33.

Các cấu trúc thực nghiệm của IL-33 (PDB: 4KC3 và 2KLL) được khảo sát để xem sự chuyển động nói trên có thể quan sát từ thực nghiệm hoặc bị cản trở bởi yếu tố nào không. Trong tất cả các cấu trúc có sẵn, chuỗi bên của Leu267 không có xu hướng định hướng về phía dung môi và túi ẩn không thể nhận thấy. Trong cấu trúc

tinh thể (PDB: 4KC3), tính linh hoạt của Leu267 bị cản trở đáng kể bởi Phe245 và Leu308 từ ST2 (**Hình PL15.5C, PHỤ LỤC 15**). Điều này cho thấy IL-33 đang đáp ứng cảm ứng để liên kết với thụ thể. Do đó, trạng thái này không đại diện cho cấu trúc IL-33 ở dạng tự do. Đối với cấu trúc NMR của IL-33 trong dung dịch (PDB: 2KLL), mặc dù 100 cấu trúc đã được giải nhưng các tác giả chỉ báo cáo 10 cấu trúc năng lượng thấp nhất.⁴⁶ Sự chuyển động hướng về dung môi của chuỗi bên Leu267 có thể dẫn đến SASA cao hơn và năng lượng tự do ít thuận lợi hơn, dẫn đến không được báo cáo trong cấu trúc NMR (**Hình PL15.5D, PHỤ LỤC 15**). Tóm lại, sự di chuyển chuỗi bên như vậy ở Leu267 chỉ có thể ghi nhận được khi có mặt của các đầu dò hữu cơ hoặc phối tử phân tử nhỏ như **7c**.

Trong báo cáo của Kim và cộng sự, **7c** liên kết với IL-33 và gây ra sự thay đổi đáng chú ý độ biến đổi CSP trên phổ NMR của 10 acid amin trên giao diện IL-33/ST2 (acid amin 120, 121, 161, 220, 224, 226, 227, 229, 267, và 269) cùng hai acid amin ở lõi kỵ nước (acid amin 184 và 185). **Hình PL15.6A, PHỤ LỤC 15** minh họa sự chồng phủ của các acid amin này trong cấu trúc tinh thể và cấu trúc của phức hợp IL-33/**7c** trong mô phỏng MD. Sự gắn kết của **7c** đòi hỏi sự sắp xếp lại đầu C của IL-33 (acid amin 221–229) và vòng $\beta 8$ - $\beta 9$ để tạo không gian cho nhóm trifluorophenyl. Việc mở túi ẩn kỵ nước này cũng làm lộ ra chuỗi bên của Leu161, Val184 và Leu220, góp phần giải thích rõ hơn cơ chế nhiễu loạn của các acid amin này khi liên kết với **7c**, so với giả thuyết do Kim đã nêu trong báo cáo của mình.²¹ Sự hình thành túi ẩn này là yếu tố chính cho sự liên kết ổn định của hợp chất **7c** và có thể giải thích cho tác động ức chế của nó.

Cuối cùng, khi căn chỉnh phức hợp MD của IL-33/**7c** với phức hợp đồng kết tinh của IL-36 γ /A552, sự phù hợp về phương thức gắn kết của hai phối tử trên hai protein được nhận thấy (**Hình PL15.6B, PHỤ LỤC 15**). Các hợp chất thâm nhập sâu vào rãnh kỵ nước của protein, đồng thời hình thành các tương tác kỵ nước bổ sung với các chuỗi bên được chôn sâu để tạo thành phức hợp ổn định hơn. Mặt khác, mặt bên ngoài của hợp chất có xu hướng hình thành các tương tác kỵ nước hoặc kỵ nước bổ sung với các acid amin liền kề. Những phát hiện này càng nhấn mạnh tầm quan trọng của các túi ẩn trong IL-33 như là vị trí gắn kết tiềm năng cho các phân tử nhỏ ức chế.

4.2.5. Giả thuyết về túi allosteric của thụ thể ST2

Trên thụ thể ST2, mô phỏng CMD và cả những phương pháp dựa trên cấu trúc tinh thể đã cho kết quả đồng thuận về một túi liên kết mới trên ST2. Vị trí này nằm gần khoang orthosteric của PPI trên thụ thể. Trong các loại hình dạng khác nhau của vị gắn kết cho phân tử nhỏ, khoang gắn kết mới này có hình dạng một túi kiểu “đường hầm” (tunnel), trong khi vị trí orthosteric có hình dạng là một túi dạng “rãnh”

(groove). Để xác nhận đây có phải thực sự là vị trí allosteric hay không, các nghiên cứu thực nghiệm cần được thực hiện để khẳng định. Trong phạm vi của đề tài, phương pháp NoMA đã được sử dụng để chứng minh rằng chỉ cần sự hiện diện của các phối tử giả bất diện đủ để làm thay đổi sự dao động tổng thể của protein so với dạng *apo*. Bằng cách sử dụng nửa cuối cân bằng của 5 quỹ đạo mô phỏng MD 100 ns của thụ thể ST2, thể tích của túi này đã được khảo sát bằng công cụ MDpocket và minh họa tại (**Hình PL16.2, PHỤ LỤC 16**). Trong môi trường dung dịch gần với sinh lý, túi allosteric đã duy trì được thể tích trung bình khoảng 1080 Å³. Trong đề tài này, các phân tử có hoạt tính gồm T296, T713, T718 và T721 đã được khám phá thông qua việc sàng lọc ảo bằng mô phỏng gắn kết trên túi allosteric của ST2.

4.2.6. Những vị trí gắn kết tiềm năng khác trên IL-33 và ST2

Trên IL-33, bên cạnh hai vị trí orthosteric đã được thảo luận, một số vị trí gắn kết tiềm năng khác đã được phát hiện bởi MixMD. Trong số đó, các khoang được xếp hạng 4, 5, 6, 7 và 9 (**Hình 3.4**) là những vị trí có sự thâm nhập sâu của phân tử thăm dò. Hiện tượng này chỉ có thể xuất hiện khi protein được giữ cho linh hoạt hoàn toàn trong môi trường mô phỏng MD. Là các cytokin cùng họ, IL-33 cũng có thể liên kết với phối tử phân tử nhỏ tại các vị trí khác nhau như IL-1 β . Cụ thể, vị trí 9 được xác định bởi MixMD tương đương với vị trí của chất ức chế thực nghiệm của IL-1 β .

Trên thụ thể ST2, các khoang được xếp hạng 2 và 3 cũng là những vị trí có sự tập trung với tần suất cao của các phân tử thăm dò trong MixMD. Các khoang này chưa từng được báo cáo. Hiện tượng các phân tử thăm dò, đặc biệt là BNZ và 1P3, thâm nhập sâu vào protein để tạo ra một túi gắn kết rõ ràng cũng được nhận thấy ở ST2. Trong tương lai, các vị trí gắn kết mới nêu trên có thể được khảo sát thêm bằng các phương pháp tính toán và thực nghiệm để xác nhận khả năng phát triển chất ức chế.

4.2.7. Mô phỏng gắn kết phân tử “mù” trong xác định vị trí gắn kết

Gắn kết phân tử “mù” là phương pháp mà trong đó mô hình hộp mô phỏng được mở rộng để bao phủ toàn bộ protein. Phần mềm sẽ cố gắng tìm kiếm tất cả các vị trí gắn kết có thể của phối tử. Phương pháp này đã được áp dụng trên IL-33 nhằm mục đích so sánh với các mô phỏng MD và CMD.

Trên IL-33, 18 phối tử gắn kết thực nghiệm đã được mô phỏng gắn kết mù trên toàn bộ bề mặt protein bằng phần mềm AutoDock Vina và kết quả được trình bày tại **Hình PL15.7A, PHỤ LỤC 15**. Trong đó, khi xem xét cấu dạng có điểm số gắn kết tốt nhất, chương trình đã dự đoán sai vị trí gắn kết của hai phối tử quan trọng là **7c** và BTB11086. Về bản chất, gắn kết mù là phương pháp bán linh động và cấu trúc protein vẫn không thể hiện được tính linh hoạt như trong mô phỏng MD và CMD. Do đó, túi

ẩn không thể mở trong quá trình mô phỏng gắn kết. Sau đó, đề tài đã sử dụng cấu dạng IL-33 được lấy mẫu từ quá trình mô phỏng MD với túi ẩn đã mở sẵn cho một quy trình gắn kết mù tương tự. **Hình PL15.7B, PHỤ LỤC 15** cho thấy 100% phối tử thực nghiệm đã được dự đoán đúng vị trí gắn kết thực nghiệm được khảo sát bởi Kim và cộng sự qua phương pháp phổ NMR.²¹ Kết quả này cho thấy gắn kết mù chỉ hoạt động hiệu quả khi có sẵn cấu dạng protein với túi gắn kết phù hợp. Mặt khác, không như mô phỏng CMD chỉ yêu cầu các phân tử thăm dò cơ bản, phương pháp này còn có hạn chế là yêu cầu về các phân tử gắn kết thực nghiệm. Đối những mục tiêu tác động mới, những chất ức chế như vậy thường không có sẵn và giới hạn khả năng ứng dụng của gắn kết mù.

4.3. Mô hình sàng lọc *in silico* dựa trên cấu trúc mục tiêu IL-33 và ST2

4.3.1. Các mô hình gắn kết phân tử trên IL-33 và ST2

Dựa trên kết quả của quá trình phân tích điểm nóng PPI và xác định vị trí gắn kết, 4 mô hình mô phỏng gắn kết phân tử đã được xây dựng cho IL-33 và thụ thể ST2. Cho đến nay, chưa có công trình nào thực hiện việc xác thực các mô hình gắn kết phân tử cho các mục tiêu tác động này. Đề tài đã sử dụng dữ liệu về các chất có hoạt tính, các hợp chất mới nhử và các chất không có hoạt tính thực nghiệm để đánh giá mô hình gắn kết phân tử cho IL-33 tại vị trí 2 và cho ST2 tại vị trí 1 của PPI.

Để xác thực một mô hình gắn kết phân tử, việc sử dụng bộ dữ liệu đánh giá đúng và chất lượng có ý nghĩa quan trọng. Trên IL-33, tập hợp các hợp chất có hoạt tính được sử dụng (**Bảng PL2.1, PHỤ LỤC 2**) là các chất gắn kết với IL-33 được chứng minh qua thực nghiệm, cụ thể là thử nghiệm đánh giá gắn kết sử dụng phổ NMR được báo cáo bởi Kim và cộng sự.^{20,21} Mặc dù phương thức gắn kết chính xác của các hợp chất này với IL-33 vẫn chưa được báo cáo, nhưng những biến đổi trên phổ HSQC đã chứng minh các hợp chất này liên kết với IL-33 tại vị trí của mô hình cần đánh giá. Trên ST2, đề tài đã sử dụng các chất có hoạt tính được khẳng định qua hai thực nghiệm khác nhau, gồm AlphaLISA và trên tế bào HEK-Blue IL-33 (**Bảng PL2.2, PHỤ LỤC 2**). Trong các chất có hoạt tính này, hợp chất iST2-1 đã được chứng minh là gắn kết trực tiếp lên thụ thể ST2 bằng phân tích tán xạ tia X góc nhỏ (SAXS).²²

Bên cạnh tập chất có hoạt tính, việc đánh giá mô hình cũng cần tập hợp các chất không có hoạt tính. Trong đề tài này, các tập mới nhử khác nhau đã được sử dụng nhằm mục đích so sánh và khẳng định, gồm DUDE-Z và DeepCoy. Đặc biệt, trên ST2, một tập không hoạt tính thực nghiệm trích xuất từ PubChem BioAssays đã được sử dụng để đánh giá mô hình gắn kết phân tử.

Trên IL-33, kết quả đánh giá tại **Hình 3.7** cho thấy cấu dạng protein được lấy mẫu từ mô phỏng MD đã cải thiện năng lực làm giàu của mô hình so với việc sử dụng cấu trúc tinh thể. Trên thụ thể ST2, **Hình 3.8** cho thấy mô hình gắn kết tại vị trí orthosteric 1 có sự làm giàu sớm hơn trong tất cả các đánh giá với tập mỗi như DUDE-Z, DeepCoy và tập không hoạt tính thực nghiệm. Quá trình đánh giá đã giúp xác định các mô hình gắn kết phân tử phù hợp nhất để sử dụng cho giai đoạn sàng lọc ảo. Đáng chú ý, các phân tích đường cong ROC cho thấy tập mỗi như DUDE-Z luôn cho AUC cao hơn so với tập DeepCoy và tập không hoạt tính thực nghiệm. Điều này gợi ý rằng nếu chỉ sử dụng DUDE-Z có thể cho kết quả đánh giá khả quan hơn nhưng cũng tiềm ẩn nguy cơ nhận vào các mô hình tốt giả tạo. Việc sử dụng DeepCoy, trong đó các hợp chất mỗi như được tạo ra bằng mô hình học sâu sao cho có tính chất lý hóa khớp và khó phân biệt với chất có hoạt tính, giúp giảm thiểu nguy cơ này. Lý tưởng nhất là mô hình nên được đánh giá bằng tập có và không có hoạt tính thực nghiệm, như trường hợp của thụ thể ST2 trong đề tài này.

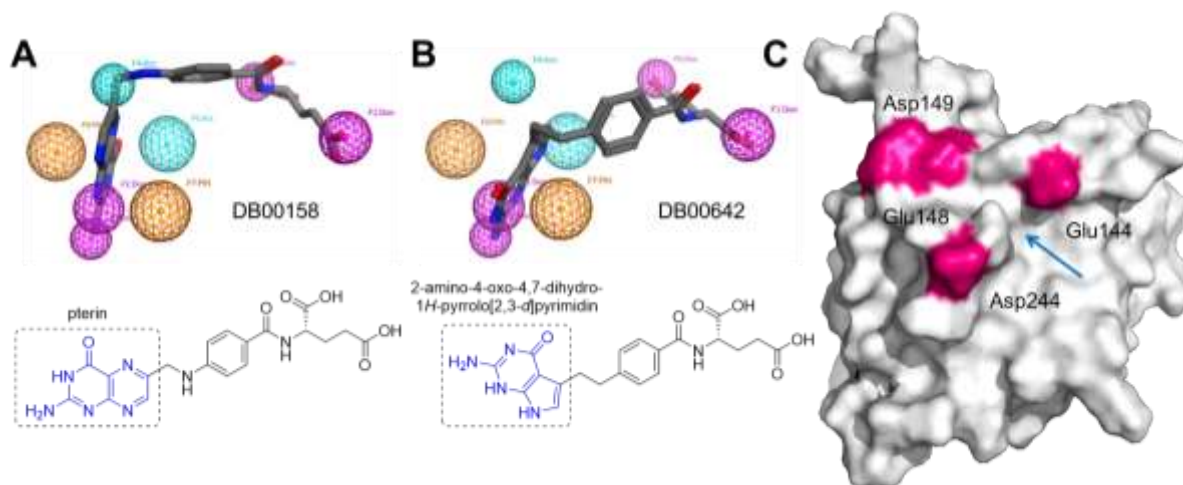
4.3.2. Sàng lọc chất ức chế IL-33 tại vị trí 1 của PPI

Là phần nghiên cứu đầu tiên của đề tài, các acid amin điểm nóng của IL-33 đã được đặt làm trung tâm cho việc xây dựng mô hình pharmacophore, gắn kết phân tử và đánh giá kết quả mô phỏng MD. Từ đó, DB00158 và DB00642 được xác định là các hợp chất gắn kết ổn định với IL-33 tại vị trí 1, duy trì được các liên kết hydro quan trọng với các điểm nóng Glu144, Glu148 hoặc Asp244 trong suốt quá trình mô phỏng MD và có giá trị năng lượng tự do gắn kết MM-GBSA âm.

Hầu hết các chất được giữ lại đến các giai đoạn cuối của quá trình sàng lọc ảo đều xuất phát từ mô hình PH4-IL33-S1-M2 (**Hình 4.3**), vốn tận dụng các đặc tính của cả các điểm nóng thực nghiệm và những acid amin kỵ nước khác trên bề mặt PPI. Với mô hình PH4-IL33-S2-M1, số lượng hợp chất thỏa mãn mô hình còn ít và ái lực gắn kết của các hợp chất với IL-33 còn yếu. Điều này được giải thích bởi mô hình pharmacophore bắt chước các Arg của ST2 nên yêu cầu nhiều điểm điện tích dương và làm hạn chế số lượng hợp chất thỏa mãn. Ngoài ra, dù xuất phát từ mô hình pharmacophore nào, các hợp chất có ái lực gắn kết trên IL-33 còn khiêm tốn (ΔG_{dock} khoảng -6 kcal/mol). Đây là động lực thúc đẩy đề tài tìm kiếm những vị trí gắn kết tiềm năng hơn để có thể phát hiện các hợp chất “hit” có ái lực cao ngay từ giai đoạn mô phỏng gắn kết phân tử (với $\Delta G_{\text{dock}} < -8$ kcal/mol).

Từ kết quả sàng lọc ảo, folat nổi lên như một khung cấu trúc triển vọng cho sự gắn kết ổn định tại vị trí 1 của IL-33. Ngoài hai hợp chất tiềm năng được nhấn mạnh, các dẫn chất folat khác cũng thỏa mãn mô hình pharmacophore và được mô phỏng gắn kết thành công vào IL-33 gồm DB00116, DB00563 và DB00650. Cấu trúc pterin

của DB00158 hoặc các mảnh cấu trúc tương tự cung cấp khả năng cho liên kết hydro với các acid amin điểm nóng mang tính acid của IL-33. Đây có thể là mô típ định hướng cho sự phát triển chất ức chế IL-33 trong các nghiên cứu tiếp theo.



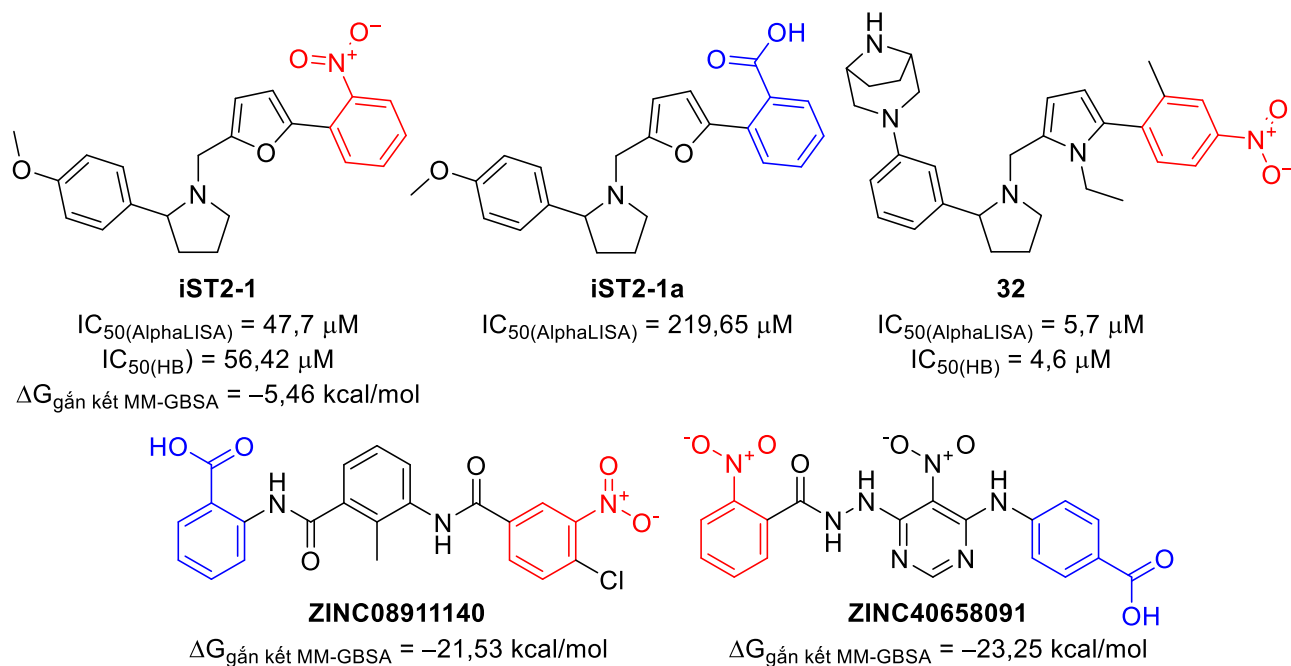
Hình 4.3. Các dẫn chất folat cung cấp kiểu cấu trúc tiềm năng có thể gắn kết với các acid amin điểm nóng mang tính acid của IL-33 tại vị trí 1 của giao diện PPI (A và B) Cấu trúc 3D của được giống hàng trên mô hình pharmacophore và cấu trúc 2D của DB00158 và DB00642. (C) Bề mặt PPI tại vị trí 1 của IL-33, với các acid amin điểm nóng được đánh dấu màu đỏ, mũi tên chỉ rãnh gắn kết phù hợp cho phối tử phân tử nhỏ.

Trong kết quả hiện tại, đề tài đã tập trung khai thác một rãnh được hình thành bởi Glu144, Glu148 và Asp244 (mũi tên màu xanh ở **Hình 4.3C**). Sự tập trung cho các điểm nóng này mà bỏ qua điểm nóng Asp149 xuất phát từ sự liên kết không ổn định của nó với các acid amin của thụ thể ST2 được quan sát trong mô phỏng MD phức hợp IL-33/ST2. Bên cạnh đó, về mặt không gian, vị trí của Asp149 cũng nằm cách xa phần trung tâm của rãnh gắn kết. Khi phân tích sự tương tác của các phối tử được mô phỏng gắn kết vào IL-33 tại vị trí này, Glu144 là điểm nóng quan trọng có thể hình thành liên kết ion hoặc hydro với phân tử nhỏ với tần suất cao hơn Glu148 hay Asp244. Điều này được giải thích bởi định hướng của nhóm acid chuỗi bên của Glu144 được định hướng vào rãnh gắn kết. Do đó, Glu144 cần được chú trọng như một điểm nóng hàng đầu. Sự tập trung vào việc tạo cầu muối với một acid amin điểm nóng đã được chứng minh qua thành công của việc khám phá phân tử nhỏ Ro26-4550 ức chế IL-2.²⁴⁸ Một chiến lược có thể áp dụng trong các nghiên cứu tiếp theo là sàng lọc các mảnh cấu trúc có thể liên kết chặt chẽ với acid amin này và từ đó tiếp tục phát triển cấu trúc để thu được các phân tử gắn kết ái lực cao hơn với IL-33.

4.3.3. Sàng lọc chất ức chế ST2 tại vị trí 1 của PPI

Như các phân tích về vị trí gắn kết ở phần trước, vị trí 1 trên bề mặt PPI của ST2 có tính chất thuận lợi cho việc thiết kế và sàng lọc chất ức chế phân tử nhỏ hơn so với

IL-33. Với cùng hướng tiếp cận sử dụng phương pháp pharmacophore “bắt chước” PPI, các mô hình đã chỉ dẫn cho quá trình sàng lọc ảo và tìm kiếm được các hợp chất gắn kết thành công với ST2 bằng cách liên kết với các acid amin quan trọng của thụ thể. Nghiên cứu cũng đã sử dụng hợp chất iST2-1 như chất đối chứng trong các sàng lọc ảo. Các hợp chất dẫn đầu của nghiên cứu đều có ái lực gắn kết tốt hơn so với iST2-1 ($\Delta G_{\text{dock}} = -4,4$ kcal/mol). Phức hợp của các chất này với thụ thể ST2 được đưa vào các mô phỏng MD ngắn 20 ns, qua đó sự hiện diện của các phối tử làm tăng tính ổn định của protein. Dựa vào khả năng tương tác với các acid amin điểm nóng và $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$, 4 hợp chất tiềm năng nhất đã được chọn vào các mô phỏng MD dài 100 ns để khảo sát tính ổn định trong sự gắn kết giữa chúng và thụ thể ST2. ZINC16933127 và ZINC59514725 là những phối tử triển vọng nhất với các biểu đồ RMSD protein, RMSD phối tử, $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$ và tần suất hình thành các loại liên kết rất ổn định.



Hình 4.4. Cấu trúc của các chất ức chế ST2 thực nghiệm (iST2-1, iST2-1a và **32**) và các chất gắn kết tiềm năng được sàng lọc từ đề tài (ZINC08911140 và ZINC40658091)

Về cấu trúc, các hợp chất tiềm năng được xác định từ nghiên cứu *in silico* trong đề tài này như ZINC08911140 và ZINC40658091 (**Hình 4.4**) chia sẻ nhóm nitrophenyl tương tự như các chất ức chế ST2 được báo cáo bởi Ramadan và cộng sự, Yuan và cộng sự.²²⁻²⁴ Trong mô hình mô phỏng gắn kết, nhóm nitro nhận liên kết hydro từ các acid amin điểm nóng của ST2 như Lys hay Arg. Bên cạnh đó, cả 4 hợp chất tiềm năng đều có cấu trúc chứa acid benzoic và đóng vai trò nhận liên kết hydro từ các acid amin có tính base gồm Lys22, Arg35, Arg38 và Arg198 của thụ thể. Đặc điểm cấu trúc này được ủng hộ bởi nghiên cứu của Yuan và cộng sự, trong đó acid

nicotinic và acid salicylic đã được báo cáo khả năng gắn kết với ST2 tại vị trí 1 của bề mặt PPI và ức chế tương tác IL-33/ST2 trong thử nghiệm HTRF với IC_{50} lần lượt là 5,89 và 2,47 mM.¹⁵²

4.3.4. Sàng lọc chất ức chế IL-33 tại vị trí 2

Mặc dù các báo cáo của Kim và cộng sự (2016), Adamu và cộng sự (2021), Le và cộng sự (2023) đã sử dụng mô hình gắn kết phân tử tại vị trí 2 của IL-33, vẫn chưa có một khảo sát toàn diện nào để đánh giá tính phù hợp cho việc phát triển thuốc phân tử nhỏ tại các vị trí liên kết khác nhau trên IL-33.^{20,25,26} Trong đề tài này, với sự gợi ý của các công cụ dự đoán vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ, đặc biệt là qua quá trình khảo sát bằng mô phỏng CMD, vị trí 2 tại bề mặt PPI của IL-33 đã được tập trung nghiên cứu để phát triển các mô hình sàng lọc *in silico*.

Đầu tiên, mô hình PH4-IL33-S2-M1 được xây dựng theo cách tiếp cận ban đầu của nghiên cứu, tức phương pháp “bắt chước” PPI. Xuất phát từ 3 điểm nóng thực nghiệm gồm Tyr163, Glu165 và Leu182 của IL-33 tương tác với Leu246, Leu306, Leu311 và Arg313 của ST2, truy vấn pharmacophore 4 điểm đã được tạo ra và sàng lọc qua các thư viện hóa học. Như một bước phát triển so với các mô hình pharmacophore đầu tiên của đề tài, mô hình PH4-IL33-S2-M1 được thêm các điểm loại trừ thể tích nhằm tăng tính chọn lọc cho mô hình (**Hình 3.16**). Từ đó, các hợp chất thỏa mãn mô hình sẽ có kích thước và hình dạng phù hợp với khoang gắn kết tại vị trí 2 của IL-33. Với 3 điểm kỵ nước và 1 điểm cation hoặc cho liên kết hydro, mô hình phản ánh đặc tính của lõi kỵ nước tại vị trí này của IL-33.

Mô hình đã được sử dụng để sàng lọc qua các thư viện hóa học. Từ giai đoạn này, đề tài đã tự tạo được một cơ sở dữ liệu cấu dạng cho các thư viện hóa học định hướng PPI từ những nhà cung cấp hợp chất thử nghiệm hàng đầu như Enamine, ChemDiv và Asinex. Do đó, mô hình đã được sử dụng để sàng lọc song song qua các công cụ trực tuyến như ZINCPharmer, PharmIT và cơ sở dữ liệu cấu dạng tự chuẩn bị. Để so sánh, 2000 hợp chất tốt nhất thỏa mãn mô hình pharmacophore từ công cụ trực tuyến và cơ sở dữ liệu định hướng PPI được tiếp tục sàng lọc qua mô hình gắn kết phân tử. Phân tích điểm số gắn kết tại **Hình 3.17A** cho thấy việc sàng lọc từ các thư viện định hướng PPI với số hợp chất ít hơn nhưng vẫn có thể cho kết quả gắn kết phân tử tốt hơn. Bởi IL-33 là một mục tiêu PPI, việc sử dụng các thư viện định hướng PPI có tiềm năng cho các hợp chất gắn kết tốt hơn so với việc tìm kiếm từ các thư viện tổng quát với số lượng hợp chất rất lớn. Cơ sở dữ liệu cấu dạng này hiện đã có thể sẵn sàng được sử dụng cho các dự án khám phá thuốc trên các mục tiêu PPI mới.

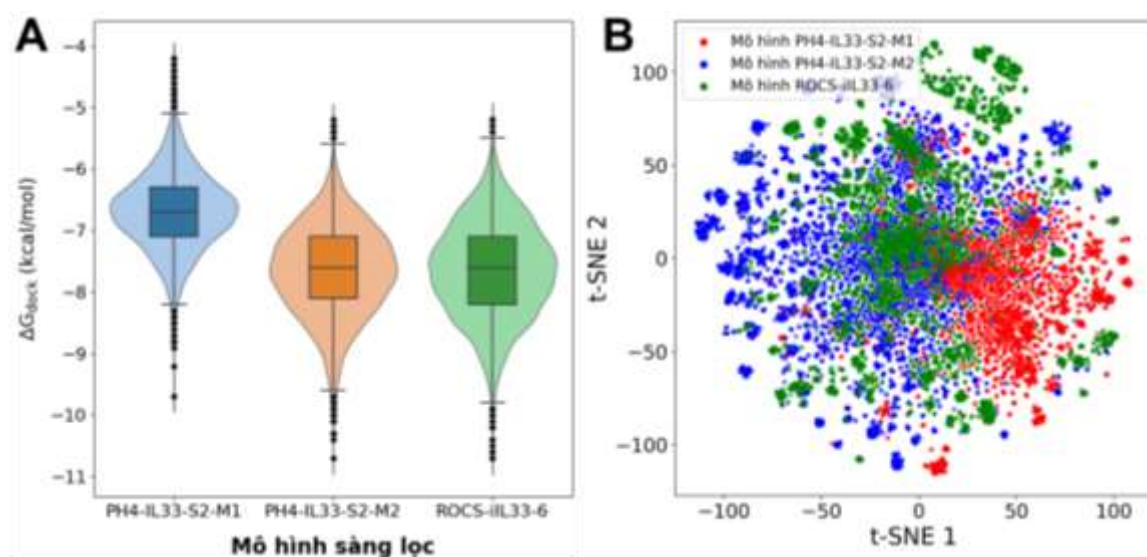
Sau khi sàng lọc qua các thư viện hóa học, 4000 hợp chất thỏa mãn mô hình pharmacophore đã được mô phỏng gắn kết và nhiều hợp chất có ΔG_{dock} tốt hơn so với

hợp chất **7c** được báo cáo bởi Kim và cộng sự.²¹ Trên cấu trúc tinh thể của IL-33, **7c** chỉ gắn kết với điểm số $-6,9$ kcal/mol. Các chất có điểm số gắn kết tốt nhất với ΔG_{dock} dưới $-7,5$ kcal/mol đã được lập hồ sơ ADMET. Mặc cho sự đơn giản của mô hình pharmacophore, các hợp chất dẫn đầu vẫn có tính chất phù hợp với các bộ quy tắc hóa dược như Lipinski và Pfizer. Kết quả này có thể đến từ vùng loại trừ thể tích được bổ sung vào mô hình. Các chất có tính chất ADMET thuận lợi bởi sự thỏa mãn quy tắc “Tam giác vàng” và không vi phạm PAINS để dẫn đến các dương tính giả trong thử nghiệm sinh học (**Hình 3.17C**). Bằng cách tính điểm lại cho phức hợp protein–phối tử với công cụ ước tính ái lực gắn kết HYDE, giá trị K_i HYDE đã gợi ý các hợp chất dẫn đầu được sàng lọc bằng mô hình PH4-IL33-S2-M1 có ái lực hàng nanomol. HYDE được lựa chọn để tính điểm lại bởi chương trình chú trọng đến đóng góp năng lượng của liên kết hydro, đồng thời tính toán năng lượng tự do desolvat hóa và tính điểm phạt cho các bất lợi về liên kết và góc liên kết. HYDE đã được chứng minh khả năng làm giảm dương tính giả.²¹⁸ Khi lựa chọn hợp chất tiềm năng để đưa vào các mô phỏng MD, cả điểm số gắn kết ΔG_{dock} và K_i HYDE đều được sử dụng và giúp tìm kiếm được các hợp chất tiềm năng Enamine Z8479543772, Enamine Z5129920608, Enamine Z19188025 và ZINC12152030. Các phối tử này gắn kết ổn định với IL-33, duy trì tương tác bền vững với các acid amin điểm nóng và có năng lượng tự do gắn kết xoay quanh giá trị -40 kcal/mol.

Bằng cách mô phỏng MD dài 5 μ s và phân cụm hậu MD, tư thế liên kết của chất ức chế **7c** với IL-33 tại vị trí 2 đã được đề xuất. Từ đó, cấu dạng gắn kết của IL-33/**7c** đã được sử dụng để tạo ra một truy vấn pharmacophore PH4-IL33-S2-M2 cho IL-33 tại vị trí này. Đồng thời, một cách tiếp cận khác được áp dụng là phương pháp tìm kiếm tương đồng hình dạng 3 chiều. Phương pháp làm việc trực tiếp trên cấu trúc phối tử mà không cần cấu trúc của protein. Cấu dạng của **7c** đã được tìm kiếm bằng chương trình vROCS và OMEGA với các mức RMS khác nhau. Các truy vấn ROCS đã được tạo cho mỗi cấu dạng và mô hình được xác thực trên tập kiểm tra có hoạt tính và tập mùn. Truy vấn ROCS-iIL33-6 cho kết quả tốt nhất đã được sử dụng để làm giàu lượng hợp chất có khả năng ức chế IL-33. Như vậy, trên cùng vị trí 2 tại bề mặt PPI, có 3 mô hình *in silico* khác nhau đã được tạo ra cho IL-33. Các chất thỏa mãn các mô hình đều được mô phỏng gắn kết bằng phần mềm AutoDock Vina. Sự phân bố điểm số gắn kết ΔG_{dock} của tập chất được sàng lọc từ mỗi mô hình được biểu diễn tại **Hình 4.5A**. Từ biểu đồ này, có thể thấy hai mô hình dựa trên phối tử **7c** có điểm số gắn kết trung bình và tối đa tốt hơn so với mô hình pharmacophore chỉ dựa trên các acid amin điểm nóng. Tuy nhiên, kết quả này không giải thích hoàn toàn cho hiệu năng sàng lọc của mô hình. Cần lưu ý rằng các chất thỏa hai mô hình PH4-IL33-

S2-M2 và ROCS-iIL33-6 được mô phỏng gắn kết trên cấu trúc IL-33 lấy mẫu từ mô phỏng MD trong phức hợp với **7c**. Trong cấu trúc đó, túi ẩn của IL-33 đã được mở và có thể giúp phối tử gắn kết tốt hơn vào lõi kỵ nước của protein.

Do mô hình PH4-IL33-S2-M2 và ROCS-iIL33-6 đều dựa trên hợp chất **7c**, các hợp chất thỏa mãn mô hình có thể bị ràng buộc theo kiểu cấu trúc của hợp chất này. Vì vậy, các chất thỏa mãn các mô hình đã được khảo sát tính đa dạng về mặt hóa học dựa trên dấu vân tay Morgan 3 và phân tích t-SNE. Trái ngược với dự đoán ban đầu rằng truy vấn ROCS sẽ giới hạn những hợp chất có khung cấu trúc tương tự **7c**, **Hình 4.5B** cho thấy mô hình này cho kết quả sàng lọc đa dạng nhất về mặt cấu trúc. Tương tự, mô hình PH4-IL33-S2-M2 được xây dựng dựa trên phức hợp IL-33/**7c** cũng có sự đa dạng hóa học nhất định chứ không co cụm trong một kiểu cấu trúc.



Hình 4.5. So sánh kết quả sàng lọc ảo của các mô hình pharmacophore PH4-IL33-S2-M1, PH4-IL33-S2-M2 và truy vấn tương đồng hình dạng 3 chiều ROCS-iIL33-6
(A) So sánh sự phân bố điểm số gắn kết AutoDock Vina. (B) Biểu diễn không gian hóa học theo dấu vân tay Morgan 3 và phân tích t-SNE của các tập chất thỏa mãn 3 mô hình.

4.4. Mô hình *in silico* dựa trên phối tử ức chế IL-33/ST2

4.4.1. Truy vấn tương đồng hình dạng phân tử 3 chiều

Đối với phương pháp tìm kiếm tương đồng dựa trên hình dạng 3 chiều, để tạo ra một truy vấn ROCS tốt thì việc tìm kiếm cấu dạng cho phân tử hoạt tính là quan trọng. Với chương trình OMEGA, giá trị RMS cần được khảo sát ở các mức khác nhau để thu được một tập hợp các cấu dạng đa dạng. Một giá trị RMS mặc định với mức 0,5 Å có thể cho ra những cấu dạng gần giống nhau và các truy vấn ROCS được xây dựng từ đó không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Đôi khi, những cấu dạng tốt hơn bị bỏ qua và mô hình thu được không phải là tối ưu nhất. Về bản chất, ROCS tương đồng với mô hình pharmacophore. Hình dạng 3D của ROCS tương đương với

chức năng Ligand Shape và bộ màu sắc quy ước của ROCS tương ứng với các chú thích đặc tính hóa học của pharmacophore. Tuy nhiên, ROCS có những ưu điểm quan trọng: (i) tốc độ sàng lọc rất nhanh, (ii) một phương pháp tính điểm định lượng (bộ hệ số tương đồng Tanimoto) tốt hơn so với giá trị RMSD đơn giản của mô hình pharmacophore, (iii) khả năng ứng dụng cao khi có thể được xây dựng trên một hợp chất cụ thể, một tập hợp những nguyên tử giả, một phần cấu trúc của protein, hoặc một lưới mật độ từ nghiên cứu tinh thể học tia X.^{124,125} Trong nghiên cứu này, ROCS đã được áp dụng để tìm kiếm các hợp chất tương đồng với **7c**. Một cách tiếp cận khác có thể áp dụng trong tương lai, đó là có thể xây dựng truy vấn ROCS dựa trên các vòng hoặc các chuỗi β của IL-33 hoặc ST2 để ức chế PPI. Phương pháp này đã được áp dụng bởi Lee và cộng sự khi sử dụng ROCS để bắt chước chuỗi xoắn α của IL-17 nhằm tìm kiếm các phân tử nhỏ ức chế sự tương tác của nó với IL-17R α .²⁴⁹

4.4.2. Mô hình pharmacophore dựa trên phối tử

Đối với phương pháp pharmacophore dựa trên phối tử ức chế thụ thể ST2, nghiên cứu đã xây dựng và đánh giá mô hình pharmacophore PH4-LB-iST2. Bằng cách sử dụng các tập không hoạt tính và tập môi nhử lớn hơn gấp nhiều lần so với tập hoạt tính, điểm số GH thu được từ các đánh giá là không cao bởi sự chênh lệch này. Do đó, phương pháp phân tích đường cong ROC và đánh giá hệ số làm giàu đã được sử dụng. Bằng cách sử dụng 4 tập không hoạt tính khác nhau – DUD-E, DUDE-Z, DeepCoy và tập không hoạt tính thật – mô hình PH4-LB-iST2 đều phân biệt được chất có và không có hoạt tính với giá trị ROC-AUC > 0,5 và hệ số làm giàu EF_{1%} cao. Tuy nhiên, các tập DUDE và DUDE-Z cho kết quả tốt hơn so với hai tập còn lại. Kết quả này gợi ý rằng mô hình pharmacophore nên được đánh giá chặt chẽ dựa trên bộ môi nhử được tạo bằng phương pháp “khớp tính chất”, mà DeepCoy là một công cụ tiêu biểu. Lý tưởng hơn là mô hình nên được đánh giá bằng một tập không hoạt tính thật. Trong nghiên cứu này, dữ liệu về chất không hoạt tính thật lên đến hơn 50 ngàn hợp chất, tạo ra sự chênh lệch quá lớn với số chất hoạt tính cũng như gây áp lực tính toán cho quá trình tìm kiếm cấu dạng. Do đó, các chất không hoạt tính đã được lấy mẫu từ bộ dữ liệu trên với tỉ lệ 1:50 bằng phần mềm DecoyFinder theo nguyên lý “khớp tính chất” đề xuất bởi Stein và cộng sự.¹³⁶

Báo cáo của Ramadan và cộng sự đã sử dụng 4 chất ức chế thu được từ một chương trình sàng lọc thông lượng cao để xây dựng mô hình pharmacophore dựa trên phối tử. Mô hình chứa 3 điểm vòng thơm hoặc kỵ nước (Aro|Hyd) và 1 điểm nhận hoặc cho liên kết hydro (Acc|Don).²² Mô hình đã chia sẻ các đặc điểm vòng thơm hoặc kỵ nước với mô hình PH4-LB-iST2 của nghiên cứu này. Khi xem xét tất cả các mô hình pharmacophore thu được, một mẫu số chung thú vị đã được quan sát. Tất cả

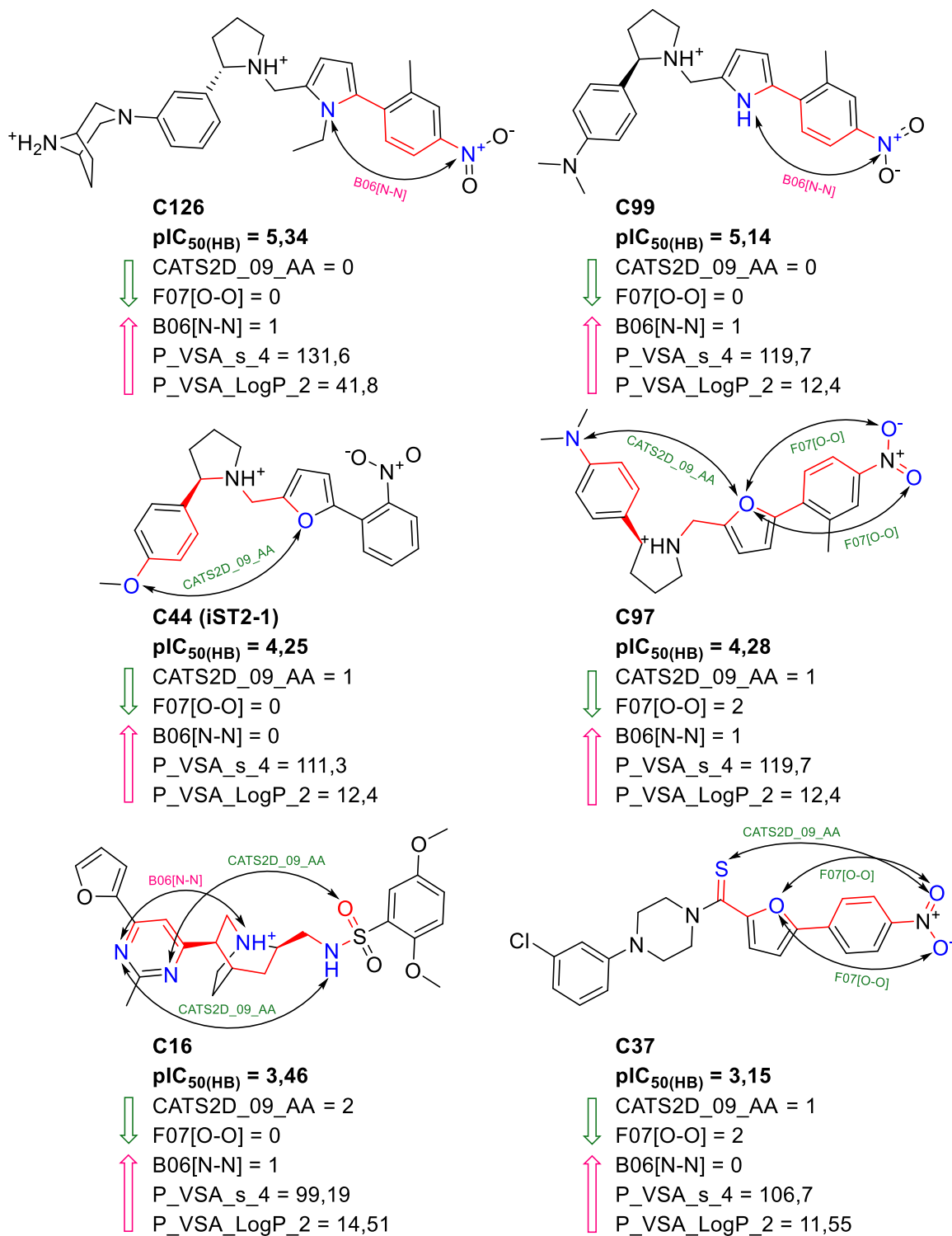
các chất hoạt tính đã chia sẻ với nhau cấu dạng hình chữ U, được hình thành bởi ít nhất 4 vòng (**Hình 3.25**). Điểm chung thứ hai được quan sát khi giống hệt các cấu trúc hoạt tính là sự hiện diện của nhóm nitro. Tuy nhiên, do định hướng khác nhau của nhóm này trên vòng thơm (*ortho* hoặc *para*) làm cho chương trình tạo pharmacophore không thể xác định đây là điểm chung (**Hình PL22.2, PHỤ LỤC 22**). Chính đặc điểm này đã góp phần giới hạn điểm số GH của mô hình. Trong khuôn khổ của đề tài, mô hình PH4-LB-iST2 chưa được ứng dụng vào sàng lọc ảo. Dù vậy, mô hình đã được đánh giá theo các tiêu chí cần thiết. Trước hết, mô hình có ý nghĩa gợi ý cho việc thiết kế chất ức chế ST2: yêu cầu về tính kỵ nước, các vòng thơm hoặc vòng π và cấu dạng chữ U đặc trưng. Trong các nghiên cứu tiếp theo, mô hình có thể được phát triển để cải thiện chỉ số đánh giá (như điểm số GH) và mô tả được đặc tính của nhóm nitro. Khi áp dụng trên thư viện hợp chất nội bộ, cấu dạng chữ U đặc biệt từ mô hình PH4-LB-iST2 đã giúp tìm kiếm được các hợp chất có hoạt tính chứa khung morpholinoalkoxychalcon như T651 và T655 (**Hình PL22.2, PHỤ LỤC 22**).

4.4.3. Mô hình mối liên quan định lượng giữa cấu trúc và tác động của các chất ức chế IL-33/ST2 trên tế bào HEK-Blue IL-33

Bằng cách thiết lập các mô hình QSAR sử dụng thuật toán PLS, mối liên quan cấu trúc – tác động của các chất ức chế IL-33/ST2 trên dòng tế bào HB đã được làm sáng tỏ. Với quan niệm không có mô hình tối ưu, hầu hết các mô hình đều có thể sai nhưng một số mô hình có ích, đề tài đã giữ lại 5 mô hình QSAR có kết quả đánh giá tốt nhất. Các mô hình đều được xây dựng và thẩm định theo hướng dẫn của OECD. Một cách truyền thống, nghiên cứu chỉ sử dụng những bộ thông số mô tả tối thiểu (khoảng 1/10 số chất trong tập dữ liệu) để tìm kiếm các mô hình QSAR đơn giản nhưng giải thích được tối đa dữ liệu. Các kết quả đánh giá đều cho thấy mô hình không bị quá khớp (overfitting) hoặc dưới khớp (underfitting). Các mô hình đã đáp ứng 4 tiêu chí quan trọng nhất của OECD: (i) điểm cuối xác định (ở đây là giá trị $pIC_{50(HB)}$), (ii) thuật toán rõ ràng, (iii) miền ứng dụng được xác định, (iv) được đánh giá chặt chẽ. Tiêu chí thứ 5 là mô hình có thể diễn giải một cách cơ học.¹²⁸ Ý nghĩa các thông số mô tả trong mô hình được giải thích ở **Bảng PL23.1, PHỤ LỤC 23**. Trong đó, một số thông số mô tả về pharmacophore, cặp nguyên tử 2D và diện tích bề mặt *Van der Waals* có thể được giải thích như tại **Hình 4.6**.

Một số thông số làm giảm hoạt tính, đại diện như CATS2D_09_AA (cặp nhóm nhận liên kết hydro cách nhau 9 liên kết) và F07[O-O] (tần suất của cặp nguyên tử O-O ở khoảng cách topo bằng 7). Các hợp chất có hoạt tính mạnh nhất không sở hữu những đặc tính này, như C126 và C99. Trong khi đó, những chất có hoạt tính trung bình (iST2-1, C97) hoặc kém (C16, C37) đều có các thông số này với giá trị từ 1–2.

Ngược lại, một số thông số mô tả quyết định sự gia tăng hoạt tính, đại diện là các thông số giống diện tích bề mặt *Van der Waals* (P_VSA-like) như P_VSA_s_4 và P_VSA_LogP_2. Các thông số này càng lớn thì hợp chất có $pIC_{50(HB)}$ càng cao. Tương tự, sự hiện diện của cặp nguyên tử N–N ở khoảng cách topo bằng 6 (B06[N–N]) cũng góp phần gia tăng hoạt tính.



Hình 4.6. Sự diễn giải cơ học đối với mô hình QSAR-HB

Biểu đồ biến số quan trọng trong dự đoán (Variable Importance in Prediction – VIP) của các mô hình được trình bày tại **Hình PL23.6, PHỤ LỤC 23**. Các thông số mô tả có tầm quan trọng đối với giá trị hoạt tính $pIC_{50(HB)}$ (với điểm số VIP > 1) gồm SM14_AEA(dm), P_VSA_s_4, SsssNH+, TSRW10, B06[N-N] và VR3_Dzs. Nhận xét tương tự cũng có thể được rút ra từ quan sát trên biểu đồ tải của các mô hình (**Hình PL23.7, PHỤ LỤC 23**).

Phương pháp dự đoán đồng thuận đã được áp dụng để tăng khả năng dự đoán của các mô hình QSAR-HB riêng lẻ. Kết quả tại **Bảng PL23.3, PHỤ LỤC 23** cho thấy mô hình đồng thuận đã giúp tăng hệ số Q_{F1}^2 , Q_{F2}^2 và giảm MAE khi đánh giá ngoại trên tập kiểm tra, đặc biệt ở mô hình có dữ liệu được phân chia theo thời gian. Trong các phép chia dữ liệu, phân chia theo thời gian có giá trị cao nhất bởi nó phản ánh đúng thực tế rằng mô hình sẽ được ứng dụng để dự đoán trên các tập chất mới trong tương lai. Trong nghiên cứu này, dự đoán đồng thuận trên tập kiểm tra được phân chia theo thời gian đạt giá trị $Q_{F1}^2 = 0,95$; $Q_{F2}^2 = 0,51$; $Q_{F3}^2 = 0,82$; CCC = 0,71 và MAE = 0,12, thể hiện khả năng khái quát hóa của mô hình. Mô hình đã được ứng dụng để dự đoán trên thư viện hợp chất nội bộ, với T821 là hợp chất dẫn đầu (**Bảng PL24.6, PHỤ LỤC 26**). Kết quả thử nghiệm *in vitro* đã xác nhận đây là hợp chất có hoạt tính ức chế IL-33/ST2 trên dòng tế bào HB, với $IC_{50(HB)} = 46,54 \mu M$.

Nhằm mục đích so sánh, các bộ dữ liệu 7 thông số mô tả phân tử để xây dựng các mô hình QSAR-HB được sử dụng để xây dựng các mô hình học máy với các thuật toán khác nhau, gồm SVM, Random Forest, XGBoost và LightGBM. **Bảng PL23.4, PHỤ LỤC 25** cho thấy các mô hình học máy đều có khả năng dự đoán trên tập kiểm tra kém hơn mô hình PLS. Bên cạnh đó, nếu sử dụng các bộ dấu vân tay phân tử thay cho thông số mô tả, vẫn không có mô hình học máy nào cho kết quả đánh giá tốt hơn mô hình PLS (**Bảng PL25.5, PHỤ LỤC 25**). Những kết quả này gợi ý rằng cần thận trọng khi sử dụng các thuật toán học máy cho các bộ dữ liệu nhỏ. Đồng thời, các mô hình học máy cũng nên được đánh giá một cách chặt chẽ hơn bằng các chỉ số được sử dụng phổ biến như trong thẩm định mô hình QSAR truyền thống.

4.5. Thử nghiệm *in vitro* đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2

4.5.1. Sự phù hợp của mô hình thử nghiệm dựa trên dòng tế bào HEK-Blue

Trong nghiên cứu này, thử nghiệm dựa trên dòng tế bào HB đã được sử dụng để đánh giá tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 của các hợp chất được lựa chọn với sự định hướng của sàng lọc *in silico*. Ưu điểm của thử nghiệm này là dòng tế bào đã được thiết kế để liên kết “gen báo cáo” SEAP với con đường tín hiệu IL-33/ST2 và không đáp ứng với các loại cytokin khác. Mặt khác, InvivoGen cũng đã xác thực tính

phù hợp của dòng tế bào HB trong việc sử dụng cho thử nghiệm đánh giá tác động ức chế IL-33. Trong đó, sự phong tỏa tác dụng kích thích của IL-33 trên tế bào đã được xác nhận bằng cách sử dụng kháng thể kháng IL-33 và sST2.²²

IL-33 được sử dụng trong đề tài là protein có trình tự của người, được tổng hợp bằng phương pháp tái tổ hợp và biểu hiện trên chủng vi khuẩn *Escherichia coli* BL21.²³⁶ Protein thu được có khả năng hòa tan trong dung dịch đệm và môi trường thử nghiệm. Sau khi tái tổ hợp, IL-33 được nhận diện bởi kháng thể trong bộ kit ELISA IL-33 (Thermo Fisher). Đồng thời, protein cũng đã được đánh giá tác động kích thích phụ thuộc nồng độ trên tế bào HB (**Hình 3.27A**), góp phần chứng minh cho chức năng của protein được tổng hợp trong điều kiện Việt Nam.

Trong lĩnh vực khám phá thuốc mới trên các mục tiêu interleukin, thử nghiệm trên dòng tế bào HEK-Blue cũng đã được áp dụng bởi hãng Novartis trên IL-1 β , Quinnell và cộng sự trên IL-4, Ramadan và cộng sự trên IL-33/ST2.^{22,250,251} Tuy vậy, cần lưu ý rằng thử nghiệm này không cho biết hợp chất được khảo sát thực sự gắn kết trên IL hay thụ thể của chúng. Do đó, thử nghiệm đánh giá gắn kết sử dụng quang phổ huỳnh quang đã được áp dụng để xác định phối tử gắn kết thực sự trên IL-33.

Trong nghiên cứu này, do sự sẵn có trên thị trường, hợp chất iST2-1 báo cáo bởi Ramadan và cộng sự đã được sử dụng làm đối chứng dương. Thử nghiệm tác động ức chế phụ thuộc nồng độ của iST2-1 trên tế bào HB cho giá trị $IC_{50} = 48,69 \pm 1,27 \mu M$ ($n = 3$), phù hợp với báo cáo của Ramadan và cộng sự ($IC_{50} = 56,42 \mu M$).²²

4.5.2. Tiềm năng của các hợp chất có hoạt tính trong thử nghiệm sử dụng dòng tế bào HEK-Blue IL-33

Dựa trên các báo cáo của Ramadan và cộng sự, Yuan và cộng sự,^{22,23} nồng độ chất thử 100 μM đã được lựa chọn để đánh giá ban đầu đối với tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên tế bào HB. Sau đó, một số hợp chất tiềm năng bao gồm 4 dẫn chất quercetin, 1 dẫn chất morpholinoalkoxychalcon và 3 hoạt chất hóa dược có hoạt tính ức chế $\sim 100\%$ ở 100 μM đã được xác định giá trị IC_{50} . Trong đó, 3 hoạt chất hóa dược gồm loratadin, rupatadin và montelukast có hoạt tính ức chế tương đương đối chứng dương, với IC_{50} lần lượt là $50,26 \pm 1,03$; $48,35 \pm 1,07$ và $46,54 \pm 1,03 \mu M$. Đáng chú ý, hợp chất T651 với cấu trúc morpholinoalkoxychalcon có hoạt tính ức chế mạnh hơn đối chứng dương, với $IC_{50} = 31,61 \pm 1,15 \mu M$.

Quercetin chứa một khung cấu trúc tiềm năng khi có nhiều dẫn chất thể hiện hoạt tính ức chế mạnh hơn iST2-1 ở nồng độ 100 μM . Trong đó, T713 là hợp chất tiềm năng nhất với $IC_{50} = 23,85 \pm 1,17 \mu M$. T721 cũng là một hợp chất triển vọng, khi nồng độ giảm đến 1,56 μM vẫn còn ức chế $\sim 50\%$ hoạt tính của IL-33 trên tế bào. Do đó, hoạt tính của hợp chất này cần được tiếp tục khảo sát thêm. Ngoài ra, T823, T824

và T825 cũng là những dẫn chất quercetin tiềm năng (**Hình PL27.1, PHỤ LỤC 27**) và cần được xác định giá trị IC_{50} trong các nghiên cứu nối tiếp.

Nhìn chung, hoạt tính của các hợp chất kể trên tốt hơn nhiều hợp chất được liệt kê trong bảng sáng chế WO2017/083242A1 (Yang và Paczesny, 2016) và có thể so sánh với nghiên cứu của Yuan và cộng sự (2022). Trong đó, các tác giả báo cáo các chất ức chế ST2 được tối ưu hóa từ iST2-1 với IC_{50} trên tế bào HB từ 33 đến 60 μM .²³ Ở một khía cạnh khác, khi xem xét hoạt tính ức chế của các hợp chất đã được báo cáo trong y văn và thu được từ đề tài, thử nghiệm HB có độ nhạy thấp hơn các thử nghiệm trực tiếp dựa trên PPI (như AlphaLISA hay HTRF) trong việc phân biệt hoạt tính của chất ức chế. Tuy nhiên, trong điều kiện Việt Nam, mô hình thử nghiệm dựa trên HB có tính khả thi cao hơn và chi phí thực hiện thấp hơn.

Trong thử nghiệm MTT, **Hình 3.30** cho thấy tỉ lệ sống trung bình của tế bào khi được xử lý với các hợp chất thử nghiệm là 86,4–130,8% ở nồng độ 100 μM . Đây là nồng độ cao nhất được sử dụng trong thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2, cho thấy hoạt tính làm giảm tín hiệu SEAP của các hợp chất chủ yếu do ức chế sự tương tác của IL-33 và ST2 chứ không phải do tác động gây độc tế bào. Tỉ lệ sống của tế bào HB khi được xử lý với các hợp chất thử nghiệm và iST2-1 được xác định trong đề tài tương đương với các dẫn xuất của iST2-1 được thử nghiệm MTS trong nghiên cứu của Yuan và cộng sự (42,5–111,9%).^{23,24}

4.5.3. Thử nghiệm khảo sát sự gắn kết giữa T821 và IL-33 sử dụng quang phổ huỳnh quang

Do máy quang phổ huỳnh quang Hitachi F7000 sử dụng cuvet dày 1 cm đòi hỏi lượng lớn dung dịch thử, trong khi khối lượng protein có thể tái tổ hợp còn hạn chế, nên kết quả hiện tại của đề tài chỉ mới thu được kết quả đánh giá sự gắn kết của T821 (montelukast) với IL-33. Hiệu ứng lọc nội tại của T821 ít ảnh hưởng đến kết quả của thử nghiệm, phản ánh qua phổ UV-Vis của hợp chất. Tuy nhiên, sự phát xạ huỳnh quang riêng của T821 tại vùng bước sóng gần với cực đại phát xạ huỳnh quang của IL-33 đã gây ra hiện tượng tăng cường độ huỳnh quang trong thử nghiệm, thay vì sự giảm phụ thuộc nồng độ như kỳ vọng. Đặc điểm phát quang này của T821 đã được ghi nhận trong các báo cáo trước đây.^{252,253} Chính vì vậy, bước sóng tại một đỉnh có cường độ phát xạ huỳnh quang thấp hơn (320 nm) đã được khảo sát và sự giảm cường độ huỳnh quang của IL-33 phụ thuộc nồng độ T821 đã được ghi nhận. Bằng cách ứng dụng phương trình Stern-Volmer, T821 đã được chứng minh là gây tắt quang tĩnh đối với IL-33 và có sự hình thành phức hợp protein–phối tử với tỉ lệ 1:1.

Do thiếu dữ kiện thực nghiệm về thời gian sống huỳnh quang của IL-33, giá trị τ_0 giả định được sử dụng trong thử nghiệm này là 10^{-8} s, ứng với thời gian tắt quang

tối đa của một đại phân tử protein. Thực tế, nếu sử dụng bất kỳ giá trị nào của τ_0 trong khoảng 10^{-9} – 10^{-8} s thì giá trị k_q thu được đều lớn hơn rất nhiều so với hằng số tốc độ dập tắt lưỡng phân tử của phản ứng tắt quang động ($2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Do đó, cơ chế tắt quang của IL-33 khi có mặt của T821 đều có thể được chứng minh là quá trình tắt quang tĩnh với bất kỳ giá trị τ_0 thực nghiệm nào của protein.

Trong các nghiên cứu tương lai, thử nghiệm này có thể được triển khai trên máy quang phổ huỳnh quang có chức năng đọc đĩa đa giếng nhằm tăng thông lượng sàng lọc và giảm lượng IL-33 cần sử dụng. Bên cạnh đó, việc xác định hệ số góc K_{SV} tại các nhiệt độ khác nhau có thể được thực hiện để xác định cơ chế tắt quang với độ tin cậy cao hơn. Quá trình này cần được thực hiện trong điều kiện các nhiệt độ phải được giữ ổn định, với sự hỗ trợ của bộ phận điều nhiệt. Với phương pháp này, năng lượng tự do gắn kết có thể được xác định bởi phương trình Van't Hoff (19):

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (19)$$

với:

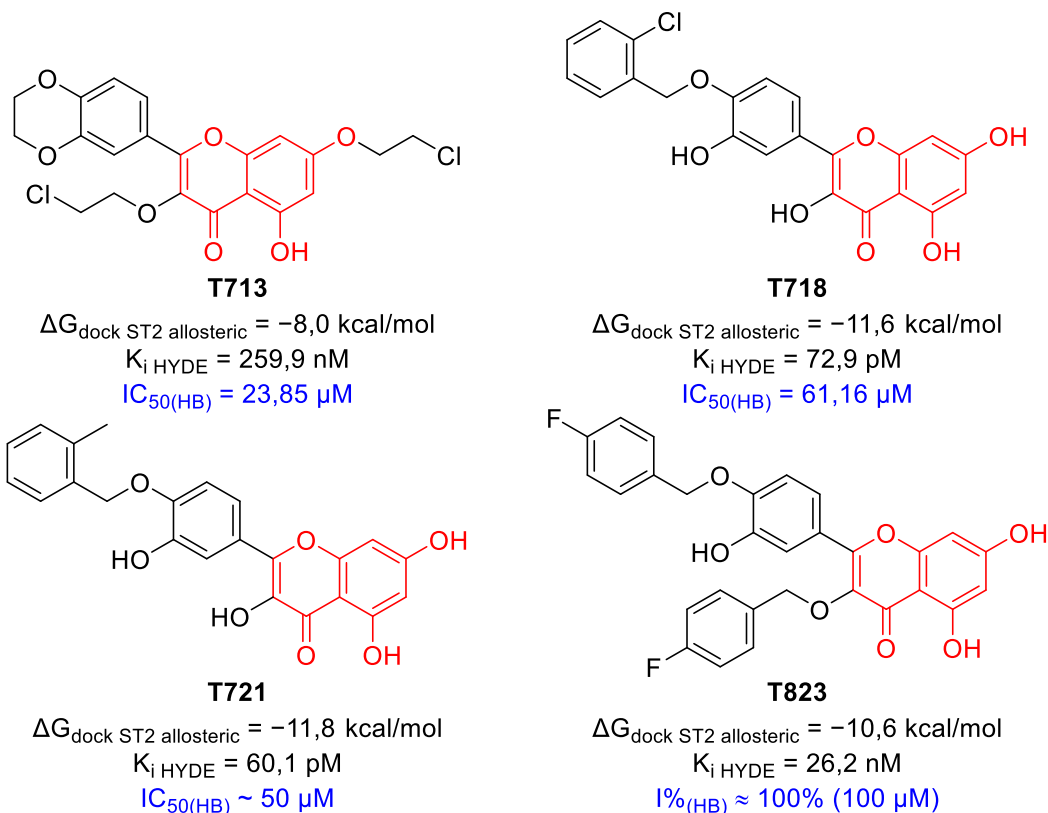
- K_a : hằng số kết hợp tại nhiệt độ thử nghiệm T
- R: hằng số khí lý tưởng ($8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- T: nhiệt độ thử nghiệm (K)
- ΔH là biến thiên enthalpy ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- ΔS là entropy ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)

Khi biểu diễn đồ thị của $\ln K_a$ theo giá trị $1/T$, giá trị ΔH và ΔS có thể được xác định dựa trên hệ số góc và hệ số chặn của phương trình hồi quy. Khi nhiệt độ thử nghiệm chênh lệch không đáng kể, ΔH có thể được xem là hằng số và năng lượng tự do gắn kết ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) được tính theo công thức (20):

$$\Delta G_{\text{gắn kết}} = \Delta H - T\Delta S \quad (20)$$

4.5.4. Hiệu quả của các mô hình *in silico* trong việc xác định các hợp chất có hoạt tính *in vitro*

Các mô hình *in silico* đã giúp tìm kiếm được một số hợp chất tiềm năng có hoạt tính được xác nhận qua thử nghiệm *in vitro*, được trình bày tóm tắt tại **PHỤ LỤC 29**. Đặc biệt, lần đầu tiên túi gắn kết allosteric trên ST2 được đề xuất là một vị trí gắn kết phù hợp cho chất ức chế phân tử nhỏ. Qua sàng lọc bằng mô phỏng gắn kết phân tử, quercetin (T296) và các dẫn chất đã thể hiện ái lực gắn kết cao với ST2 tại túi allosteric này. Điển hình là T721 ($K_{i \text{ HYDE}} = 60,1 \text{ pM}$) và T718 ($K_{i \text{ HYDE}} = 72,9 \text{ pM}$). Kết quả dự đoán triển vọng này là động lực để đề tài thu thập và thử hoạt tính cho quercetin và 18 dẫn chất trong thư viện hợp chất nội bộ. Các hợp chất này là sản phẩm đơn hoặc đa thể trên các nhóm -OH của quercetin (**Hình 4.7**).



Hình 4.7. Cấu trúc hóa học, dự đoán *in silico* và hoạt tính *in vitro* ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HB của một số dẫn chất quercetin

Thử nghiệm *in vitro* đã xác nhận 7 hợp chất có hoạt tính, bao gồm cả T296, T718 và T721. Thử ví là T713 là hợp chất có hoạt tính mạnh nhất trong thử nghiệm ($IC_{50} = 23,85 \text{ }\mu\text{M}$) mặc dù không dẫn đầu về các kết quả dự đoán ái lực. Hợp chất này thỏa mãn mô hình PH4-LB-iST2 và gắn kết trên thụ thể với $K_{i \text{ HYDE}}$ dự đoán là 259,9 nM. Vì vậy, T713 đã được khảo sát thêm bằng mô phỏng MD 100 ns. Kết quả tại **PHỤ LỤC 25** cho thấy T713 gắn kết rất ổn định với ST2 và có $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}} = -45,0 \pm 4,0 \text{ kcal/mol}$, mạnh hơn so với cả T718 và T721. Bên cạnh đó, T823, T824 và T825 là các dẫn chất quercetin được phát triển tương tự T713 và ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên HB ~100% ở nồng độ 100 μM . Với $K_{i \text{ HYDE}}$ dự đoán trên ST2 từ 24,2–90,3 nM, đó là những chất ức chế tiềm năng và cần được đánh giá thêm trong tương lai.

Việc phát hiện các dẫn chất quercetin có hoạt tính trong đề tài này gợi mở hướng nghiên cứu các hợp chất flavonoid đối với tác động điều chỉnh tín hiệu IL-33/ST2. Phát hiện này phù hợp với nghiên cứu của Funakoshi-Tago và cộng sự về hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33 trên tế bào BMMC của các flavonoid trong keo ong Nepal. Tiêu biểu, chrysin làm giảm sự kích hoạt NF- κ B và các cytokin được cảm ứng sản xuất bởi IL-33 như IL-6, TNF- α và IL-13.¹⁵⁴

T814 (loratadin) và T815 (rupatadin) là hai thuốc kháng histamin H₁ chứa cấu trúc benzo[5,6]cyclohepta[1,2-*b*]pyridin. Với cấu trúc 3 vòng như chất ức chế 7c của

IL-33, hai hợp chất này có điểm số Tanimoto tổng thể so với với **7c** khi sàng lọc qua truy vấn ROCS-iIL33-6 lần lượt là 0,822 và 0,776. Rupatadin được dự đoán gắn kết trên IL-33 tốt hơn so với loratadin khi xem xét ΔG_{dock} ($-8,8$ so với $-6,9$ kcal/mol) và $K_{\text{i HYDE}}$ (188 nM so với $8,4 \mu\text{M}$). Theo sau đó, kết quả thử nghiệm *in vitro* đã khẳng định tác dụng của hai hợp chất. Tuy nhiên, kết quả *in silico* còn cho thấy rupatadin cũng thỏa mãn mô hình PH4-LB-iST2 và có điểm số gắn kết tốt trên thụ thể ST2 (ΔG_{dock} trên vị trí orthosteric và allosteric lần lượt là $-9,4$ và $-10,0$ kcal/mol). Dù vậy, khi tính điểm lại với chương trình HYDE, rupatadin không được nhận diện là một phối tử tiềm năng của ST2 khi có $K_{\text{i HYDE}}$ lên đến $8,23 \times 10^{11}$ nM. Với những kết quả hiện tại, rupatadin được đề xuất là có cơ chế gắn kết với IL-33 tại vị trí 2 như loratadin, nhưng các thử nghiệm *in vitro* vẫn cần được thực hiện thêm để khẳng định.

Trong kết quả sàng lọc *in silico*, hợp chất T821 (montelukast) gắn kết trên IL-33 với $K_{\text{i HYDE}} = 33$ nM. Đồng thời, đây cũng là chất dẫn đầu trong dự đoán bằng mô hình QSAR-HB. Từ một hợp chất tiềm năng được lựa chọn từ kết quả tính toán, tác động ức chế IL-33 của montelukast đã được khẳng định bởi cả hai thử nghiệm: thử nghiệm đánh giá gắn kết trên IL-33 và thử nghiệm chức năng trên dòng tế bào HB. Tương tự, dẫn chất morpholinoalkoxychalcon T651 cũng thỏa mãn các mô hình *in silico* trên IL-33 gồm mô hình pharmacophore PH4-IL33-S1-M1, gắn kết phân tử với $K_{\text{i HYDE}} = 18,1$ nM và đã thể hiện hoạt tính trên thử nghiệm với dòng tế bào HB.

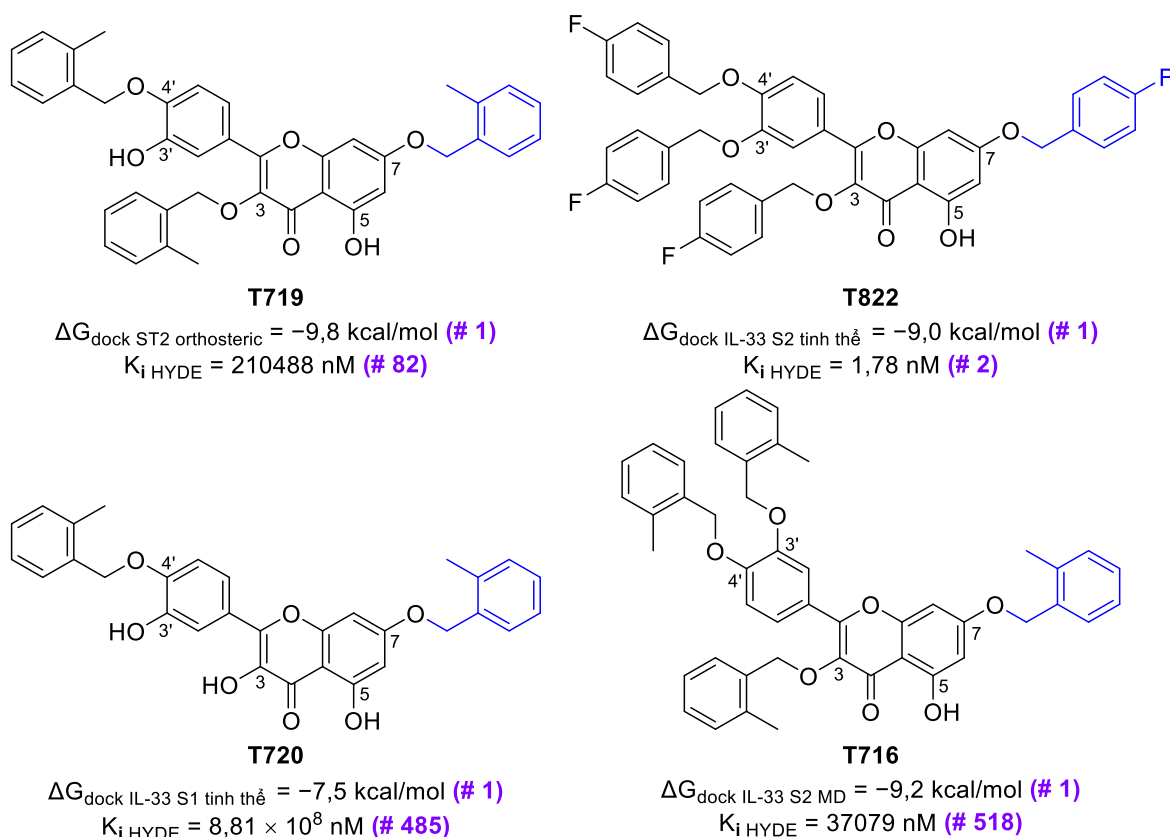
Tại vị trí orthosteric 1 của PPI IL-33/ST2, các mô hình pharmacophore gồm PH4-IL33-S1-M1 và PH4-ST2-S1-M1 đã xác định T789 là hợp chất tiềm năng duy nhất (**Bảng PL24.1, PL24.2, PHỤ LỤC 24**). Thử nghiệm trên mô hình tế bào HB cho thấy hợp chất này có hoạt tính ức chế 55,73% ở nồng độ $100 \mu\text{M}$. Như đã thảo luận ở những phần trước, do tính chất nông và tích điện của vị trí này mà khả năng sàng lọc của các mô hình *in silico* còn hạn chế và các phương pháp tiếp cận mới cần được áp dụng để đạt hiệu quả cao hơn.

4.5.5. Mối liên quan cấu trúc – tác động của các dẫn chất quercetin

Dẫn chất quercetin là một trường hợp thú vị khi xem xét mối liên hệ giữa hoạt tính sinh học với cấu trúc và kết quả dự đoán *in silico*. **Hình 4.8** minh họa cấu trúc của một số hợp chất không thể hiện hoạt tính ức chế trong thử nghiệm trên tế bào HB. Không như các chất có hoạt tính tại **Hình 4.7**, các hợp chất này đều có nhóm thế chứa vòng thơm trên nhóm -OH ở C_7 . Như vậy, cùng với nhóm -OH ở C_5 , nhóm -OH ở C_7 cần được giữ tự do hoặc gắn một nhóm thế khác phù hợp hơn (như chloroethyl ở T713).

Ở một khía cạnh khác, nhóm thế lớn tại -OH C_7 làm tăng khối lượng phân tử và độ thân dầu của hợp chất. Từ đó, các hợp chất này được AutoDock Vina tính điểm ΔG_{dock} tốt hơn và đều xếp hạng 1 trên các vị trí gắn kết của IL-33 và ST2 (**Hình 4.8**).

Đây là một thiên lệch thường gặp của chương trình mô phỏng gắn kết phân tử.²⁵⁴ Khi sử dụng HYDE để “tính điểm lại”, 3 trong 4 hợp chất đã được loại ra khỏi danh sách các “hit” dẫn đầu (T719, T720 và T716). Bằng cách sử dụng các đại lượng năng lượng liên quan đến liên kết hydro và năng lượng desolvat hóa, HYDE có thể góp phần giảm tỉ lệ dương tính giả.²¹⁸ Nói cách khác, một hợp chất có cả ΔG_{dock} và $K_{\text{i HYDE}}$ được xếp hạng cao có thể có hoạt tính trong các thử nghiệm sinh học, như trường hợp của T296, T718, T721, T823 và T824.



Hình 4.8. Các hợp chất không thể hiện hoạt tính trong thử nghiệm trên tế bào HB (S1: vị trí 1, S2: vị trí 2, dấu # thể hiện sự xếp hạng trong kết quả sàng lọc ảo)

4.5.6. Triển vọng “tái mục đích” điều trị các bệnh lý liên quan đến con đường IL-33/ST2 của các hoạt chất hóa dược

Hen suyễn là một hội chứng có nhiều kiểu hình khác nhau. Các nghiên cứu di truyền học có thể xác định nguyên nhân và con đường sinh học liên quan đến một kiểu hình nhất định – trong đó có trục IL-33/ST2.²⁵⁵ Trong một số dạng hen suyễn, con đường IL-33/ST2 thúc đẩy sự thoát hạt và khả năng sống còn của tế bào mast và bạch cầu ưa acid.²⁵⁶⁻²⁵⁹ Mặt khác, các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra IL-33 kích hoạt và mở rộng các tế bào ILC2. Từ đó, trục IL-33/ST2/ILC2 được cho là một trong những con đường trung tâm trong quá trình sinh bệnh của tình trạng viêm dị ứng.²⁶⁰ Những hiểu biết hiện tại ủng hộ cho chiến lược nhắm mục tiêu IL-33/ST2 trong điều

trị những kiểu hình hen phế quản xác định, trong đó bệnh nhân được phân tầng dựa trên cơ chế bệnh sinh, phản ánh tính cá thể hóa của y học chính xác.²⁵⁵

Loratadin và rupatadin là các thuốc kháng histamin H₁ thế hệ 2 được sử dụng trong điều trị dị ứng. Montelukast là thuốc đối kháng thụ thể leucotrien. Các cơ chế này đều có liên quan đến hen suyễn – bệnh lý mà trục IL-33/ST2 có tham gia vào cơ chế bệnh sinh. Bệnh nhân hen phế quản theo mùa có phản ứng dị ứng tức thì do giải phóng các chất trung gian từ tế bào mast qua IgE khi tiếp xúc với dị nguyên, gây ra co thắt phế quản. Các thuốc kháng histamin H₁ cổ điển chỉ thể hiện tác dụng vừa phải và ngắn hạn với tình trạng này. Ngược lại, loratadin đã được chứng minh khả năng kiểm soát các triệu chứng của hen suyễn với thời gian tác dụng dài và làm tăng đáng kể chức năng phổi.²⁶¹ Rupatadin cũng được báo cáo tác động có lợi đối với các thay đổi mô học trên mô hình hen suyễn mạn tính ở chuột.²⁶² Đáng chú ý, sự kết hợp loratadin 20 mg và montelukast 10 mg giúp cải thiện các triệu chứng của hen suyễn, tăng lưu lượng khí thở ra và giảm nhu cầu sử dụng thuốc chủ vận β_2 so với montelukast đơn độc.²⁶³ Mặt khác, nghiên cứu của Maeba và cộng sự đã chứng minh khả năng ức chế sự kích hoạt của NF- κ B ở tế bào THP-1. Ở nồng độ 10^{-5} M, montelukast ức chế sự sản xuất IL-6, TNF- α và chemokin MCP-1.²⁶⁴ Các phát hiện này phù hợp với lộ trình tín hiệu xuôi dòng của trục IL-33/ST2 (**Hình 1.2B**), ủng hộ tác động ức chế của montelukast với con đường này.

Những nghiên cứu kể trên và hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 của 3 hoạt chất hóa được được xác định trong đề tài này gợi ý tiềm năng mở rộng chỉ định của các thuốc đối với hen phế quản và các bệnh lý viêm. Kết quả *in silico* cho thấy chúng gắn kết trên IL-33 (K_i HYDE từ 33 nM đến 8,4 μ M), nhưng các nghiên cứu sâu hơn cần được thực hiện để khẳng định cơ chế này. Cụ thể, thử nghiệm đánh giá gắn kết với IL-33 cần được thực hiện cho loratadin và rupatadin (tương tự montelukast). Hơn nữa, các thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế PPI *in vitro* và bất hoạt tín hiệu IL-33/ST2 *in vivo* cũng cần được thực hiện. Nếu được chứng minh, tác động ức chế IL-33 có thể được bổ sung vào cơ chế tác động của thuốc và đặt ra hướng “tái định vị” các thuốc này trên lâm sàng. Như nhận xét của Nelson, các thuốc kháng histamin thế hệ 2 có thể có vai trò trong điều trị hen suyễn nhẹ và trung bình nhưng ở liều cao hơn liều thường dùng để điều trị viêm mũi dị ứng.²⁶⁵ Cơ chế tác động của các thuốc có thể là đối kháng IL-33 và ức chế tương tác IL-33/ST2L, nhưng phải ở một liều lượng phù hợp. Đồng thời, dẫn xuất của các hoạt chất này có thể được tổng hợp với sự định hướng của các công cụ *in silico* và đánh giá hoạt tính *in vitro*, mở ra cơ hội phát triển các hợp chất mới có khả năng gắn kết ái lực cao và tác động chọn lọc nhằm điều trị các bệnh lý liên quan IL-33.

NHỮNG ĐIỂM MỚI CỦA ĐỀ TÀI

Nghiên cứu thuốc hóa dược tác động trên IL-33 và thụ thể ST2 vẫn còn mới mẻ và đang đạt được những tiến bộ ban đầu. Tham gia vào lĩnh vực này, đề tài có những đóng góp mới về mặt khoa học, bao gồm:

1. Lập hồ sơ acid amin điểm nóng trên hai bề mặt tương tác protein-protein giữa IL-33 và ST2 bằng mô phỏng MD, tính toán phân rã năng lượng tự do và quét đột biến alanin.
2. Lần đầu tiên xác thực các vị trí liên kết phù hợp cho phối tử phân tử nhỏ trên IL-33 và thụ thể ST2. Trên IL-33, vị trí 2 của giao diện PPI phù hợp để phát triển thuốc phân tử nhỏ. Đồng thời, tại vị trí này, một túi ẩn có thể được hình thành để gắn kết đặc hiệu với phối tử nhờ sự chuyển động của chuỗi bên của các acid amin, chủ yếu là Leu267. Trên ST2, vị trí 1 của giao diện PPI là khoang gắn kết khả dĩ, nhưng một vị trí allosteric ở lân cận có thể cung cấp một túi liên kết ái lực cao với phối tử phân tử nhỏ.
3. Xây dựng được một bộ cơ sở dữ liệu hóa học định hướng PPI sẵn sàng cho các dự án sàng lọc ảo, bao gồm tệp chứa cấu trúc được tối thiểu hóa năng lượng dùng cho mô phỏng gắn kết và tệp chứa tập hợp cấu dạng 3D chất lượng cao dùng cho sàng lọc qua mô hình pharmacophore và truy vấn tương đồng hình dạng phân tử 3 chiều.
4. Xây dựng một hệ thống các mô hình pharmacophore cho các vị trí gắn kết trên cả IL-33 và ST2, giúp sàng lọc nhanh chóng qua các thư viện hóa học lớn. Đồng thời, các mô hình mô phỏng gắn kết phân tử cho IL-33 và ST2 cũng được xây dựng và đánh giá. Từ đó, quy trình sàng lọc ảo dạng phễu dựa trên thời gian tính toán được áp dụng, theo thứ tự gồm mô hình pharmacophore, mô phỏng gắn kết phân tử, lập hồ sơ ADMET, mô phỏng động lực học phân tử và tính toán năng lượng tự do gắn kết. Từ đó, các hợp chất gắn kết *in silico* ái lực cao với các protein mục tiêu được xác định.
5. Lần đầu tiên báo cáo các mô hình *in silico* dựa trên phối tử dự đoán hoạt tính ức chế IL-33/ST2, gồm truy vấn ROCS, mô hình LB-PH4 và QSAR. Các mô hình đã giúp dự đoán được một số hợp chất có hoạt tính *in vitro*.
6. Thiết lập quy trình thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33 và thử nghiệm đánh giá gắn kết với IL-33 dựa trên quang phổ huỳnh quang trong điều kiện Việt Nam. Từ đó, các hợp chất mới và có hoạt tính đã được xác định.

KẾT LUẬN

Tương tác protein–protein giữa IL-33 và ST2 đóng vai trò quan trọng trong các bệnh viêm và tự miễn. Việc tìm kiếm các liệu pháp điều trị cho những mục tiêu này là cần thiết, đặc biệt là các chất ức chế có cấu trúc phân tử nhỏ. Đề tài đã áp dụng hai cách tiếp cận cơ bản trong thiết kế thuốc để xây dựng các mô hình dự đoán chất ức chế IL-33/ST2, gồm phương pháp dựa trên cấu trúc mục tiêu và dựa trên phối tử. Đồng thời, quy trình thử nghiệm *in vitro* đánh giá khả năng gắn kết và tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 đã được thiết lập. Bằng những phương pháp này, đề tài đã đạt được mục tiêu nghiên cứu đề ra, sàng lọc được một số hợp chất tiềm năng có khả năng ức chế tương tác giữa IL-33 và thụ thể ST2 *in silico* và *in vitro*. Cụ thể, 5 nội dung nghiên cứu sau đây đã được hoàn thành:

1. Xây dựng bộ cơ sở dữ liệu hóa học định hướng cho nghiên cứu chất ức chế PPI chứa 2,615,938 hợp chất với 224,649,000 cấu dạng và có thể được áp dụng cho các nghiên cứu trên những mục tiêu tác động mới.
2. Lập hồ sơ điểm nóng cho tương tác protein-protein giữa IL-33 và ST2 bằng các phương pháp mô phỏng hệ phân tử sinh học, chứng minh và bổ sung cho các nghiên cứu thực nghiệm trước đây, đồng thời tạo tiền đề cho các nghiên cứu *in silico* trong đề tài hiện tại và các nghiên cứu nối tiếp trong tương lai. Bên cạnh đó, các vị trí gắn kết tiềm năng cho phối tử phân tử nhỏ trên IL-33 và ST2 đã được khảo sát toàn diện và xếp hạng. Trong đó, một vị trí allosteric mới lần đầu tiên được báo cáo và chứng minh bằng các phương pháp mô phỏng lý thuyết. Trong khuôn khổ của đề tài, một số vị trí gắn kết được tập trung nghiên cứu. Những vị trí còn lại là đối tượng tiềm năng cho những nghiên cứu tiếp theo, đặc biệt là các túi ẩn và vị trí allosteric để phát triển chất ức chế chọn lọc cho IL-33/ST2.
3. Xây dựng các mô hình *in silico* dựa trên cấu trúc mục tiêu: hai mô hình pharmacophore PH4-IL33-S1-M1, PH4-IL33-S1-M2 cho IL-33 tại vị trí 1; hai mô hình pharmacophore PH4-ST2-S1-M1, PH4-ST2-S1-M2 cho thụ thể ST2 tại vị trí 1; hai mô hình PH4-IL33-S2-M1, PH4-IL33-S2-M2 cho IL-33 tại vị trí 2. Các mô hình được sử dụng để sàng lọc qua các cơ sở dữ liệu hóa học lớn. Từ đó, các hợp chất được tiếp tục được sàng lọc bằng mô hình gắn kết phân tử và mô phỏng động lực học phân tử để xác định các hợp chất tiềm năng nhất. Các hợp chất này đều được lập hồ sơ dược động học và độc tính bằng các công cụ dự đoán. Trên vị trí 1 của IL-33, các hợp chất gắn kết tiềm năng là những dẫn chất folat như DB00158 và DB00642. Trên vị trí 1 của thụ thể ST2, các hợp chất gắn kết tiềm năng bao gồm ZINC08911140,

ZINC16933127, ZINC40658091 và ZINC59514725. Tại vị trí 2 của IL-33, các hợp chất tiềm năng gồm Enamine Z8479543772, Enamine Z5129920608, Enamine Z19188025, ZINC12152030, ZINC09831173, ChemDiv G725-1491 và Enamine Z1256575314.

4. Xây dựng các mô hình *in silico* dựa trên phối tử: mô hình tương đồng hình dạng phân tử 3 chiều ROCS-iIL33-6 cho IL-33 tại vị trí 2, mô hình pharmacophore PH4-LB-iST2 và mô hình 2D-QSAR cho chất ức chế ST2. Qua quá trình sàng lọc ảo từ truy vấn ROCS, các chất Asinex BAS-01389088, Asinex BAS-03072524, Enamine Z1832708609 và Asinex ASN-04481572 được xác định là những hợp chất gắn kết tiềm năng với IL-33 tại vị trí 2 với $\Delta G_{\text{gắn kết MM-GBSA}}$ dưới -30 kcal/mol.
5. Ứng dụng các mô hình sàng lọc *in silico* trên thư viện hợp chất nội bộ được thu thập từ Bộ môn Hóa Dược, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, xác định được các hợp chất có tác động ức chế tương tác giữa IL-33 và ST2 thông qua thử nghiệm *in vitro*. Trong đó, các hợp chất T296, T651, T713, T718, T721, T814, T815 và T821 có IC_{50} lần lượt là 80,11; 31,61; 23,85; 61,16; 55,91; 50,26; 48,35 và 46,54 μM . Hợp chất T821 được chứng minh khả năng gắn kết trên IL-33 với hằng số phân ly là $1,7 \times 10^{-3}$ M.

KIẾN NGHỊ

Từ những kết quả đạt được của đề tài, một số kiến nghị sau đây được đề xuất để tiếp tục phát triển hướng nghiên cứu tìm kiếm chất ức chế phân tử nhỏ trên IL-33 và thụ thể ST2:

- Dữ liệu từ các quỹ đạo mô phỏng MD đã được thực hiện trong đề tài này có thể sử dụng để xây dựng các mô hình pharmacophore “động” (dynamic pharmacophore) nhằm nâng cao năng lực sàng lọc cho mô hình. Đồng thời, cấu dạng IL-33 và ST2 trong các mô phỏng MD còn có thể được phân cụm, lấy mẫu và ứng dụng vào phương pháp gắn kết tập hợp (ensemble docking) để cải thiện hệ số làm giàu của mô hình.
- Sử dụng những túi gắn kết còn lại trên các protein đã được xác định trong đề tài để tìm kiếm các chất ức chế mới cho IL-33/ST2.
- Mặc dù phương pháp pharmacophore giúp sàng lọc nhanh chóng qua các thư viện hóa học để tìm kiếm các phân tử có đặc tính phù hợp với mục tiêu tác động, một lượng lớn các hợp chất tiềm năng vẫn có thể bị bỏ sót. Hiện nay, với sự phát triển của phần cứng máy tính và các cơ sở dữ liệu hóa học lớn, mô phỏng gắn kết quy mô lớn (large-scale docking) trên IL-33/ST2 là một hướng nghiên cứu tiềm năng. Trong phương pháp này, tất cả các hợp chất trong thư viện hóa học có thể được lấy mẫu cấu dạng gắn kết với protein và tính điểm. Do đó, tỉ lệ tìm kiếm thành công các chất gắn kết ái lực cao với IL-33/ST2 có thể được gia tăng.
- Đánh giá hoạt tính ức chế tương tác IL-33/ST2 cho các hợp chất “hit” từ các thư viện hóa học thương mại đã được sàng lọc *in silico* trong đề tài.
- Đối với các hợp chất từ thư viện nội bộ đã được xác định hoạt tính ức chế trong thử nghiệm trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33, thử nghiệm đánh giá khả năng gắn kết trên protein cần được thực hiện nhằm mục đích khẳng định.
- Các hoạt chất hóa được gồm loratadin, rupatadin và montelukast cần được nghiên cứu thêm về tác động ức chế con đường IL-33/ST2, bao gồm thử nghiệm đánh giá tác động ức chế PPI *in vitro* và bất hoạt tín hiệu IL-33/ST2 *in vivo*.
- Thiết kế và tổng hợp các dẫn chất của quercetin, benzo[5,6]cyclohepta[1,2-*b*]pyridin và morpholinoalkoxychalcon với sự định hướng của các mô hình *in silico* và đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2 *in vitro*.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN

Bài báo được công bố trên tạp chí quốc tế thuộc danh mục WoS (SCIE):

1. Tan Thanh Mai, Thua-Phong Lam, Long-Hung Dinh Pham, Kim-Hung Nguyen, Quoc-Thai Nguyen, Minh-Tri Le, and Khac-Minh Thai. Toward Unveiling Putative Binding Sites of Interleukin-33: Insights from Mixed-Solvent Molecular Dynamics Simulations of the Interleukin-1 Family. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2024; 128:8362-375. doi:10.1021/acs.jpcb.4c03057.
2. Tan Thanh Mai, Phuc Gia Nguyen, Minh-Tri Le, Thanh-Dao Tran, Phuong Nguyen Hoai Huynh, Dieu-Thuong Thi Trinh, Quoc-Thai Nguyen, and Khac-Minh Thai. Discovery of small molecular inhibitors for interleukin-33/ST2 protein–protein interaction: a virtual screening, molecular dynamics simulations and binding free energy calculations. *Molecular Diversity*. 2022; 26(5):2659-2678. doi:10.1007/s11030-021-10359-4.
3. Minh-Tri Le, Tan Thanh Mai, Phuong Nguyen Hoai Huynh, Thanh-Dao Tran, Khac-Minh Thai, and Quoc-Thai Nguyen. Structure-based discovery of interleukin-33 inhibitors: a pharmacophore modelling, molecular docking, and molecular dynamics simulation approach. *SAR and QSAR in Environmental Research*. 2020; 31(12):883-904. doi:10.1080/1062936x.2020.1837239.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A critical review of its biology and the mechanisms involved in its release as a potent extracellular cytokine. *Cytokine*. 2022;156:155891. doi:10.1016/j.cyto.2022.155891
2. Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and airway inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011;3(2):81-88. doi:10.4168/aaair.2011.3.2.81
3. Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, et al. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(3):738-749. doi:10.1002/art.24305
4. Beltran CJ, Nunez LE, Diaz-Jimenez D, et al. Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(7):1097-107. doi:10.1002/ibd.21175
5. Pei C, Barbour M, Fairlie-Clarke KJ, et al. Emerging role of interleukin-33 in autoimmune diseases. *Immunology*. 2014;141(1):9-17. doi:10.1111/imm.12174
6. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm*. 2011;8(1):22-34. doi:10.1186/1476-9255-8-22
7. Xiong Z, Thangavel R, Kempuraj D, et al. Alzheimer's disease: evidence for the expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in the brain. *J Alzheimers Dis*. 2014;40(2):297-308. doi:10.3233/JAD-132081
8. Du LX, Wang YQ, Hua GQ, Mi WL. IL-33/ST2 Pathway as a Rational Therapeutic Target for CNS Diseases. *Neuroscience*. 2018;369:222-230. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.11.028
9. Paczesny S. Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. *Blood*. 2013;121(4):585-594. doi:10.1182/blood-2012-08-355990
10. Weinberg EO, Shimpo M, De Keulenaer GW, et al. Expression and Regulation of ST2, an Interleukin-1 Receptor Family Member, in Cardiomyocytes and Myocardial Infarction. *Circulation*. 2002;106(23):2961-2966. doi:10.1161/01.cir.0000038705.69871.d9
11. Villacorta H, Maisel AS. Soluble ST2 Testing: A Promising Biomarker in the Management of Heart Failure. *Arq Bras Cardiol*. 2016;106(2):145-152. doi:10.5935/abc.20150151
12. Iwaszko M, Wielńska J, Świerkot J, et al. IL-33 Gene Polymorphisms as Potential Biomarkers of Disease Susceptibility and Response to TNF Inhibitors in Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Psoriatic Arthritis Patients. *Front Immunol*. 2021;12doi:10.3389/fimmu.2021.631603
13. Vos T, Lim SS, Abbafati C, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2020;396(10258):1204-1222. doi:10.1016/S0140-6736(20)30925-9
14. Jingru T, Dingyao Z, Xu Y, Yaqing H, Qianjin L. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comprehensive systematic analysis and modelling study. *Ann Rheum Dis*. 2023;82(3):351. doi:10.1136/ard-2022-223035

15. Okragly AJ, Corwin KB, Elia M, et al. Generation and Characterization of Torudokimab (LY3375880): A Monoclonal Antibody That Neutralizes Interleukin-33. *J Inflamm Res*. 2021;14:3823-3835. doi:10.2147/jir.S320287
16. Wechsler ME, Ruddy MK, Pavord ID, et al. Efficacy and Safety of Itepekimab in Patients with Moderate-to-Severe Asthma. *N Engl J Med*. 2021;385(18):1656-1668. doi:10.1056/NEJMoa2024257
17. England E, Rees DG, Scott IC, et al. Tozorakimab (MEDI3506): an anti-IL-33 antibody that inhibits IL-33 signalling via ST2 and RAGE/EGFR to reduce inflammation and epithelial dysfunction. *Sci Rep*. 2023;13(1):9825. doi:10.1038/s41598-023-36642-y
18. Yousuf AJ, Mohammed S, Carr L, et al. Astegolimab, an anti-ST2, in chronic obstructive pulmonary disease (COPD-ST2OP): a phase 2a, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2022;10(5):469-477. doi:10.1016/S2213-2600(21)00556-7
19. Pefani E, Stone S, Zhu C-Q, Nunn C, Fairman D. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of a single ascending subcutaneous dose of GSK3772847 in healthy participants. *Pharmacol Res Perspect*. 2023;11(2):e01054. doi:10.1002/prp2.1054
20. Kim YK, Cho SH, Mushtaq AU, et al. Discovery of an interleukin 33 inhibitor by molecular docking simulation and NMR Analysis. *Bull Korean Chem Soc*. 2016;37(2):117-118. doi:10.1002/bkcs.10637
21. Kim Y, Ma C, Park S, et al. Rational Design, Synthesis and Evaluation of Oxazolo[4,5-c]-quinolinone Analogs as Novel Interleukin-33 Inhibitors. *Chem Asian J*. 2021;16(22):3702-3712. doi:10.1002/asia.202100896
22. Ramadan AM, Daguindau E, Rech JC, et al. From proteomics to discovery of first-in-class ST2 inhibitors active in vivo. *JCI Insight*. 2018;3(14)doi:10.1172/jci.insight.99208
23. Yuan X, Jiang H, Fu D, et al. Structure-Activity relationship of 1-(Furan-2-ylmethyl)Pyrrolidine-Based Stimulation-2 (ST2) inhibitors for treating graft versus host disease. *Bioorg Med Chem*. 2022;71:116942. doi:10.1016/j.bmc.2022.116942
24. Yuan X, Jiang H, Fu D, et al. Prophylactic Mitigation of Acute Graft versus Host Disease by Novel 2-(Pyrrolidin-1-ylmethyl)pyrrole-Based Stimulation-2 (ST2) Inhibitors. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2023;doi:10.1021/acsptsci.3c00122
25. Adamu RM, Singh RM, Ibrahim MA, Uba AI. Virtual discovery of a heterocyclic compound from the Universal Natural Product Database (UNPD36) as a potential inhibitor of interleukin-33: molecular docking and dynamic simulations. *J Biomol Struct Dyn*. 2021:1-10. doi:10.1080/07391102.2021.1915180
26. Vinh LB, Han YK, Park SY, et al. Identification of triterpenoid saponin inhibitors of interleukin (IL)-33 signaling from the roots of *Astragalus membranaceus*. *J Funct Foods*. 2023;101:105418. doi:10.1016/j.jff.2023.105418

27. Hegazi AG, Abdel-Rahman EH. Cytokines. Khan WA *Innovative Immunology*. Austin Publishing Group; 2015:2-29.
28. Shing KSCT, Kan WL, Nero TL, et al. Cytokine Receptors and Their Ligands. Bradshaw RA, Hart GW, Stahl PD *Encyclopedia of Cell Biology (Second Edition)*. Academic Press; 2023:21-45.
29. Sivangala R, Sumanlatha G. Cytokines that Mediate and Regulate Immune Responses. Khan WA *Innovative Immunology*. Austin Publishing Group; 2015:2-22.
30. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e
31. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007;37(S1):S34-S45. doi:10.1002/eji.200737772
32. Akdis M, Burgler S, Cramer R, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):701-721. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.050
33. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018;281(1):8-27. doi:10.1111/imr.12621
34. Garlanda C, Dinarello Charles A, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*. 2013;39(6):1003-1018. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010
35. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol*. 2016;17(2):122-131. doi:10.1038/ni.3370
36. Boraschi D. What Is IL-1 for? The Functions of Interleukin-1 Across Evolution. *Front Immunol*. 2022;13:872155. doi:10.3389/fimmu.2022.872155
37. Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen*. 2019;39(1):12. doi:10.1186/s41232-019-0101-5
38. Baekkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol*. 2003;163(1):69-79. doi:10.1016/S0002-9440(10)63631-0
39. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23(5):479-490. doi:10.1016/j.immuni.2005.09.015
40. Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, et al. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(2):277-281. doi:10.1164/ajrccm.164.2.2008120
41. Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, et al. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol*. 2007;179(4):2551-5. doi:10.4049/jimmunol.179.4.2551
42. Iikura M, Suto H, Kajiwar N, et al. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest*. 2007;87(10):971-978. doi:10.1038/labinvest.3700663

43. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *J Immunity*. 2005;23(5):479-490. doi:10.1016/j.immuni.2005.09.015
44. Liew FY, Girard J-P, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(11):676-689. doi:10.1038/nri.2016.95
45. Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A–H2B acidic pocket. *EMBO reports*. 2008;9(10):1006-1012. doi:10.1038/embor.2008.145
46. Lingel A, Weiss TM, Niebuhr M, et al. The structure of interleukin-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors – insight into the arrangement of heterotrimeric interleukin-1 signaling complexes. *Structure*. 2009;17(10):1398-1410. doi:10.1016/j.str.2009.08.009
47. Liu X, Hammel M, He Y, et al. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(37):14918-23. doi:10.1073/pnas.1308651110
48. Carriere V, Roussel L, Ortega N, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(1):282-287. doi:10.1073/pnas.0606854104
49. Bessa J, Meyer CA, de Vera Mudry MC, et al. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun*. 2014;55:33-41. doi:10.1016/j.jaut.2014.02.012
50. Martin SJ, Luthi AU, Cullen SP, et al. Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases. *Immunity*. 2009;31:84-98.
51. Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, et al. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8⁺ T cell responses. *Science*. 2012;335(6071):984-989. doi:10.1126/science.1215418
52. Lefrançois E, Roga S, Gautier V, et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(5):1673-1678. doi:10.1073/pnas.1115884109
53. Gadani SP, Walsh JT, Smirnov I, Zheng J, Kipnis J. The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. *Neuron*. 2015;85(4):703-709. doi:10.1016/j.neuron.2015.01.013
54. Dinarello CA. An IL-1 Family Member Requires Caspase-1 Processing and Signals through the ST2 Receptor. *Immunity*. 2005;23(5):461-462. doi:10.1016/j.immuni.2005.10.004
55. Cayrol C, Girard J-P. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(22):9021-9026. doi:10.1073/pnas.0812690106
56. Lefrançois E, Duval A, Mirey E, et al. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(43):15502-15507. doi:10.1073/pnas.1410700111

57. Vasanthakumar A, Kallies A. Interleukin (IL)-33 and the IL-1 Family of Cytokines-Regulators of Inflammation and Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019;11(3):a028506. doi:10.1101/cshperspect.a028506
58. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):103-110. doi:10.1038/nri2692
59. Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS letters.* 1989;258(2):301-4. doi:10.1016/0014-5793(89)81679-5
60. Yanagisawa K, Tsukamoto T, Takagi T, Tominaga S-i. Murine ST2 gene is a member of the primary response gene family induced by growth factors. *FEBS Lett.* 1992;302(1):51-53. doi:10.1016/0014-5793(92)80282-L
61. Kumar S, Minnich MD, Young PR. ST2/T1 protein functionally binds to two secreted proteins from Balb/c 3T3 and human umbilical vein endothelial cells but does not bind interleukin 1. *J Biol Chem.* 1995;270(46):27905-13. doi:10.1074/jbc.270.46.27905
62. Kumar S, Tzimas MN, Griswold DE, Young PR. Expression of ST2, an Interleukin-1 Receptor Homologue, Is Induced by Proinflammatory Stimuli. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235(3):474-478. doi:10.1006/bbrc.1997.6810
63. Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(12):6930-5. doi:10.1073/pnas.95.12.6930
64. Kuroiwa K, Li H, Tago K, et al. Construction of ELISA System to Quantify Human ST2 Protein in Sera of Patients. *Hybridoma.* 2000;19(2):151-159. doi:10.1089/02724570050031194
65. Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, Minota S, Tominaga S-i. Identification of Human ST2 Protein in the Sera of Patients with Autoimmune Diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;284(5):1104-1108. doi:10.1006/bbrc.2001.5090
66. Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, et al. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(2):277-81. doi:10.1164/ajrccm.164.2.2008120
67. Weinberg EO, Shimpo M, Hurwitz S, et al. Identification of Serum Soluble ST2 Receptor as a Novel Heart Failure Biomarker. *Circulation.* 2003;107(5):721-726. doi:10.1161/01.CIR.0000047274.66749.FE
68. Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, Tominaga S-i. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett.* 1993;318(1):83-87. doi:10.1016/0014-5793(93)81333-U
69. Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the

- IL-1 receptor. *EMBO J*. 1994;13(5):1176-1188-1188. doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06367.x
70. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(10):827-840. doi:10.1038/nrd2660
 71. Larsen KM, Minaya MK, Vaish V, Peña MMO. The Role of IL-33/ST2 Pathway in Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9)doi:10.3390/ijms19092676
 72. Pascual-Figal DA, Januzzi JL. The Biology of ST2: The International ST2 Consensus Panel. *Am J Cardiol*. 2015;115(7):3B-7B. doi:10.1016/j.amjcard.2015.01.034
 73. Zhang J, Chen Z, Ma M, He Y. Soluble ST2 in coronary artery disease: Clinical biomarkers and treatment guidance. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9doi:10.3389/fcvm.2022.924461
 74. Wang J, He M, Li H, et al. Soluble ST2 Is a Sensitive and Specific Biomarker for Fulminant Myocarditis. *J Am Heart Assoc*. 2022;11(7):e024417. doi:10.1161/JAHA.121.024417
 75. Paczesny S. Post-haematopoietic cell transplantation outcomes: why ST2 became a ‘golden nugget’ biomarker. *Br J Haematol*. 2021;192(6):951-967. doi:10.1111/bjh.16497
 76. Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev*. 2018;281(1):154-168. doi:10.1111/imr.12619
 77. Wu F-X, Yang J-F, Mei L-C, et al. PIIMS Server: A Web Server for Mutation Hotspot Scanning at the Protein–Protein Interface. *J Chem Inf Model*. 2021;61(1):14-20. doi:10.1021/acs.jcim.0c00966
 78. Préfontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, et al. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol*. 2009;183(8):5094-103. doi:10.4049/jimmunol.0802387
 79. Bunting MM, Herbert C. Immunoreactivity for Interleukin-33 in Allergic Airway Inflammation. *J Cytol Histol*. 2015;6(1):1-4. doi:10.4172/2157-7099.1000302
 80. Xia J, Zhao J, Shang J, et al. Increased IL-33 expression in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(7):L619-L627. doi:10.1152/ajplung.00305.2014
 81. Gabryelska A, Kuna P, Antczak A, Białasiewicz P, Panek M. IL-33 Mediated Inflammation in Chronic Respiratory Diseases—Understanding the Role of the Member of IL-1 Superfamily. *Front Immunol*. 2019;10
 82. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res*. 2012;52(1-2):89-99. doi:10.1007/s12026-012-8283-9
 83. Ding W, Zou G-L, Zhang W, et al. Interleukin-33: Its Emerging Role in Allergic Diseases. *Molecules*. 2018;23(7):1665. doi:10.3390/molecules23071665
 84. Saluja R, Khan M, Church MK, Maurer M. The role of IL-33 and mast cells in allergy and inflammation. *Clin Transl Allergy*. 2015;5(1):33. doi:10.1186/s13601-015-0076-5
 85. Imai Y. Interleukin-33 in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 2019;96(1):2-7. doi:10.1016/j.jdermsci.2019.08.006

86. Latiano A, Palmieri O, Pastorelli L, et al. Associations between genetic polymorphisms in IL-33, IL1R1 and risk for inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2013;8(4):e62144. doi:10.1371/journal.pone.0062144
87. Sedhom MAK, Pichery M, Murdoch JR, et al. Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. *Gut*. 2013;62(12):1714. doi:10.1136/gutjnl-2011-301785
88. Xu D, Jiang H-R, Kewin P, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(31):10913-10918. doi:10.1073/pnas.0801898105
89. Matsuyama Y, Okazaki H, Tamemoto H, et al. Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2010;37(1):18-25. doi:10.3899/jrheum.090492
90. Xiangyang Z, Lutian Y, Lin Z, et al. Increased levels of interleukin-33 associated with bone erosion and interstitial lung diseases in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2012;58(1):6-9. doi:10.1016/j.cyto.2011.12.010
91. Shakerian L, Kolahdooz H, Garousi M, et al. IL-33/ST2 axis in autoimmune disease. *Cytokine*. 2022;158:156015. doi:10.1016/j.cyto.2022.156015
92. Mok MY, Huang FP, Ip WK, et al. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2010;49(3):520-527. doi:10.1093/rheumatology/kep402
93. Yang Z, Liang Y, Xi W, Li C, Zhong R. Association of increased serum IL-33 levels with clinical and laboratory characteristics of systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Clin Exp Med*. 2011;11(2):75-80. doi:10.1007/s10238-010-0115-4
94. Li P, Lin W, Zheng X. IL-33 Neutralization Suppresses Lupus Disease in Lupus-Prone Mice. *Inflammation*. 2014;37(3):824-832. doi:10.1007/s10753-013-9802-0
95. Moreau A, Nicaise C, Awada A, Soyfoo MS. Soluble ST2 is increased in systemic lupus erythematosus and is a potential marker of lupus nephritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2022;40(5):897-903. doi:10.55563/clinexprheumatol/eg3a2k
96. Abd-Elazeem RI, Abdelnabi HH, Hegab DS, Mohamed WS, Ameen TE. Serum interleukin-33 (IL-33) in children with active systemic lupus erythematosus: A cross-sectional study. *Egypt J Immunol*. 2022;29(4):148-155.
97. Christophi GP, Gruber RC, Panos M, et al. Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. *Clin Immunol*. 2012;142(3):308-319. doi:10.1016/j.clim.2011.11.007
98. Manetti M, Ibba-Manneschi L, Liakouli V, et al. The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(3):598-605. doi:10.1136/ard.2009.119321
99. Mirko M, Serena G, Claudia C, et al. Increased circulating levels of interleukin 33 in systemic sclerosis correlate with early disease stage and microvascular involvement. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(10):1876. doi:10.1136/ard.2010.148247

100. Yanaba K, Yoshizaki A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *Clin Rheumatol*. 2011;30(6):825-830. doi:10.1007/s10067-011-1686-5
101. Wagner A, Köhm M, Nordin A, et al. Increased Serum Levels of the IL-33 Neutralizing sST2 in Limited Cutaneous Systemic Sclerosis. *Scand J Immunol*. 2015;82(3):269-274. doi:10.1111/sji.12317
102. Ferrara J, Prado-Acosta M. Graft-versus-host disease: establishing IL-33 as an important costimulatory molecule. *J Clin Invest*. 2022;132(12):e160692. doi:10.1172/JCI160692
103. Reichenbach DK, Schwarze V, Matta BM, et al. The IL-33/ST2 axis augments effector T-cell responses during acute GVHD. *Blood*. 2015;125(20):3183-3192. doi:10.1182/blood-2014-10-606830
104. Zhang J, Ramadan AM, Griesenauer B, et al. ST2 blockade reduces sST2-producing T cells while maintaining protective mST2-expressing T cells during graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 2015;7(308):308ra160. doi:10.1126/scitranslmed.aab0166
105. Ghali R, Altara R, Louch WE, et al. IL-33 (Interleukin 33)/sST2 Axis in Hypertension and Heart Failure. *Hypertension*. 2018;72(4):818-828. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11157
106. Liu R, Liu L, Wei C, Li D. IL-33/ST2 immunobiology in coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9doi:10.3389/fcvm.2022.990007
107. Jiang C, Jin X, Li C, et al. Roles of IL-33 in the Pathogenesis of Cardiac Disorders. *Exp Biol Med*. 2023;248(22):2167-2174. doi:10.1177/15353702231198075
108. Wermuth CG, Ganellin CR, Lindberg P, Mitscher LA. Glossary of Terms used in Medicinal Chemistry (IUPAC recommendations 1998). *Pure Appl Chem*. 1998;70:1129-1143.
109. Qing X-Y, Lee XY, De Raeymaecker J, et al. Pharmacophore modeling: Advances, Limitations, And current utility in drug discovery. *J Receptor Ligand Channel Res*. 2014;7:81-92. doi:10.2147/JRLCR.S46843
110. Yang SY. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discov Today*. 2010;15(11-12):444-450. doi:10.1016/j.drudis.2010.03.013
111. Güner OF, Bowen JP. Setting the Record Straight: The Origin of the Pharmacophore Concept. *J Chem Inf Model*. 2014;54(5):1269-1283. doi:10.1021/ci5000533
112. Cox PB, Gupta R. Contemporary Computational Applications and Tools in Drug Discovery. *ACS Med Chem Lett*. 2022;13(7):1016-1029. doi:10.1021/acsmchemlett.1c00662
113. Schaller D, Šribar D, Noonan T, et al. Next generation 3D pharmacophore modeling. *Wires Comput Mol Sci*. 2020;10(4):e1468. doi:10.1002/wcms.1468

114. Seidel T, Ibis G, Bendix F, Wolber G. Strategies for 3D pharmacophore-based virtual screening. *Drug Discov Today Technol.* 2010;7(4):e221-e228. doi:10.1016/j.ddtec.2010.11.004
115. Réau M, Langenfeld F, Zagury J-F, Lagarde N, Montes M. Decoys Selection in Benchmarking Datasets: Overview and Perspectives. *Front Pharmacol.* 2018;9:11.
116. Manallack DT, Pitt WR, Gancia E, et al. Selecting Screening Candidates for Kinase and G Protein-Coupled Receptor Targets Using Neural Networks. *J Chem Inf Comput Sci.* 2002;42(5):1256-1262. doi:10.1021/ci020267c
117. Triballeau N, Acher F, Brabet I, Pin JP, Bertrand HO. Virtual screening workflow development guided by the "receiver operating characteristic" curve approach. Application to high-throughput docking on metabotropic glutamate receptor subtype 4. *J Med Chem.* 2005;48(7):2534-47. doi:10.1021/jm049092j
118. Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX. Assessing the Fit of the Model. *Applied Logistic Regression.* Wiley; 2013:153-225.
119. Empereur-mot C, Guillemain H, Latouche A, et al. Predictiveness curves in virtual screening. *J Cheminform.* 2015;7(1):52. doi:10.1186/s13321-015-0100-8
120. Feher M, Deretey E, Roy S. BHB: A Simple Knowledge-Based Scoring Function to Improve the Efficiency of Database Screening. *J Chem Inf Comput Sci.* 2003;43(4):1316-1327. doi:10.1021/ci030006i
121. Empereur-Mot C, Zagury J-F, Montes M. Screening Explorer—An Interactive Tool for the Analysis of Screening Results. *J Chem Inf Model.* 2016;56(12):2281-2286. doi:10.1021/acs.jcim.6b00283
122. Grant JA, Pickup BT. A Gaussian Description of Molecular Shape. *J Phys Chem.* 1995;99(11):3503-3510. doi:10.1021/j100011a016
123. Grant JA, Gallardo MA, Pickup BT. A fast method of molecular shape comparison: A simple application of a Gaussian description of molecular shape. *J Comput Chem.* 1996;17(14):1653-1666. doi:10.1002/(SICI)1096-987X(19961115)17:14<1653::AID-JCC7>3.0.CO;2-K
124. Kearnes S, Pande V. ROCS-derived features for virtual screening. *J Comput Aided Mol Des.* 2016;30(8):609-617. doi:10.1007/s10822-016-9959-3
125. Hawkins PCD, Skillman AG, Nicholls A. Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. *J Med Chem.* 2007;50(1):74-82. doi:10.1021/jm0603365
126. Roy K, Kar S, Das RN. *A Primer on QSAR/QSPR Modeling: Fundamental Concepts.* Springer International Publishing; 2015.
127. Roy K, Kar S, Das RN. *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment.* Academic Press; 2015.
128. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models.* OECD Publishing; 2014.
129. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular Docking - A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.* 2011;7(2):146-157. doi:10.2174/157340911795677602

130. Holyoak T. Molecular Recognition: Lock-and-Key, Induced Fit, and Conformational Selection. Roberts GCK *Encyclopedia of Biophysics*. Springer Berlin Heidelberg; 2013:1584-1588.
131. Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*. 2015;20(7):13384-13421. doi:10.3390/molecules200713384
132. Zheng L, Meng J, Jiang K, et al. Improving protein–ligand docking and screening accuracies by incorporating a scoring function correction term. *Brief Bioinform*. 2022;23(3)doi:10.1093/bib/bbac051
133. Shen C, Wang Z, Yao X, et al. Comprehensive assessment of nine docking programs on type II kinase inhibitors: prediction accuracy of sampling power, scoring power and screening power. *Brief Bioinform*. 2020;21(1):282-297. doi:10.1093/bib/bby103
134. Huang N, Shoichet BK, Irwin JJ. Benchmarking Sets for Molecular Docking. *J Med Chem*. 2006;49(23):6789-6801. doi:10.1021/jm0608356
135. Mysinger MM, Carchia M, Irwin JJ, Shoichet BK. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *J Med Chem*. 2012;55(14):6582-6594. doi:10.1021/jm300687e
136. Stein RM, Yang Y, Balius TE, et al. Property-Unmatched Decoys in Docking Benchmarks. *J Chem Inf Model*. 2021;61(2):699-714. doi:10.1021/acs.jcim.0c00598
137. Durrant JD, McCammon JA. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BioMed Central Biology*. 2011;9:71-80. doi:10.1186/1741-7007-9-71
138. Roccatano D. A Short Introduction to the Molecular Dynamics Simulation of Nanomaterials. Jackson MJ, Ahmed W *Micro and Nanomanufacturing Volume II*. Springer International Publishing; 2018:123-155.
139. Ali AS, Hassan IM, Islam A, Ahmad F. A Review of Methods Available to Estimate Solvent-Accessible Surface Areas of Soluble Proteins in the Folded and Unfolded States. *Curr Protein Pept Sci*. 2014;15(5):456-476. doi:10.2174/1389203715666140327114232
140. Åqvist J, Luzhkov VB, Brandsdal BO. Ligand Binding Affinities from MD Simulations. *Acc Chem Res*. 2002;35(6):358-365. doi:10.1021/ar010014p
141. Miller BR, McGee TD, Swails JM, et al. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J Chem Theory Comput*. 2012;8(9):3314-3321. doi:10.1021/ct300418h
142. Kar S, Leszczynski J. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. *Expert Opin Drug Discov*. 2020;15(12):1473-1487. doi:10.1080/17460441.2020.1798926
143. Dulsat J, López-Nieto B, Estrada-Tejedor R, Borrell JI. Evaluation of Free Online ADMET Tools for Academic or Small Biotech Environments. *Molecules*. 2023;28(2):776. doi:10.3390/molecules28020776
144. Osbourn M, Soares DC, Vacca F, et al. HpARI protein secreted by a Helminth parasite suppresses interleukin-33. *Immunity*. 2017;47(4):739-751.e5. doi:10.1016/j.immuni.2017.09.015

145. Murphy AJ, Papadopoulos NJ, Orengo J, inventors; IL-33 antagonists and uses thereof. International patent application WO2014/152195A1. 2014.
146. Maity S, Gundampati RK, Suresh Kumar TK. NMR Methods to Characterize Protein-Ligand Interactions. *Nat Prod Commun.* 2019;14(5):1934578X19849296. doi:10.1177/1934578X19849296
147. Zazeri G, Povinelli APR, de Freitas Lima M, Cornélio ML. The Cytokine IL-1 β and Piperine Complex Surveyed by Experimental and Computational Molecular Biophysics. *Biomolecules.* 2020;10(9):1337.
148. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edition. Springer; 2006.
149. Hassan SAE-M, Ahmed SAE-F, Helmy AH, Youssef NF. Spectrofluorimetric study on fluorescence quenching of tyrosine and L-tryptophan by the aniracetam cognition enhancer drug: quenching mechanism using Stern–Volmer and double-log plots. *Luminescence.* 2020;35(5):728-737. doi:10.1002/bio.3778
150. Yang C-Y, Paczesny S, inventors; Inhibitors of suppression of tumorigenicity 2 (ST2) and methods using the same. Worldwide patent application WO2017083242A1. 2016.
151. Yang C-Y, Zhang J, Daguindau E, et al. Discovery of ST2 Inhibitors: From Biomarker to Potential Drug Target in Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(3):S91-S93. doi:10.1016/j.bbmt.2015.11.392
152. Yuan X, Chinnaswamy K, Stuckey JA, Yang C-Y. Computational Cosolvent Mapping Analysis Leads to Identify Salicylic Acid Analogs as Weak Inhibitors of ST2 and IL33 Binding. *J Phys Chem B.* 2022;126(12):2394-2406. doi:10.1021/acs.jpcc.2c00341
153. Park SB, Kim SJ, Cho SW, Choi CY, Lee S. Blocking of the IL-33/ST2 Signaling Axis by a Single-Chain Antibody Variable Fragment (scFv) Specific to IL-33 with a Defined Epitope. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):6953. doi:10.3390/ijms21186953
154. Funakoshi-Tago M, Okamoto K, Izumi R, et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2015;25(1):189-198. doi:10.1016/j.intimp.2015.01.012
155. Nakajima S, Ishimaru K, Kobayashi A, et al. Resveratrol inhibits IL-33-mediated mast cell activation by targeting the MK2/3–PI3K/Akt axis. *Sci Rep.* 2019;9(1):18423. doi:10.1038/s41598-019-54878-5
156. Liu X, Li M, Wu Y, et al. Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;386(1):181-185. doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.008
157. Kim YH, Yang TY, Park CS, et al. Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis. *Allergy.* 2012;67(2):183-190. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02735.x
158. Chen YL, Gutowska-Owsiak D, Hardman CS, et al. Proof-of-concept clinical trial of etokimab shows a key role for IL-33 in atopic dermatitis pathogenesis. *Sci Transl Med.* 2019;11(515):eaax2945. doi:10.1126/scitranslmed.aax2945

159. Nnane I, Frederick B, Yao Z, et al. The first-in-human study of CNTO 7160, an anti-interleukin-33 receptor monoclonal antibody, in healthy subjects and patients with asthma or atopic dermatitis. *Br J Clin Pharmacol*. 2020;86(12):2507-2518. doi:10.1111/bcp.14361
160. Akinseye C, Crim C, Newlands A, Fairman D. Efficacy and safety of GSK3772847 in participants with moderate-to-severe asthma with allergic fungal airway disease: A phase IIa randomized, multicenter, double-blind, sponsor-open, comparative trial. *PLoS One*. 2023;18(2):e0281205. doi:10.1371/journal.pone.0281205
161. Kelsen SG, Agache IO, Soong W, et al. Astegolimab (anti-ST2) efficacy and safety in adults with severe asthma: A randomized clinical trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;148(3):790-798. doi:10.1016/j.jaci.2021.03.044
162. Yang C-Y, Yuan X, Jiang H, et al. Novel Chemical Series of Anti-ST2 Small Molecules Suppress Allogeneic T Cells Proliferation While Increasing Treg Cells and Improve GVHD and Survival In Vivo. *Blood*. 2022;140(Supplement 1):10675-10677. doi:10.1182/blood-2022-163374
163. Yang C-Y, Delproposto J, Chinnaswamy K, et al. Conformational Sampling and Binding Site Assessment of Suppression of Tumorigenicity 2 Ectodomain. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146522. doi:10.1371/journal.pone.0146522
164. Yang C-Y. Comparative Analyses of the Conformational Dynamics Between the Soluble and Membrane-Bound Cytokine Receptors. *Sci Rep*. 2020;10(1):7399. doi:10.1038/s41598-020-64034-z
165. Nguyen TTT, Truong THD, Le GB, et al. Generation and characterization of soluble interleukin-33 receptor fused with immunoglobulin gamma-1 constant domain expressed by *Pichia pastoris* yeast. *J Pharm Pharmacol*. 2015;67(3):329-337. doi:10.1111/jphp.12371
166. Kang M, Kim S, Heo CH, et al. Backbone assignment and inhibitor binding studies of IL-33 mutants by NMR spectroscopy. *J Anal Sci Technol*. 2023;14(1):32. doi:10.1186/s40543-023-00392-3
167. consortium PD-K. PDBe-KB: a community-driven resource for structural and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D344-D353. doi:10.1093/nar/gkz853
168. Chen WY, Tsai TH, Yang JL, Li LC. Therapeutic Strategies for Targeting IL-33/ST2 Signalling for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(1):349-358. doi:10.1159/000492885
169. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):235-242. doi:10.1093/nar/28.1.235
170. Günther S, Deredge D, Bowers AL, et al. IL-1 family cytokines use distinct molecular mechanisms to signal through their shared co-receptor. *Immunity*. 2017;47(3):510-523.e4. doi:10.1016/j.immuni.2017.08.004
171. Koes DR, Camacho CJ. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(W1):W409-W414. doi:10.1093/nar/gks378
172. Sunseri J, Koes DR. Pharmit: interactive exploration of chemical space. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W442-W448. doi:10.1093/nar/gkw287

173. Wishart DS, Knox C, Guo AC, et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:668-672. doi:10.1093/nar/gkj067
174. *Molecular Operating Environment (MOE)* 2022.02. 2022. <https://www.chemcomp.com>
175. Jakalian A, Jack DB, Bayly CI. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J Comput Chem.* 2002;23(16):1623-1641. doi:10.1002/jcc.10128
176. QUACPAC 2.2.2.0. Version 2.2.2.0. 2022. <http://www.eyesopen.com>
177. OMEGA 4.2.2.0. Version 4.2.2.0. 2022. <http://www.eyesopen.com>
178. McGuffin LJ, Aldowsari FMF, Alharbi SMA, Adiyaman R. ModFOLD8: accurate global and local quality estimates for 3D protein models. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W425-W430. doi:10.1093/nar/gkab321
179. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(suppl_2):W375-W383. doi:10.1093/nar/gkm216
180. Chen VB, Arendall WB, III, Headd JJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66(1):12-21. doi:10.1107/S0907444909042073
181. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci.* 2018;27(1):293-315. doi:10.1002/pro.3330
182. Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol.* 1963;7(1):95-99. doi:10.1016/S0022-2836(63)80023-6
183. Laskowski RA, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková RS, Thornton JM. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci.* 2018;27(1):129-134. doi:10.1002/pro.3289
184. Case DA, Aktulga HM, Belfon K, et al. AmberTools. *J Chem Inf Model.* 2023;63(20):6183-6191. doi:10.1021/acs.jcim.3c01153
185. Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, et al. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput.* 2015;11(8):3696-3713. doi:10.1021/acs.jctc.5b00255
186. Roe DR, Cheatham TE, III. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput.* 2013;9(7):3084-3095. doi:10.1021/ct400341p
187. Bouysset C, Fiorucci S. ProLIF: a library to encode molecular interactions as fingerprints. *J Cheminform.* 2021;13(1):72. doi:10.1186/s13321-021-00548-6
188. Michaud-Agrawal N, Denning EJ, Woolf TB, Beckstein O. MDAAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *J Comput Chem.* 2011;32(10):2319-2327. doi:10.1002/jcc.21787
189. Krüger DM, Gohlke H. DrugScorePPI webserver: fast and accurate in silico alanine scanning for scoring protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Suppl 2):W480-W486. doi:10.1093/nar/gkq471

190. Wood CW, Ibarra AA, Bartlett GJ, et al. BAlaS: fast, interactive and accessible computational alanine-scanning using BudeAlaScan. *Bioinformatics*. 2020;36(9):2917-2919. doi:10.1093/bioinformatics/btaa026
191. Ibarra AA, Bartlett GJ, Hegedüs Z, et al. Predicting and Experimentally Validating Hot-Spot Residues at Protein–Protein Interfaces. *ACS Chem Biol*. 2019;14(10):2252-2263. doi:10.1021/acscchembio.9b00560
192. Zhang N, Chen Y, Lu H, et al. MutaBind2: Predicting the Impacts of Single and Multiple Mutations on Protein-Protein Interactions. *iScience*. 2020;23(3):100939. doi:10.1016/j.isci.2020.100939
193. Oleinikovas V, Saladino G, Cossins BP, Gervasio FL. Understanding Cryptic Pocket Formation in Protein Targets by Enhanced Sampling Simulations. *J Am Chem Soc*. 2016;138(43):14257-14263. doi:10.1021/jacs.6b05425
194. Soga S, Shirai H, Kobori M, Hirayama N. Use of Amino Acid Composition to Predict Ligand-Binding Sites. *J Chem Inf Model*. 2007;47(2):400-406. doi:10.1021/ci6002202
195. Le Guilloux V, Schmidtke P, Tuffery P. Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(1):168. doi:10.1186/1471-2105-10-168
196. Kochnev Y, Durrant JD. FPocketWeb: protein pocket hunting in a web browser. *J Cheminform*. 2022;14(1):58. doi:10.1186/s13321-022-00637-0
197. Volkamer A, Kuhn D, Rippmann F, Rarey M. DoGSiteScorer: a web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment. *Bioinformatics*. 2012;28(15):2074-2075. doi:10.1093/bioinformatics/bts310
198. Graef J, Ehrh C, Rarey M. Binding Site Detection Remastered: Enabling Fast, Robust, and Reliable Binding Site Detection and Descriptor Calculation with DoGSite3. *J Chem Inf Model*. 2023;63(10):3128-3137. doi:10.1021/acs.jcim.3c00336
199. Halgren TA. Identifying and Characterizing Binding Sites and Assessing Druggability. *J Chem Inf Model*. 2009;49(2):377-389. doi:10.1021/ci800324m
200. Ravindranath PA, Sanner MF. AutoSite: an automated approach for pseudo-ligands prediction—from ligand-binding sites identification to predicting key ligand atoms. *Bioinformatics*. 2016;32(20):3142-3149. doi:10.1093/bioinformatics/btw367
201. Ngan C-H, Hall DR, Zerbe B, et al. FTSite: high accuracy detection of ligand binding sites on unbound protein structures. *Bioinformatics*. 2012;28(2):286-287. doi:10.1093/bioinformatics/btr651
202. Tran-Nguyen V-K, Da Silva F, Bret G, Rognan D. All in One: Cavity Detection, Druggability Estimate, Cavity-Based Pharmacophore Perception, and Virtual Screening. *J Chem Inf Model*. 2019;59(1):573-585. doi:10.1021/acs.jcim.8b00684
203. Krivák R, Hoksza D. P2Rank: machine learning based tool for rapid and accurate prediction of ligand binding sites from protein structure. *J Cheminform*. 2018;10(1):39. doi:10.1186/s13321-018-0285-8

204. Jendele L, Krivak R, Skoda P, Novotny M, Hoksza D. PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W345-W349. doi:10.1093/nar/gkz424
205. Jiménez J, Doerr S, Martínez-Rosell G, Rose AS, De Fabritiis G. DeepSite: protein-binding site predictor using 3D-convolutional neural networks. *Bioinformatics.* 2017;33(19):3036-3042. doi:10.1093/bioinformatics/btx350
206. Meller A, Ward M, Borowsky J, et al. Predicting locations of cryptic pockets from single protein structures using the PocketMiner graph neural network. *Nat Commun.* 2023;14(1):1177. doi:10.1038/s41467-023-36699-3
207. Ghanakota P, Carlson HA. Moving Beyond Active-Site Detection: MixMD Applied to Allosteric Systems. *J Phys Chem B.* 2016;120(33):8685-8695. doi:10.1021/acs.jpcc.6b03515
208. Martinez-Rosell G, Lovera S, Sands ZA, De Fabritiis G. PlayMolecule CrypticScout: Predicting Protein Cryptic Sites Using Mixed-Solvent Molecular Simulations. *J Chem Inf Model.* 2020;60(4):2314-2324. doi:10.1021/acs.jcim.9b01209
209. Schmidtke P, Bidon-Chanal A, Luque FJ, Barril X. MDpocket: open-source cavity detection and characterization on molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics.* 2011;27(23):3276-3285. doi:10.1093/bioinformatics/btr550
210. Panjkovich A, Daura X. Exploiting protein flexibility to predict the location of allosteric sites. *BMC Bioinformatics.* 2012;13(1):273. doi:10.1186/1471-2105-13-273
211. Chan WKB, DasGupta D, Carlson HA, Traynor JR. Mixed-solvent molecular dynamics simulation-based discovery of a putative allosteric site on regulator of G protein signaling 4. *J Comput Chem.* 2021;42(30):2170-2180. doi:10.1002/jcc.26747
212. Voet A, Zhang KYJ. Pharmacophore Modelling as a Virtual Screening Tool for the Discovery of SMPPIIs. *Curr Pharm Des.* 2012;18(30):4586-4598. doi:10.2174/138161212802651616
213. Voet A, Banwell EF, Sahu KK, Heddle JG, Zhang KYJ. Protein interface pharmacophore mapping tools for small molecule protein: Protein interaction inhibitor discovery. *Curr Top Med Chem.* 2013;13(9):989-1001. doi:10.2174/1568026611313090003
214. Jiang S, Feher M, Williams C, Cole B, Shaw DE. AutoPH4: An Automated Method for Generating Pharmacophore Models from Protein Binding Pockets. *J Chem Inf Model.* 2020;60(9):4326-4338. doi:10.1021/acs.jcim.0c00121
215. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455-461. doi:10.1002/jcc.21334
216. LeadIT version 2.1.8. 2014. <http://www.biosolveit.de>
217. Imrie F, Bradley AR, Deane CM. Generating property-matched decoy molecules using deep learning. *Bioinformatics.* 2021;37(15):2134-2141. doi:10.1093/bioinformatics/btab080
218. Reulecke I, Lange G, Albrecht J, Klein R, Rarey M. Towards an Integrated Description of Hydrogen Bonding and Dehydration: Decreasing False Positives

- in Virtual Screening with the HYDE Scoring Function. *ChemMedChem*. 2008;3(6):885-897. doi:10.1002/cmdc.200700319
219. Schneider N, Lange G, Hindle S, Klein R, Rarey M. A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein–ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function. *J Comput Aided Mol Des*. 2013;27(1):15-29. doi:10.1007/s10822-012-9626-2
 220. He X, Man VH, Yang W, Lee T-S, Wang J. A fast and high-quality charge model for the next generation general AMBER force field. *J Chem Phys*. 2020;153(11):114502. doi:10.1063/5.0019056
 221. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1-2:19-25. doi:10.1016/j.softx.2015.06.001
 222. *Desmond Molecular Dynamics System*. Version 4.5. 2016. <https://www.deshawresearch.com>
 223. ROCS 3.6.0.0. Version 3.6.0.0. 2022. <http://www.eyesopen.com>
 224. Mills JEJ, Dean PM. Three-dimensional hydrogen-bond geometry and probability information from a crystal survey. *J Comput Aided Mol Des*. 1996;10(6):607-622. doi:10.1007/BF00134183
 225. Grant JA, Haigh JA, Pickup BT, Nicholls A, Sayle RA. Lingos, Finite State Machines, and Fast Similarity Searching. *J Chem Inf Model*. 2006;46(5):1912-1918. doi:10.1021/ci6002152
 226. Woolson RF. Wilcoxon Signed-Rank Test. *Wiley Encyclopedia of Clinical Trials*. 2008:1-3.
 227. Yang C-Y, Ramadan A, Daguindau E, et al. Small Molecule ST2 Inhibitors Cause Reduction of Soluble ST2 and Improve Gvhd and Survival In Vivo. *Blood*. 2016;128(22):528-528. doi:10.1182/blood.V128.22.528.528
 228. Fei J, Zhou L, Liu T, Tang X-Y. Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, and Molecular Docking Studies for Discovery of Novel Akt2 Inhibitors. *Int J Med Sci*. 2013;10(3):265-275. doi:10.7150/ijms.5344
 229. Yap CW. PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. *J Comput Chem*. 2011;32(7):1466-1474. doi:10.1002/jcc.21707
 230. Sushko I, Novotarskyi S, Körner R, et al. Online chemical modeling environment (OCHEM): web platform for data storage, model development and publishing of chemical information. *J Comput Aided Mol Des*. 2011;25(6):533-554. doi:10.1007/s10822-011-9440-2
 231. Ballabio D, Consonni V, Mauri A, et al. A novel variable reduction method adapted from space-filling designs. *Chemom Intell Lab Syst*. 2014;136:147-154. doi:10.1016/j.chemolab.2014.05.010
 232. Ambure P, Gajewicz-Skretna A, Cordeiro MNDS, Roy K. New Workflow for QSAR Model Development from Small Data Sets: Small Dataset Curator and Small Dataset Modeler. Integration of Data Curation, Exhaustive Double Cross-Validation, and a Set of Optimal Model Selection Techniques. *J Chem Inf Model*. 2019;59(10):4070-4076. doi:10.1021/acs.jcim.9b00476

233. Kennard RW, Stone LA. Computer Aided Design of Experiments. *Technometrics*. 1969;11(1):137-148. doi:10.2307/1266770
234. Dong J, Wang N-N, Yao Z-J, et al. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *J Cheminform*. 2018;10(1):29. doi:10.1186/s13321-018-0283-x
235. Xiong G, Wu Z, Yi J, et al. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W5-W14. doi:10.1093/nar/gkab255
236. Nguyễn Quốc Thái, Nguyễn Thanh Hoài Phong, Mai Thành Tấn, Mai Huỳnh Như, Thái Khắc Minh. Tạo dòng và biểu hiện interleukin-33 người dung hợp với SUMO trên *Escherichia coli*. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 2024;538(3):98-101. doi:10.51298/vmj.v538i3.9585
237. Hu Z, Zhang T, Jiang S, Yin H. Protocol for evaluation and validation of TLR8 antagonists in HEK-Blue cells via secreted embryonic alkaline phosphatase assay. *STAR Protocols*. 2022;3(1):101061. doi:10.1016/j.xpro.2021.101061
238. Quenching of Fluorescence. Lakowicz JR *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US; 2006:277-330.
239. Berezin MY, Achilefu S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem Rev*. 2010;110(5):2641-2684. doi:10.1021/cr900343z
240. Cheng Z. Interaction of ergosterol with bovine serum albumin and human serum albumin by spectroscopic analysis. *Mol Biol Rep*. 2012;39(10):9493-9508. doi:10.1007/s11033-012-1814-6
241. Paramaguru G, Kathiravan A, Selvaraj S, Venuvanalingam P, Renganathan R. Interaction of anthraquinone dyes with lysozyme: Evidences from spectroscopic and docking studies. *J Hazard Mater*. 2010;175(1):985-991. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.10.107
242. MacFarland TW, Yates JM. *Introduction to Nonparametric Statistics for the Biological Sciences Using R*. 1 ed. Springer Cham; 2016.
243. Friedrich N-O, de Bruyn Kops C, Flachsenberg F, et al. Benchmarking Commercial Conformer Ensemble Generators. *J Chem Inf Model*. 2017;57(11):2719-2728. doi:10.1021/acs.jcim.7b00505
244. Graham SE, Leja N, Carlson HA. MixMD Probeview: Robust Binding Site Prediction from Cosolvent Simulations. *J Chem Inf Model*. 2018;58(7):1426-1433. doi:10.1021/acs.jcim.8b00265
245. Lexa KW, Goh GB, Carlson HA. Parameter Choice Matters: Validating Probe Parameters for Use in Mixed-Solvent Simulations. *J Chem Inf Model*. 2014;54(8):2190-2199. doi:10.1021/ci400741u
246. Vulpetti A, Rondeau J-M, Bellance M-H, et al. Ligandability Assessment of IL-1 β by Integrated Hit Identification Approaches. *J Med Chem*. 2024;67(10):8141-8160. doi:10.1021/acs.jmedchem.4c00240
247. Jamwal A, Colomb F, McSorley HJ, Higgins MK. Structural basis for IL-33 recognition and its antagonism by the helminth effector protein HpARI2. *Nat Commun*. 2024;15(1):5226. doi:10.1038/s41467-024-49550-0

248. Wilson CGM, Arkin MR. Small-Molecule Inhibitors of IL-2/IL-2R: Lessons Learned and Applied. Vassilev L, Fry D *Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions*. Springer Berlin Heidelberg; 2011:25-59.
249. Lee JY, Lee K, Koh B. Identification of new IL-7R α small-molecule agonists: a multi-computational approach. *SAR QSAR Environ Res*. 2021;32(9):719-729. doi:10.1080/1062936X.2021.1969684
250. Hommel U, Hurth K, Rondeau J-M, et al. Discovery of a selective and biologically active low-molecular weight antagonist of human interleukin-1 β . *Nat Commun*. 2023;14(1):5497. doi:10.1038/s41467-023-41190-0
251. Quinnell SP, Leifer BS, Nestor ST, et al. A Small-Molecule Inhibitor to the Cytokine Interleukin-4. *ACS Chem Biol*. 2020;15(10):2649-2654. doi:10.1021/acscchembio.0c00615
252. El Gamal R, El Abass SA, Elmanshi HM. Quick simultaneous analysis of bambuterol and montelukast based on synchronous spectrofluorimetric technique. *R Soc Open Sci*. 2020;7(12):201156. doi:10.1098/rsos.201156
253. Peralta CM, Acosta G, Henestrosa C, Gil RA, Fernández LP. On-line Method for Montelukast Determination in Bile Salt Medium with Multivariate Optimization and Fluorescent Detection. *J Anal Chem*. 2022;77(3):308-317. doi:10.1134/S106193482203008X
254. Carta G, Knox AJS, Lloyd DG. Unbiasing Scoring Functions: A New Normalization and Rescoring Strategy. *J Chem Inf Model*. 2007;47(4):1564-1571. doi:10.1021/ci600471m
255. Saikumar Jayalatha AK, Hesse L, Ketelaar ME, Koppelman GH, Nawijn MC. The central role of IL-33/IL-1RL1 pathway in asthma: From pathogenesis to intervention. *Pharmacol Ther*. 2021;225:107847. doi:10.1016/j.pharmthera.2021.107847
256. Taracanova A, Tsilioni I, Conti P, et al. Substance P and IL-33 administered together stimulate a marked secretion of IL-1 β from human mast cells, inhibited by methoxyluteolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(40):E9381-E9390. doi:10.1073/pnas.1810133115
257. Wang J-X, Kaieda S, Ameri S, et al. IL-33/ST2 axis promotes mast cell survival via BCLXL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(28):10281-10286. doi:10.1073/pnas.1404182111
258. Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(6):1484-1490. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.005
259. Suzukawa M, Koketsu R, Iikura M, et al. Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab Invest*. 2008;88(11):1245-1253. doi:10.1038/labinvest.2008.82
260. Takatori H, Makita S, Ito T, Matsuki A, Nakajima H. Regulatory Mechanisms of IL-33-ST2-Mediated Allergic Inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:2004. doi:10.3389/fimmu.2018.02004
261. Menardo J-L, Horak F, Danzig MR, Czarlewski W. A review of loratadine in the treatment of patients with allergic bronchial asthma. *Clin Ther*. 1997;19(6):1278-1293. doi:10.1016/S0149-2918(97)80005-7

262. Tuncel T, Karaman M, Firinci F, et al. The Effect of Rupatadine on Lung Histopathology in a Murine Model of Chronic Asthma. *J Asthma*. 2013;50(2):141-146. doi:10.3109/02770903.2012.757775
263. Peroni DG, Piacentini GL, Pietrobelli A, et al. The combination of single-dose montelukast and loratadine on exercise-induced bronchospasm in children. *Eur Respir J*. 2002;20(1):104. doi:10.1183/09031936.02.00234902
264. Maeba S, Ichiyama T, Ueno Y, et al. Effect of montelukast on nuclear factor κ B activation and proinflammatory molecules. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;94(6):670-674. doi:10.1016/S1081-1206(10)61326-9
265. Nelson HS. Prospects for antihistamines in the treatment of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(4):S96-S100. doi:10.1016/S0091-6749(03)01883-9

PHỤ LỤC

Các phụ lục bổ sung cho nội dung của luận án được lưu trữ tại các đường dẫn tương ứng dưới đây:

PHỤ LỤC 1	Thông tin về các cấu trúc không gian 3 chiều liên quan đến IL-33 và thụ thể ST2 được lưu trữ tại Ngân hàng Dữ liệu Protein RCSB	Link
PHỤ LỤC 2	Tập hợp các hợp chất phân tử nhỏ có khả năng tương tác với IL-33/ST2 được sử dụng để xây dựng và đánh giá các mô hình <i>in silico</i> trong đề tài	Link
PHỤ LỤC 3	Thông tin về các phần mềm và máy tính được sử dụng cho nghiên cứu <i>in silico</i> trên IL-33/ST2	Link
PHỤ LỤC 4	Tế bào, hóa chất và thiết bị được sử dụng cho nghiên cứu <i>in vitro</i> đánh giá hoạt tính ức chế IL-33/ST2	Link
PHỤ LỤC 5	Các acid amin tại bề mặt tương tác protein-protein giữa IL-33 và thụ thể ST2	Link
PHỤ LỤC 6	Các phương pháp xác định vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ trên protein được áp dụng trong nghiên cứu	Link
PHỤ LỤC 7	Kết quả xây dựng cơ sở dữ liệu cấu trúc hóa học định hướng cho nghiên cứu sàng lọc <i>in silico</i> chất ức chế PPI	Link
PHỤ LỤC 8	Cấu trúc của IL-33 và thụ thể ST2 sau khi tinh chỉnh bằng phần mềm MOE	Link
PHỤ LỤC 9	Thông tin bổ sung cho kết quả khảo sát tương tác protein-protein giữa IL-33 và ST2	Link
PHỤ LỤC 10	Kết quả quét đột biến alanin trên IL-33 và ST2	Link
PHỤ LỤC 11	Các cytokin họ IL-1 có cấu trúc không gian 3 chiều được lưu trữ tại Ngân hàng dữ liệu protein	Link
PHỤ LỤC 12	Kết quả dự đoán vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ trên cấu trúc apo và holo của IL-1 β bằng các công cụ tính toán chỉ dựa trên cấu trúc tĩnh của protein	Link
PHỤ LỤC 13	Kết quả dự đoán vị trí gắn kết cho phối tử phân tử nhỏ trên cấu trúc apo và holo của IL-36 γ bằng các công cụ tính toán chỉ dựa trên cấu trúc tĩnh của protein	Link
PHỤ LỤC 14	Kết quả xác định vị trí gắn kết trên dạng apo của IL-1 β và IL-36 γ bằng mô phỏng MD đồng dung môi	Link
PHỤ LỤC 15	Các vị trí gắn kết tiềm năng cho phối tử phân tử nhỏ trên IL-33 được dự đoán bằng các công cụ tính toán	Link
PHỤ LỤC 16	Các vị trí gắn kết tiềm năng cho phối tử phân tử nhỏ trên ST2 được dự đoán bằng các công cụ tính toán	Link
PHỤ LỤC 17	Thông tin bổ sung cho kết quả sàng lọc chất gắn kết với IL-33 tại vị trí 1 bằng phương pháp pharmacophore “bắt chước” PPI	Link

PHỤ LỤC 18	Thông tin bổ sung cho kết quả sàng lọc chất gắn kết với ST2 tại vị trí 1 bằng phương pháp pharmacophore “bắt chước” PPI	Link
PHỤ LỤC 19	Thông tin bổ sung cho kết quả sàng lọc chất gắn kết với IL-33 tại vị trí 2 bằng phương pháp pharmacophore “bắt chước” PPI (PH4-IL33-S2-M1)	Link
PHỤ LỤC 20	Thông tin bổ sung cho kết quả sàng lọc chất gắn kết với IL-33 tại vị trí 2 bằng mô hình pharmacophore dựa trên phức hợp IL-33 và hợp chất 7c (PH4-IL33-S2-M2)	Link
PHỤ LỤC 21	Thông tin bổ sung cho mô hình ROCS dựa trên hợp chất 7c tìm kiếm chất ức chế IL-33 tại vị trí 2	Link
PHỤ LỤC 22	Thông tin bổ sung cho mô hình pharmacophore PH4-iST2 dựa trên phối tử ức chế thụ thể ST2	Link
PHỤ LỤC 23	Thông tin bổ sung cho mô hình QSAR dự đoán chất ức chế IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33	Link
PHỤ LỤC 24	Thông tin bổ sung cho kết quả sàng lọc ảo thư viện hợp chất nội bộ qua các mô hình <i>in silico</i>	Link
PHỤ LỤC 25	Kết quả phân tích các quỹ đạo mô phỏng MD của phức hợp giữa các dẫn chất quercetin với miền D1D2 của ST2	Link
PHỤ LỤC 26	Thông tin bổ sung cho các hợp chất được lựa chọn cho thử nghiệm <i>in vitro</i>	Link
PHỤ LỤC 27	Thông tin bổ sung cho kết quả thử nghiệm đánh giá tác động ức chế tín hiệu IL-33/ST2 trên dòng tế bào HEK-Blue IL-33	Link
PHỤ LỤC 28	Thông tin bổ sung cho thử nghiệm đánh giá khả năng gắn kết của hợp chất phân tử nhỏ trên IL-33 bằng quang phổ huỳnh quang	Link
PHỤ LỤC 29	Tóm tắt các kết quả sàng lọc chất ức chế IL-33/ST2 từ <i>in silico</i> đến <i>in vitro</i> của đề tài	Link
TÀI LIỆU THAM KHẢO PHẦN PHỤ LỤC		Link