

Nghiên cứu sàng lọc ảo các chất có khả năng ức chế hoạt tính interleukin-18

Nguyễn Quốc Thái¹, Nguyễn Sỹ Tịnh Thùy¹, Trần Thị Thuý Nga²
Trương Lê Mỹ Ngọc¹, Võ Thanh Phương¹, Huỳnh Nhật Lễ¹
Phạm Đình Long Hưng¹, Thái Khắc Minh¹, Lê Minh Trí^{1,3*}

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Dược, Trường Đại học Kỹ thuật Y Dược Đà Nẵng

³Khoa Y, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

Summary

This study aims to develop models for the virtual screening of IL-18 inhibitors based on the interaction between IL-18 and its receptor IL-18R α . The results hopefully can contribute to design and synthesis of novel medicines for autoimmune and inflammatory diseases. With IL-18/IL-18R α 3D-structures, 3D-pharmacophore modeling, molecular docking, and molecular dynamics simulations were performed on 147.158 structures from Drugbank and structural fragments libraries. The results showed that the compound DB02025 for site 1 of IL-18 is highly potential for the development of immunosuppressant drugs.

Keywords: IL-18, *in silico*, 3D-pharmacophore, docking, molecular dynamics simulation.

Đặt vấn đề

Interleukin-18 (IL-18) có vai trò quan trọng trong quá trình viêm và phản ứng miễn dịch. Ở bệnh nhân mắc các bệnh dị ứng (hen phế quản, viêm da dị ứng, viêm mũi dị ứng,...) và bệnh tự miễn (viêm khớp dạng thấp, lupus ban đỏ hệ thống, bệnh Still ở người lớn, bệnh xơ cứng, bệnh Crohn, viêm loét đại tràng,...), nồng độ IL-18 trong máu cao [1]. IL-18 cũng được tìm thấy trong nước tiểu của bệnh nhân bị suy thận cấp [2] và gián tiếp cho sự tiến triển của bệnh tiểu đường type 2 [3]. IL-18 còn là một cytokin tiền viêm đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch mắc phải và bẩm sinh [4]. Hoạt động tiền viêm của IL-18 được thực hiện bằng cách sản xuất các cytokin gây viêm, chemokin, nitric oxid, prostaglandin và được khuếch đại bởi hoạt tính cảm ứng sản xuất IFN-gamma (Interferon-gamma, hay viết tắt là IFN- γ) từ đó kích hoạt đại thực bào. Các hoạt động đa dạng của IL-18 cho thấy vai trò quan trọng của cytokin này trong việc kích hoạt và phản cực phản ứng viêm và phản ứng miễn dịch [1]. Việc phát hiện ra

protein liên kết IL-18 (IL-18BP), chất ức chế hoạt tính sinh lý IL-18 và dấu hiệu sinh học IL-18 làm cho cytokin này trở thành mục tiêu hấp dẫn để nghiên cứu trong điều trị các bệnh lý liên quan đến đáp ứng miễn dịch và bệnh tự miễn [5]. Vì vậy, việc xây dựng mô hình *in silico* để sàng lọc các chất có khả năng ức chế hoạt tính IL-18, dựa trên tương tác IL-18 và IL-18R α (thụ thể của IL-18) là cần thiết, từ đó định hướng cho việc thiết kế và tổng hợp các thuốc điều trị các bệnh viêm nhiễm, bệnh tự miễn thể hệ mới trong tương lai.

Phương pháp nghiên cứu

Quá trình sàng lọc các chất có khả năng ức chế hoạt tính interleukin-18 được thực hiện qua ba giai đoạn: Xây dựng mô hình 3D-pharmacophore, mô tả phân tử docking và mô phỏng động học phức hợp protein-ligand bằng phần mềm Gromacs trên hệ điều hành ubuntu. Nghiên cứu xây dựng mô hình pharmacophore bằng phương pháp dựa trên cấu trúc mục tiêu tác động (structure-based), nghĩa là dựa trên các acid amin quan trọng trong khoang gắn kết của IL-18 với thụ thể IL-18R α . Công cụ Pharmacophore Editor của phần mềm MOE 2015.10 được sử dụng để xây dựng mô hình 3D-pharmacophore và sàng lọc. Sử dụng cấu trúc nhiễu xạ tia X 3D đồng kết tinh của phức hợp IL-18/IL-18R α (PDB ID là 4R6U)

Chịu trách nhiệm: Lê Minh Trí

Email: leminhtri@ump.edu.vn

Ngày nhận: 20/8/2020

Ngày phản biện: 26/8/2020

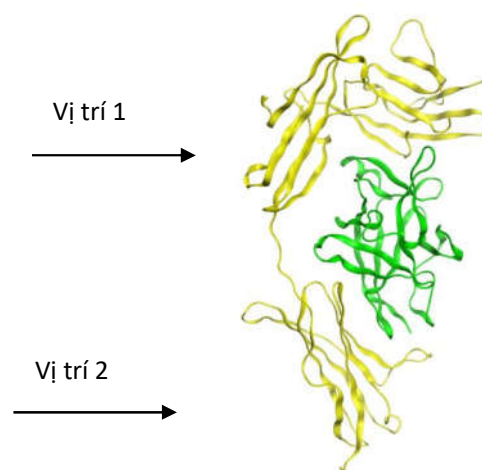
Ngày duyệt bài: 29/10/2020

với độ phân giải 2,8 Å tại ngân hàng dữ liệu protein. Tiến hành xây dựng mô hình pharmacophore theo 2 hướng: Tìm chất gắn kết IL-18 dựa vào cấu trúc thụ thể IL-18R α và tìm chất gắn kết thụ thể IL-18R dựa vào cấu trúc IL-18. Trong mô hình mô tả phân tử docking, cấu trúc tinh thể đồng kết tinh IL-18/IL-18R α thích hợp được lựa chọn cho nghiên cứu. Chuẩn bị sẵn cấu trúc trong MOE 2015.10. Các phân tử ligand được tối thiểu hóa năng lượng lần 1, sau đó tiến hành động lực học phân tử và tối thiểu hóa năng lượng một lần nữa trong Sybyl-X 2.0 để thu được các cấu trúc có năng lượng tối thiểu toàn phần chuẩn bị cho docking. Quá trình docking được thực hiện bằng phần mềm FlexX cho kết quả gồm các cấu dạng gắn kết và điểm số tương ứng (năng lượng gắn kết). Kết quả này sẽ được phân tích trong MOE 2015.10 để đánh giá khả năng gắn kết của các ligand. Cuối cùng là mô phỏng động học phức hợp protein-ligand bằng phần mềm Gromacs. Cấu trúc của protein (PDB 4R6U) sau khi loại bỏ nước và proton hóa bằng phần mềm MOE [6] được chuẩn bị bằng công cụ CHARMM-GUI tại địa chỉ www.charmm-gui.org và xây dựng topology sử dụng trường lực CHARMM-27 [7]. Cấu trúc ligand lựa chọn sau khi phân tích tương tác giữa protein và ligand sau docking được thêm hydro bằng phần mềm MOE sẽ tạo thành cơ sở dữ liệu và lưu thành file *.sdf. Tiếp theo, xây dựng topology cho ligand theo trường lực CHARMM-27 bằng cách sử dụng công cụ SwissParam tại địa chỉ <http://www.swissparam.ch> [8]. Mô phỏng động lực học phân tử phức hợp protein-ligand bằng phần mềm Gromacs. Kết quả mô phỏng động lực học được đánh giá thông qua độ ổn định của protein, độ linh động của các acid amin trong túi gắn kết protein và độ ổn định của sự gắn kết ligand với protein.

Kết quả và bàn luận

Mô hình pharmacophore

Nhận thấy IL-18 gắn kết với thụ thể IL-18R α tại 2 vị trí, tại mỗi vị trí thu được 2 mô hình khác nhau (hình 1).



Hình 1. Phức hợp IL-18 và thụ thể IL-18R α

Tại vị trí 1

- Mô hình chất gắn kết IL-18 dựa vào IL-18R α : **mô hình A1**.
- Mô hình chất gắn kết IL-18R α dựa vào IL-18: **mô hình D1**.

Tại vị trí 2

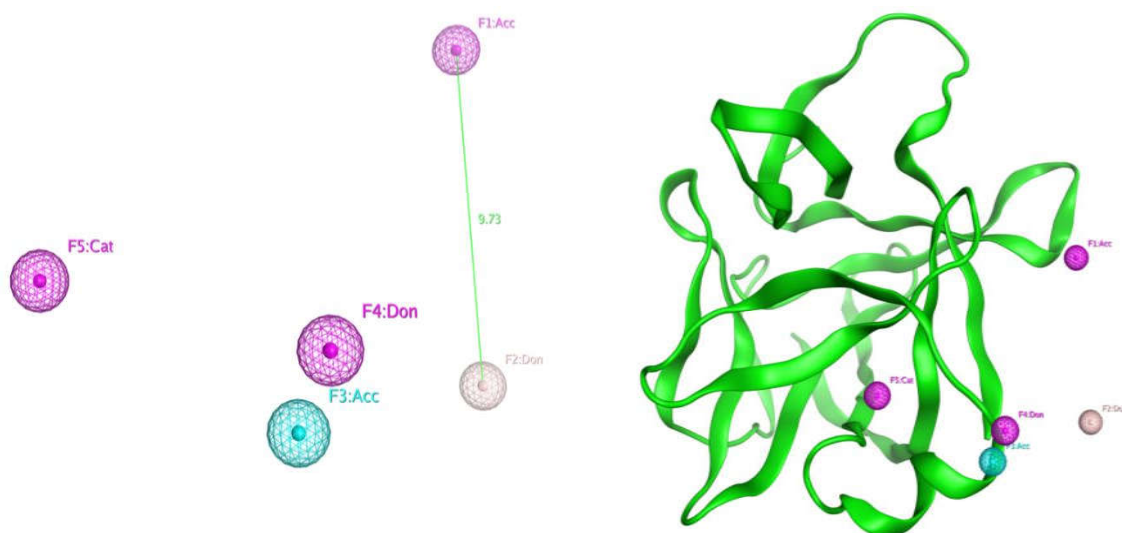
- Mô hình chất gắn kết IL-18 dựa vào IL-18R α : **mô hình A2**.
- Mô hình chất gắn kết IL-18R α dựa vào IL-18: **mô hình D2**.

Các mô hình pharmacophore cho chất gắn kết IL-18

Tại vị trí 1 (bảng 1), xuất hiện hai điểm bắt buộc là Lys128 (F1:Acc), Ser127 (F2:Acc). Ngoài ra, các acid amin Gln124 tạo liên kết cho hydro với Thr34 và có khả năng tạo một liên kết nhận hydro, Arg25 tạo liên kết cầu muối với Glu31. Mô hình pharmacophore ràng buộc thỏa mãn ít nhất 4 điểm. Tiến hành giống hàng mô hình pharmacophore ở vị trí 1 (hình 2).

Bảng 1. Tương tác giữa các acid amin quan trọng của IL-18/ IL-18R α tại vị trí 1

Acid amin trên IL-18	Tương tác	Acid amin trên IL-18R α
Asp17	(-) cầu muối (+)	Lys128
Met33	Kỵ nước	Nhiều acid amin
Asp35	(nhận) 2 liên kết hydro (cho)	Ser127

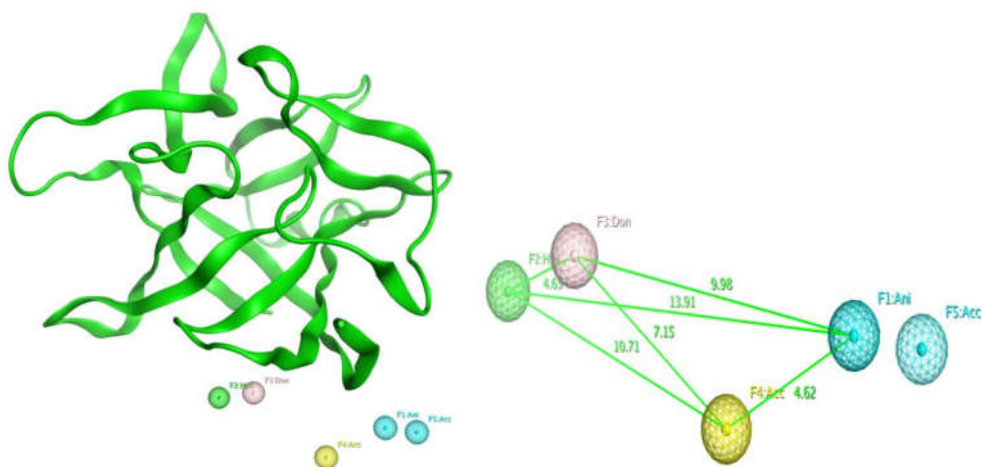


Hình 2. Mô hình A1 và sự giống hàng mô hình A1 lên IL-18

Tại vị trí 2 (bảng 2), phát hiện 4 điểm pharmacophore Lys253 (F1: Ani), Ala301 (F2: Hyd), Tyr248 (F3: Don), Trp249 (F4: Acc). Kết quả có 4 điểm bắt buộc là F1: Ani, F2: Hyd, F3: Don, F4: Acc, điểm F5 còn lại không thiết lập ràng buộc. Mô hình yêu cầu thỏa mãn ít nhất 4 điểm. Tiến hành giống hàng ở vị trí 2 (hình 3).

Bảng 2. Tương tác giữa các acid amin quan trọng của IL-18/ IL-18Rα tại vị trí 2

Acid amin trên IL-18	Tương tác	Acid amin trên IL-18Rα
	(+) cầu muối (-)	
Lys53	(cho) Liên kết hydro (nhận)	Glu253
	(cho) Liên kết hydro (nhận)	Trp249
Met60	Kỵ nước	Ala301

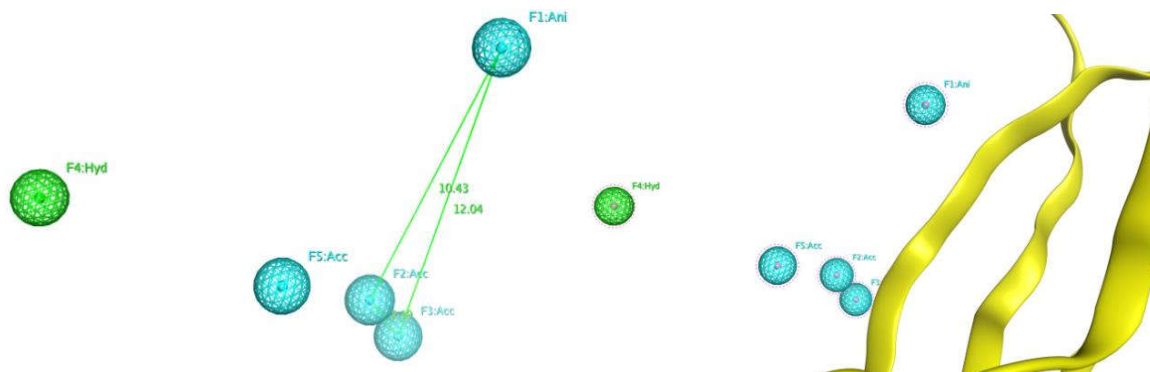


Hình 3. Mô hình A2 và sự giống hàng mô hình A2 lên IL-18

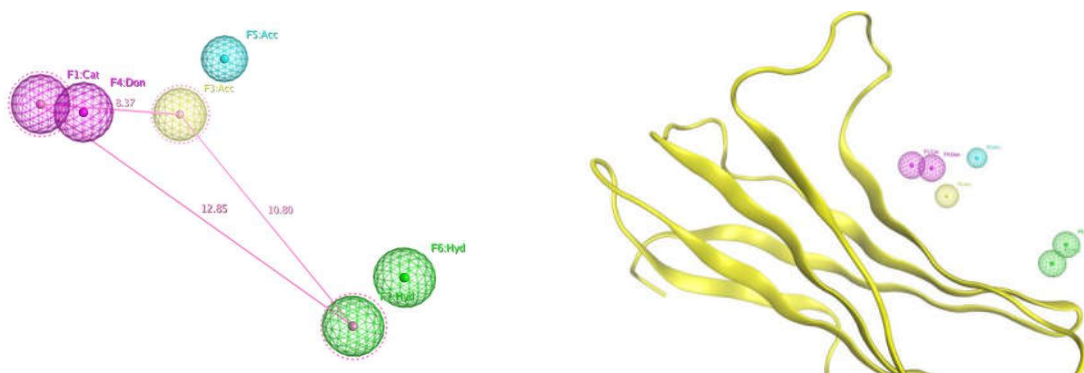
Các mô hình pharmacophore cho chất gắn kết IL-18 α

Tại vị trí 1 (bảng 1) cho mô hình D1 và vị trí 2 (bảng 2) cho mô hình D2. Nhận thấy ở vị trí 1 (mô hình D1) có 4 điểm pharmacophore: Asp17 (*F1: Ani*), Asp35 (*F2: Acc, F3: Acc*), Met33 (*F4: Hyd*). Kết quả thu được mô hình D1 có 5 điểm được thiết lập ràng buộc thỏa mãn ít nhất 4 điểm. Tiến hành giống hàng mô hình ở vị trí 1 (hình 4). Tương tự vị trí 1, ở vị trí 2 cũng có 4 acid amin tạo liên kết với IL-18 α là Lys53,

Met60, Asp54, Ser105 nhưng Ser105 cho điểm gắn kết cách xa so với điểm gắn kết của Lys53 (> 20Å), Asp54 chỉ cho 1 điểm gắn kết quay về phía khoang. Do đó, xuất hiện 6 điểm pharmacophore gồm Lys53 (*F1: Cat, F4: Don*), Met 60 (*F2: Hyd, F6: Hyd*), Asp54 (*F3: Acc, F5: Acc*). Mô hình có 3 điểm bắt buộc là *F1: Cat, F2: Hyd, F3: Acc*; 3 điểm còn lại thiết lập ràng buộc thỏa mãn ít nhất 2 điểm. Mô hình yêu cầu thỏa mãn ít nhất 5 điểm. Tiến hành giống hàng ở vị trí 2 (hình 5).



Hình 4. Mô hình D1 và sự giống hàng mô hình D1 lên IL-18 R α

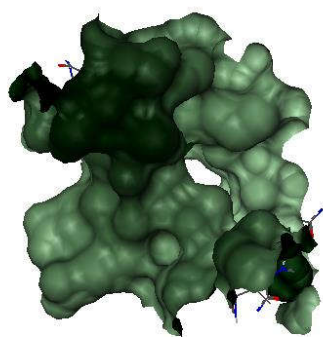


Hình 5. Mô hình D2 và sự giống hàng mô hình D2 lên IL-18 R α

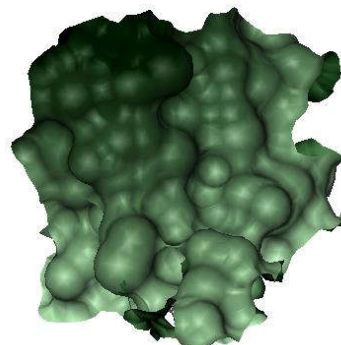
Các mô hình mô tả phân tử docking

Các mô hình mô tả phân tử docking chất gắn kết IL-18: Tại hai vị trí 1 (mô hình Do-A1) và vị trí 2 (mô hình Do-A2). Tại vị trí 1, dùng các acid amin Lys51, Asp54, Met60 cho các khoang

gắn kết lõm sâu, bề mặt gồ ghề và vị trí nhô cao (hình 6). Khác với vị trí 1, vị trí 2 dùng các acid amin Lys53, Asp54, Met60 và cho các khoang gắn kết có bề mặt gồ ghề hơn so với mô hình Do-A1 (hình 7).



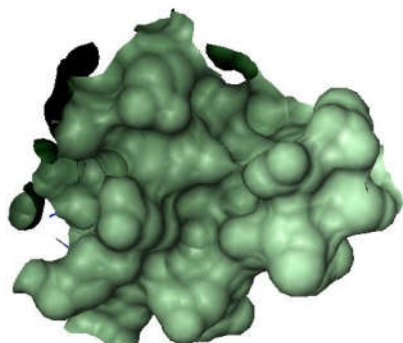
Hình 6. Mô hình mô tả phân tử docking Do-A1



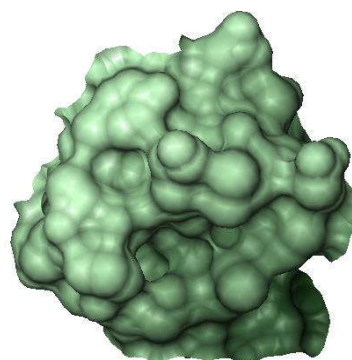
Hình 7. Mô hình mô tả phân tử docking Do-A2

Các mô hình mô tả phân tử docking chất gắn kết IL-18R α : Tương tự như chất gắn kết IL-18 cũng ở hai vị trí 1, 2 tương ứng với mô hình Do-D1 và Do-D2. Tại vị trí 1, các acid amin tạo khoang là Asp17, Asp35, Met33 (hình 8) còn tại vị trí 2 là Tyr248, Trp249, Glu253, Ala301

(hình 9). Kết quả cho thấy các khoang gắn kết Do-D2 có bề mặt gồ ghề, có nhiều rãnh sâu, nhiều chỗ nhô cao, là những vị trí gắn kết của IL-18 và thụ thể IL-18 R α có tiềm năng ức chế IL-18.



Hình 8. Mô hình mô tả phân tử docking Do-D1



Hình 9. Mô hình mô tả phân tử docking Do-D2

Kết quả sàng lọc ảo

Sau khi sàng lọc cơ sở dữ liệu 147.158 cấu trúc bằng các mô hình pharmacophore

và mô hình mô tả phân tử docking ở 2 vị trí (bảng 3) cho thấy số chất thành công tại vị trí 1 cao hơn vị trí 2.

Bảng 3. Tóm tắt kết quả sàng lọc các chất gắn kết IL-18

	Mô hình	Sàng lọc pharmacophore	Docking thành công
Vị trí 1	Do-A1	35	30
	Do-D1	131	123
Vị trí 2	Do-A2	34	26
	Do-D2	47	37

Sàng lọc các chất gắn kết tại vị trí 1

Sàng lọc qua mô hình Do-A1: Kết quả sàng lọc qua pharmacophore thu được 10 chất từ ngân hàng thuốc, 25 chất từ các thư viện mảnh cấu trúc thỏa mãn mô hình, chiếm 0,02 % tập cơ sở dữ liệu. Bên cạnh đó, kết quả sàng lọc qua mô hình Do-A1 thu được 30 chất docking thành công và 5 chất docking không thành công (là các chất từ thư viện mảnh). Trong 30 chất docking thành công, có 11 chất có điểm số docking tốt (< -20 kJ/mol), chất có điểm số docking âm tốt nhất là $-27,47$ kJ/mol. Các chất liên kết tốt với mô hình D1 đều tạo được tương tác với 1 trong 4 acid amin quan trọng trong khoang gắn kết là Arg25, Gln124, Ser127 và Lys128 thông qua liên kết hydro, cầu muối.

Sàng lọc qua mô hình Do-D1: Kết quả khi sàng lọc qua pharmacophore thu được 59 chất từ ngân hàng thuốc, 72 chất từ các thư viện mảnh cấu trúc thỏa mô hình, chiếm 0,09 % tập cơ sở dữ liệu. Tiến hành sàng lọc qua mô hình Do-D1, thu được 123 chất docking thành công với khoang gắn kết gồm các acid amin quan trọng là Asp17, Met 33, Asp35 thông qua liên kết hydro, cầu muối.

Sàng lọc các chất gắn kết IL-18 tại vị trí 2

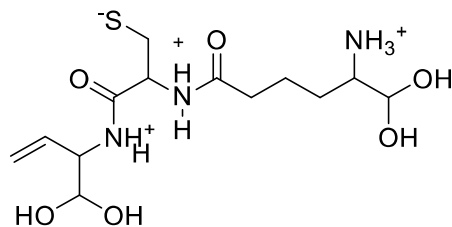
Sàng lọc qua mô hình Do-A2: Sàng lọc qua pharmacophore thu được 17 chất từ ngân hàng thuốc và 17 chất từ các mảnh cấu trúc thỏa mãn mô hình, chiếm 0,05 % tập cơ sở dữ liệu. Kết quả sàng lọc qua mô hình docking thu được 26 chất docking thành công và 8 chất docking không thành công (4 chất từ ngân hàng thuốc, 4 chất từ thư viện mảnh). Tại vị trí 2 có số acid amin được lựa chọn tạo điểm gắn kết ít (3 acid amin). Do đó, số điểm có khả năng tạo mô hình pharmacophore có thể không mang tính chọn lọc cao như ở vị trí 1. Kết quả điểm số docking ở vị trí 2 không cao như ở vị trí 1, số chất docking không thành công cũng cao hơn so với vị trí 1. Trong 26 chất docking thành công, phát hiện 10 chất tiềm năng có khả năng gắn kết tốt trên vị trí 2 của IL-18, có 8 chất tạo tương tác

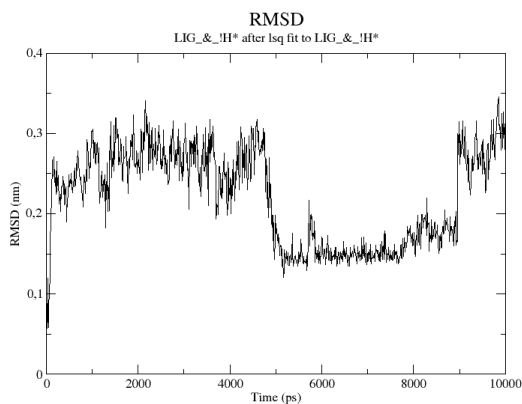
với 2 trong 3 acid amin. Trong đó, Glu253 và Trp249 là 2 acid amin tương tác với IL-18 qua Lys53. Lys53 là acid amin quan trọng trong gắn kết với IL-18R α và IL-18BP.

Sàng lọc qua mô hình Do-D2: Sàng lọc qua pharmacophore thu được 35 chất từ thư viện các mảnh cấu trúc thỏa mãn mô hình, chiếm 0,02 % tập cơ sở dữ liệu. Kết quả của quá trình sàng lọc qua mô hình Do-D2 thu được 37 chất docking thành công trong đó 10 chất đứng đầu mô hình Do-D2 đều tạo được tương tác với các acid amin quan trọng trong khoang gắn kết là Lys53, Asp54, Met60 chủ yếu qua liên kết hydro và kỵ nước.

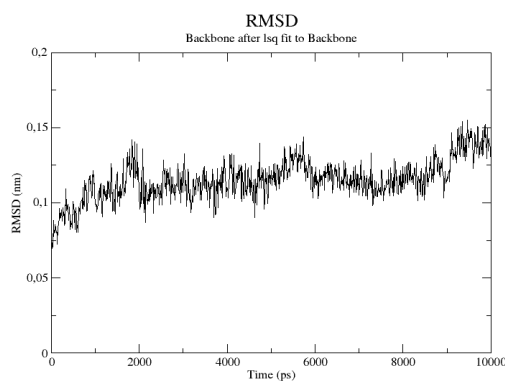
Mô phỏng động học phân tử

Chọn chất có cấu trúc DB02025 là chất có điểm số docking âm nhất và tạo được tương tác với 3 acid amin quan trọng của IL-18 (Asp17, Met33, Asp35) bằng 3 cầu muối và 6 liên kết hydro (Don). Tiến hành khảo sát trong 10 ns cho 2 giá trị RMSD dùng đánh giá sự gắn kết của ligand với protein (hình 10). Trong thời gian khảo sát phức hợp protein-ligand, nhận thấy protein ổn định nhưng ligand chỉ ổn định trong 5 - 7 ns (biên độ dao động tăng lên $> 0,2$ nm). Sau khi xét giá trị RMSF, các nguyên tử trong cấu trúc ligand chưa ổn định khi tương tác với protein. Với các giá trị RMSD, RMSF thu được cho thấy DB02025 có khả năng gắn kết với IL-18 nhưng chưa đạt độ ổn định cao trong khoang gắn kết do cấu trúc gấp khúc ở vị trí 1, có nhiều tương tác cầu muối.





a. RMSD của protein



b. RMSD của ligand

Hình 10. Cấu trúc hóa học DB02025 và giá trị RMSD của protein và ligand trong phức hợp

Kết luận

IL-18 có vai trò quan trọng trong phản ứng miễn dịch của cơ thể chống lại các tác nhân gây nhiễm trùng. Mục tiêu nghiên cứu thuốc điều trị các bệnh lý liên quan đến đáp ứng miễn dịch là ức chế hoạt tính sinh học của IL-18 dựa trên tương tác IL-18/IL-18R α . Nghiên cứu thu được 4 mô hình 3D-pharmacophore (A1, D1, A2, D2) và 4 mô hình mô tả phân tử docking (Do-A1, Do-A2, Do-D1, Do-D2). Từ đó sàng lọc cơ sở dữ liệu gồm 147.158 cấu trúc từ ngân hàng thuốc và các thư viện mảnh cấu trúc thu được kết quả: Mô hình A1 thu được 35 chất, trong đó có 30 chất thỏa mãn mô hình Do-A1. Mô hình A2 thu được 34 chất, trong đó có 26 chất thỏa mãn mô hình Do-A2. Mô hình D1 thu được 131 chất, trong đó có 123 chất thỏa mãn mô hình Do-D1. Mô hình D2 thu được 35 chất, trong đó có 30 chất thỏa mãn mô hình Do-D2. Bên cạnh đó phát hiện chất DB02025 có tiềm năng gắn kết với IL-18 ở vị trí 1 nhưng độ ổn định trong quá trình gắn kết chưa cao. Để đạt được bước tiến lớn hơn trong việc tìm ra chất có cấu trúc phân tử nhỏ có khả năng ức chế hoạt tính IL-18 nên thực hiện mô phỏng động học phân tử cho các chất tiềm năng thỏa mãn các mô hình trong nghiên cứu và dựa trên kết quả mô phỏng động học phân tử, chọn ra các chất có tiềm năng tiến hành thử nghiệm *in vitro*.

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.05-2018.15.

Tài liệu tham khảo

1. S. Lebel-Binay, et al. (2000), *Eur. Cytokine. Netw.*, 11, pp. 15–26.
2. K. K.Washburn, et al. (2008), *Nephrology Dialysis Transplantation.*, 23, pp. 566–572.
3. M. Trøseid, et al. (2010), *Cardiovasc Diabetol.*, 9, pp. 11.
4. S. Wawrocki, et al. (2016), *Acta. Biochim. Pol.*, 63, pp. 59–63.
5. M. Esmailbeig, et al. (2017), *Eur. Cytokine. Netw.*, 28, pp. 127–140
6. H. Wei, et al. (2014), *FEBS. Lett.*, 588, pp. 3838–3843.
7. K. Vanommeslaeghe, et al. (2010), *J. Comput. Chem.*, 31, pp. 671–690
8. V. Zoete, et al. (2011), *J. Comput. Chem.*, 32, pp. 2359–2368.