

TIẾP CẬN *IN SILICO* PHÁT HIỆN CHẤT ỨC CHẾ PROTEIN KINASE G CHO ĐIỀU TRỊ BỆNH LAO

Thái Khắc Minh^{1,2,3*}, Trần Thị Phương Uyên^{1,2,3}, Nguyễn Đắc Nhân^{1,2,3},
Dương Nguyên Thuý Ngân^{1,2,3}, Nguyễn Thuý Ngọc⁴, Nguyễn Hạ Anh⁶,
Đông Ngọc Thiên Trúc², Nguyễn Minh Tiến⁵, Lê Minh Trí^{1,2,3}

¹Trường Đại học Khoa học Sức khỏe, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

²Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Sản phẩm chăm sóc sức khỏe,
Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

⁴Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

⁵Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

⁶Đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford

TÓM TẮT

Protein kinase G (PknG) là một yếu tố độc lực của *Mycobacterium tuberculosis*, hỗ trợ hoạt động chống thực bào trong quá trình nhiễm trùng. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu trước đây, chỉ một số ít chất ức chế được báo cáo và chưa có chất nào phát triển đến giai đoạn thử nghiệm lâm sàng. Nghiên cứu này được áp dụng một quy trình sàng lọc *in silico* toàn diện nhằm xác định các chất ức chế PknG mới với khung hóa học đa dạng. Các mô hình 3D-pharmacophore dựa trên cấu trúc và dựa trên phối tử đã được phát triển, nhưng chỉ mô hình dựa trên cấu trúc đáp ứng yêu cầu sàng lọc. Khoảng 22 triệu hợp chất từ cơ sở dữ liệu DrugBank và ZINC15 đã được sàng lọc, tiếp theo là các bước dự đoán dược động học – độc tính (ADMET), docking phân tử, mô phỏng động lực học phân tử (MD) và tính toán năng lượng tự do liên kết. Từ 2.865 hợp chất, có 2.557 hợp chất vượt qua đánh giá ADMET. Kết quả docking chọn ra 55 ligand để mô phỏng MD, có 9 chất được tiếp tục mô phỏng ở 100 ns. Ba hợp chất – ZINC39895235, ZINC78670958 và ZINC67776115 – là tiềm năng nhất, thể hiện khả năng gắn kết bền vững thông qua nhóm cho/nhận liên kết hydro và vòng kỵ nước. Nghiên cứu này đã xây dựng thành công một quy trình sàng lọc ảo hợp lý và xác định được các ứng viên tiềm năng cho việc kiểm chứng sinh học tiếp theo đối với PknG.

Từ khoá: Protein kinase G, *in silico*, sàng lọc ảo, động lực học phân tử.

Chịu trách nhiệm: Thái Khắc Minh

Email: tkminh@uhsvnu.edu.vn

Ngày nhận: 08/8/2025

Ngày phản biện: 20/8/2025

Ngày duyệt bài: 26/9/2025

IN SILICO IDENTIFICATION OF PROTEIN KINASE G INHIBITORS FOR TUBERCULOSIS THERAPY

SUMMARY

Protein kinase G (PknG) is a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis* that supports anti-phagocytic activity during infection. Despite prior research, only a few inhibitors have been reported and none progressed to clinical trials. This study applied a comprehensive *in silico* workflow to identify novel PknG inhibitors with diverse scaffolds. Structure-based and ligand-based 3D-pharmacophore models were developed, but only the structure-based model met validation criteria for screening. Approximately 22 million compounds from DrugBank and ZINC15 were screened, followed by ADMET filtering, molecular docking, molecular dynamics simulations, and binding free energy calculations. From 2,865 initial hits, 2,557 compounds passed ADMET evaluation. Docking shortlisted 55 ligands, with nine advanced to 100 ns MD simulations. Three compounds - ZINC39895235, ZINC78670958, and ZINC67776115 - emerged as top candidates, displaying stable binding through hydrogen bond donors/acceptors and hydrophobic rings. This study established a rational virtual screening protocol and identified promising leads for further biological validation against PknG.

Keywords: Protein kinase G, *in silico*, virtual screening, molecular dynamics simulations.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lao là bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* tiến triển mạn tính, gây ra nhiều ảnh hưởng trực tiếp đến phổi và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên thế giới. Vi khuẩn *M. tuberculosis* xâm nhập vào cơ thể chủ yếu qua đường hô hấp. Khi đến phổi, chúng sẽ bị bắt giữ bởi các đại thực bào phế nang sau đó chuyển vào môi trường phân hủy của lysosom. Tuy nhiên, *M. tuberculosis* vẫn tồn tại trong môi trường diệt khuẩn của đại thực bào thông qua sự phóng thích protein kinase G (PknG), một trong 11 serin/threonin protein kinase (STPK), vào bào tương.^[1,4] Chính cơ chế này đã gây ra sự ức chế phản ứng tổng hợp phagosome - lysosom và làm trung gian cho sự tồn tại nội bào của vi khuẩn. Do đó, chất ức chế PknG trở thành đối tượng nghiên cứu quan trọng nhằm hỗ trợ đại thực bào tiêu hủy *M. tuberculosis*, nhất là trong bối cảnh các thuốc điều trị lao hiện nay chủ yếu đều can thiệp vào quá trình sinh lý của vi

khuẩn.^[1,5,6] Nghiên cứu sàng lọc ảo các hợp chất tiềm năng ức chế protein kinase G trong điều trị bệnh lao bằng mô hình 3D-pharmacophore, docking và mô phỏng động lực học phân tử được thực hiện nhằm mục tiêu nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất thuốc tiềm năng ức chế PknG ở mức độ phân tử bằng sự hỗ trợ của máy tính.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu thực hiện xây dựng và đánh giá 2 mô hình 3D-pharmacophore dựa trên cấu trúc (SBP) và dựa trên phối tử (LBP) bằng phần mềm MOE 2022.2. Sau đó, các tập cơ sở dữ liệu (CSDL) ZINC15 (<http://zinc15.docking.org>) và DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) đã được sàng lọc lần lượt qua mô hình LBP và SBP đã xây dựng. Các chất thỏa 2 mô hình này tiếp tục được đánh giá các đặc tính dược động học bằng phần mềm ADMET Predictor 10.4. Cuối cùng nghiên cứu tiến hành docking bằng phần mềm AutoDock Vina 1.1.2 những

hợp chất với một số mục tiêu trung tâm đã xác định ở mạng lưới dược lý, mô phỏng động lực học phân tử trên phần mềm GROMACS 2023.1. Từ đó, đưa ra kết luận về các chất ức chế hoạt tính PknG tiềm năng lên mục tiêu vi khuẩn *M.tuberculosis*.

2.1. Cơ sở dữ liệu

AX20017 là chất đầu tiên được báo cáo có hoạt tính ức chế PknG *in vitro* thông qua việc ức chế cạnh tranh vị trí gắn kết ATP ($IC_{50} = 0,39 \mu M$).^[6] Nghiên cứu đã tổng hợp được thêm 44 chất ức chế PknG có giá trị IC_{50} có chứng đối chiếu AX20017. Từ giá trị IC_{50} của AX20017, nghiên cứu chia các chất thành 2 tập dữ liệu dùng cho đánh giá mô hình pharmacophore: tập hoạt tính chứa 11 chất có IC_{50} thấp hơn AX20017 và tập không có hoạt tính gồm các chất còn lại. Cấu trúc đồng kết tinh protein PknG và chất ức chế AX20017 được chụp bằng phương pháp nhiễu xạ tia X với độ phân giải 2,4 Å sẽ được lấy từ ngân hàng dữ liệu Protein Data Bank (mã pdb: 2PZI).^[4]

2.2. Xây dựng mô hình 3D-pharmacophore

Đối với mô hình 3D-pharmacophore dựa vào phối tử, 3 chất từ tập có hoạt tính có khung cấu trúc khác nhau được chọn làm tập xây dựng. Bên cạnh đó, tương tác giữa chất đối chiếu AX20017 và PknG trong cấu trúc đồng kết tinh sẽ được dùng để xây dựng mô hình 3D-pharmacophore dựa vào cấu trúc. Các mô hình xây dựng từ 2 phương pháp sẽ được đánh giá qua các thông số độ nhạy (Se), độ đặc hiệu (Sp) và độ đúng (Acc) thông qua tập có hoạt tính và tập không có hoạt tính.

2.3. Đánh giá dược động học (ADMET)

Nghiên cứu sử dụng phần mềm ADMET Predictor 10.4 để đánh giá các đặc tính dược động học của những chất thỏa 2 mô hình 3D-pharmacophore thông qua mô hình rủi ro ADMET_risk là tổng của 3 mô hình rủi ro nhỏ hơn: hấp thu (Absn_Risk), chuyển hóa (CYP_Risk) và độc tính (TOX_Risk). Bảng 1 trình bày ngưỡng rủi ro của từng mô hình.

Bảng 1. Ngưỡng rủi ro của các mô hình

Rủi ro ADMET tổng (ADMET_risk)	Rủi ro hấp thu (Absn_Risk)	Rủi ro chuyển hóa (CYP_Risk)	Rủi ro độc tính (TOX_Risk)
7	4	2	2

2.4. Gắn kết phân tử (docking)

Nghiên cứu tiến hành docking bằng phần mềm AutoDock Vina 1.1.2 dựa trên các acid amin quan trọng ở khoang gắn kết của PknG và chất ức chế đồng kết tinh AX20017 được báo cáo bởi Scherr và cộng sự, bao gồm: Ile87, Ala92, Ile157, Ala158, Ile165, Val179, Lys181, Met232, Glu233, Tyr234, Val235, Gly236, Met283, Ile292 và Asp293.^[4] Các chất được đánh giá là tiềm năng cho bước tiếp theo dựa trên 2 tiêu chí: điểm số docking tốt hơn (thấp hơn) so với chất đối

chiếu AX20017 và khả năng tương tác của chất với 15 acid amin quan trọng trong khoang gắn kết nhiều hơn so với AX20017 thông qua công cụ trực tuyến PLIP (<https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>).

2.5. Mô phỏng động lực học phân tử (MDs)

Sau khi docking, các chất tiềm năng được tiến hành mô phỏng động lực học phân tử bằng phần mềm GROMACS 2023.1.^[2, 3] Nghiên cứu sử dụng trường lực

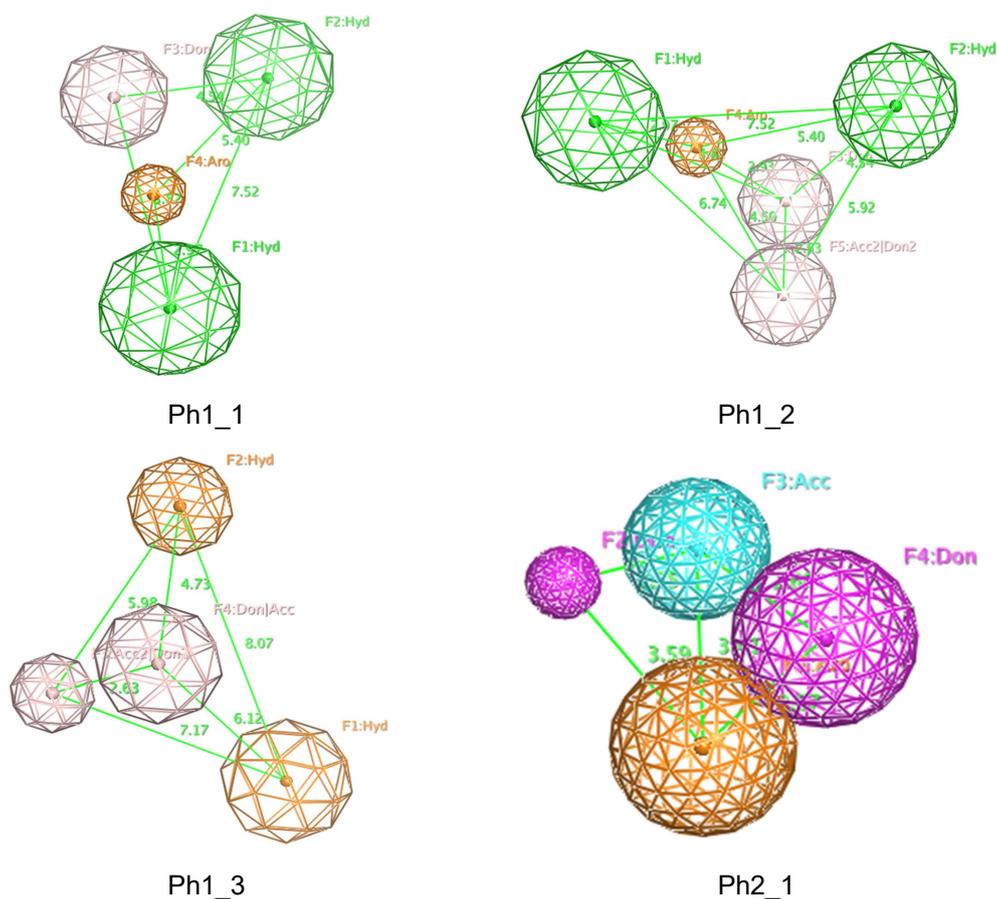
CHARMM27 với mô hình nước TIP3P vào hộp đa giác 12 mặt có khoảng cách từ tâm protein đến các bề mặt của hộp là 1nm. Sau đó, hệ được trung hòa điện tích bằng các ion và tiến hành tối thiểu hóa năng lượng trong thời gian 100 ps với nhiệt độ 300K và áp suất 1 bar (0,987 atm). Quá trình mô phỏng diễn ra trong 20 ns để theo dõi sự ổn định của protein PknG với các phối tử tiềm năng. Độ ổn định của phức hợp PknG với các chất tiềm năng được đánh giá qua giá trị căn bậc hai độ lệch trung bình bình phương (RMSD), bán kính

quay (Rg) và diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi (SASA).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Mô hình 3D-pharmacophore

Đối với mô hình 3D-pharmacophore dựa vào phối tử, nghiên cứu xây dựng được 3 mô hình dựa trên những điểm truy vấn mà phần mềm MOE 2022.2 đề xuất (hình 1). Trong đó, nghiên cứu đã đánh giá và lựa chọn mô hình Ph1_1 gồm 4 điểm F1 và F2 (Hydrophobic), F3 (Don), F4 (Aro) cho kết quả tốt nhất do các giá trị độ nhạy, độ đặc hiệu và độ đúng đều trên 0,7.



Hình 1. Các mô hình pharmacophore dựa trên phối tử và cấu trúc

Mô hình 3D-pharmacophore Ph2_1 4 điểm F1 (Aro), F2 (Don), F3 (Acc) và F4 (Don) (hình 1). Kết quả đánh giá của cả 2 chế AX20017 với các acid amin quan trọng của PknG gồm Val235, Glu233, Ile292 với mô hình LBP và SBP được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Đánh giá 3 mô hình pharmacophore xây dựng được từ phối tử và mô hình pharmacophore 4 điểm xây từ cấu trúc protein

Mô hình	TA	TD	Ha	Ht	Độ nhạy (Se)	Độ đặc hiệu (Sp)	Độ đúng (Acc)
Ph1_1	9	459	7	139	0,78	0,71	0,71
Ph1_2	9	459	5	83	0,56	0,83	0,82
Ph1_3	9	459	6	271	0,67	0,41	0,42
Ph2_1	11	561	11	54	1,00	0,92	0,92

(TA: số chất có hoạt tính, TD: tổng số chất đánh giá mô hình, Ha: số chất có hoạt tính thỏa mô hình, Ht: số chất thỏa mô hình)

Sau quá trình sàng lọc qua hai mô hình pharmacophore, số chất thỏa cả hai mô hình từ tập Drugbank và ZINC15 lần lượt là 7 và 28.245 chất. Sau khi xóa trùng lặp và lọc thêm qua phễu lọc "Luật 5-Lipinski" cho các phân tử làm thuốc đường uống đối với các chất từ tập ZINC15, có 24.473 chất thỏa các yêu cầu. Kết quả chi tiết được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả sàng lọc qua 2 mô hình Ph1_1 và Ph2_1 bằng 2 thư viện ZINC15 và DrugBank

Tập CSDL	Số chất ban đầu	Số chất thỏa mô hình Ph1_1	Số chất thỏa mô hình Ph2_1	Số chất sau khi xóa trùng lặp và luật 5-Lipinski*
DrugBank	2.125	483	7	7
ZINC	12.921.916	3.705.356	28.245	24.473
Tổng cộng				24.480

*Chỉ tiến hành đối với CSDL ZINC15

3.2. Đánh giá ADMET

Sau khi sàng qua 2 mô hình pharmacophore, các chất thỏa mô hình tiếp tục được đánh giá các đặc tính dược động học nhằm dự đoán các rủi ro hấp thu, chuyển hóa và độc tính. Kết quả thu được 21.208 chất thỏa cả 4 ngưỡng rủi ro (bảng 4) và được sử dụng cho các bước sàng lọc tiếp theo.

Bảng 4. Kết quả sàng lọc ADMET

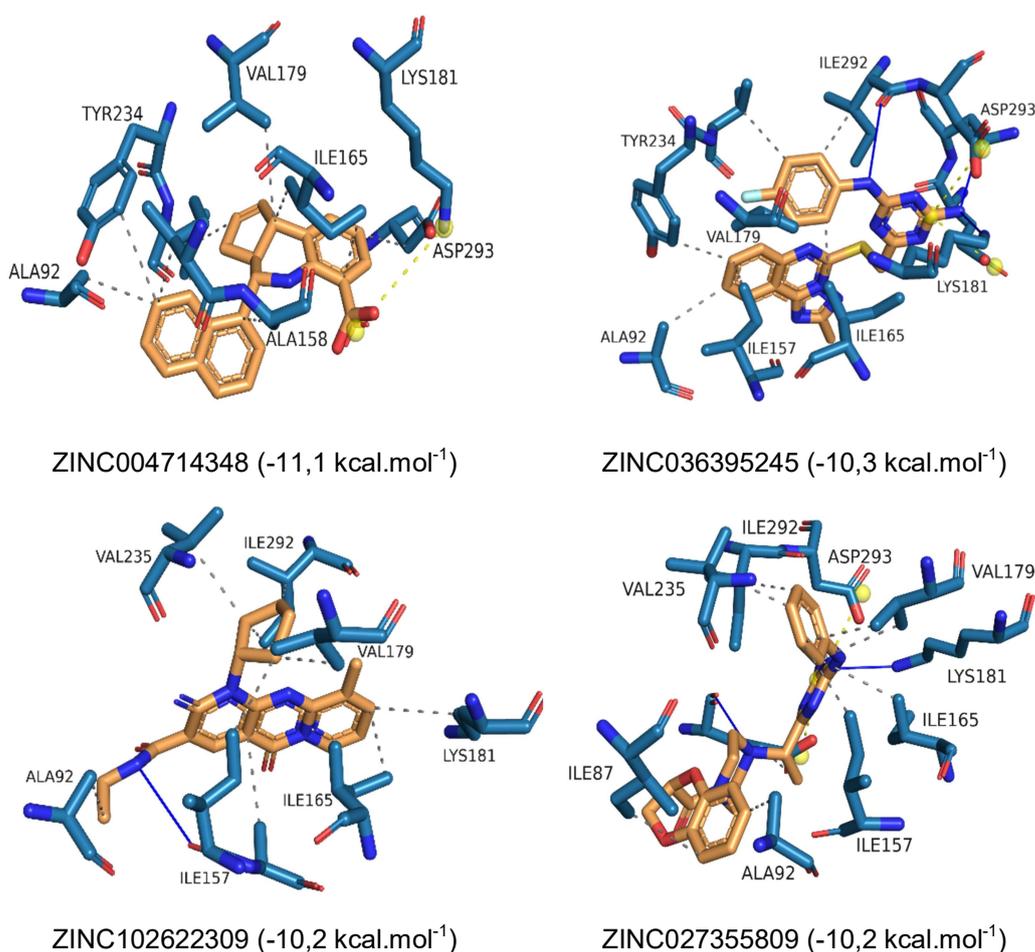
Tập dữ liệu	Số chất thỏa ngưỡng rủi ro				Số chất thỏa cả 4 ngưỡng
	ADMET tổng ≤ 7	Hấp thu ≤ 4	Chuyển hóa ≤ 2	Độc tính ≤ 2	
ZINC15 (24.473 chất)	23.993	24.334	22.541	23.175	21.202
DrugBank (7 chất)	7	7	7	6	6
Tổng cộng					21.208

3.3. Docking phân tử

Kết quả docking cho thấy có 21.205 chất gắn kết thành công vào khoang (chiếm 99,98%). Điểm số docking của tập ZINC15 dao động trong khoảng từ $-4,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ đến $-12 \text{ kcal.mol}^{-1}$, của tập DrugBank từ $-7,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ đến $-8,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Điểm số docking của chất đối chiếu AX20017 với protein PknG trong khoang gắn kết là $-10 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Do đó, các hợp chất được lựa chọn phân tích PLIP

là các hợp chất có điểm số docking dưới $-10 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Kết quả cho thấy có 12 chất từ tập ZINC15 hình thành tương tác với nhiều hơn 6/15 acid amin quan trọng, tương đồng với mô thức gắn kết của chất đối chiếu AX20017. Vì thế, nghiên cứu tiến hành mô phỏng động lực học phân tử với 12 chất này.

Hình 2 trình bày tương tác của 4 chất tạo được nhiều tương tác nhất trong khoang gắn kết PknG.



Hình 2. Các chất có nhiều tương tác với acid amin quan trọng nhất

3.4. Mô phỏng động lực học phân tử (MDs)

Cuối cùng, nghiên cứu thực hiện mô phỏng động lực học phân tử đối với các phức hợp được lựa chọn trong 20 ns. Độ ổn

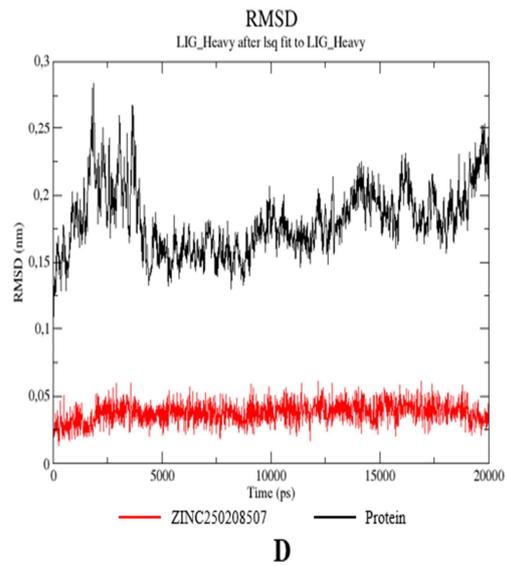
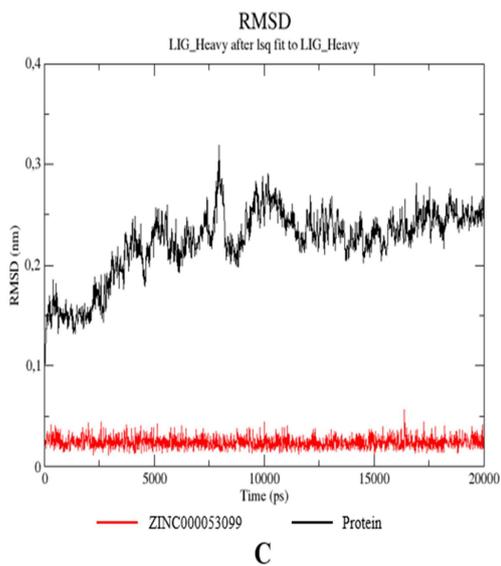
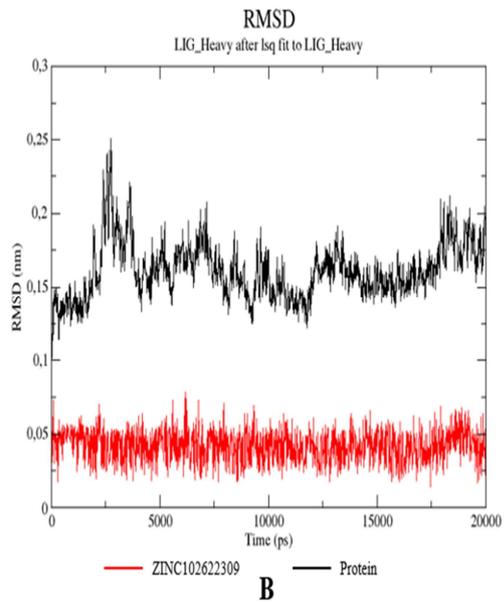
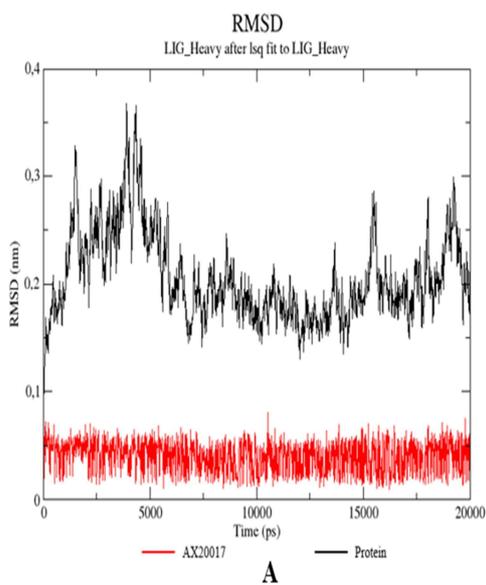
định của các cấu trúc trong quá trình mô phỏng được đánh giá thông qua giá trị RMSD của protein và phối tử, gyrate Rg và SASA. Các giá trị trung bình được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả các giá trị RMSD, Rg và SASA của chất đối chiếu và 12 phối tử

STT	Tên chất	RMSD của protein	Rg	SASA	RMSD của phối tử
0	AX20017	0,21 ± 0,04	2,05 ± 0,03	187,29 ± 1,51	0,04 ± 0,01
1	ZINC004714348	0,19 ± 0,03	2,03 ± 0,01	188,62 ± 1,39	0,07 ± 0,03
2	ZINC036395245	0,18 ± 0,02	2,05 ± 0,01	186,26 ± 1,36	0,13 ± 0,04
3	ZINC102622309	0,16 ± 0,02	2,03 ± 0,02	187,59 ± 1,27	0,04 ± 0,01
4	ZINC027355809	0,18 ± 0,03	2,05 ± 0,01	187,24 ± 1,37	0,16 ± 0,02
5	ZINC100627865	0,17 ± 0,02	2,04 ± 0,01	186,70 ± 1,31	0,11 ± 0,03
6	ZINC769288392	0,21 ± 0,03	2,03 ± 0,02	187,62 ± 1,25	0,20 ± 0,07
7	ZINC009870789	0,27 ± 0,04	2,09 ± 0,03	187,81 ± 1,53	0,06 ± 0,01
8	ZINC000053099	0,22 ± 0,03	2,02 ± 0,02	186,5 ± 1,27	0,02 ± 0,01
9	ZINC762230069	0,18 ± 0,02	2,04 ± 0,01	186,86 ± 1,26	0,26 ± 0,05
10	ZINC250208507	0,18 ± 0,03	2,04 ± 0,02	186,82 ± 1,49	0,04 ± 0,01
11	ZINC012469299	0,19 ± 0,03	2,05 ± 0,02	188,62 ± 1,54	0,15 ± 0,02
12	ZINC013131592	0,17 ± 0,02	2,03 ± 0,01	187,05 ± 1,24	0,07 ± 0,02

Trừ phức hợp của chất ZINC009870789 có giá trị RMSD protein và biên độ dao động khá lớn, giá trị RMSD của protein trong phức hợp với các phối tử còn lại tương đối thấp hơn so với phức hợp của chất đối chiếu AX20017. Điều này dự đoán độ ổn định của chất ZINC009870789 trong khoang gắn kết là kém hơn so với các chất còn lại. Bên cạnh đó, giá trị Rg và SASA ở các phức hợp nhìn chung khá tương đồng với phức hợp của chất đối

chiếu. Khi xét đến độ ổn định của phối tử, nghiên cứu ghi nhận được 3 chất có giá trị RMSD phối tử nhỏ hơn giá trị ở chất đối chiếu là ZINC102622309, ZINC000053099, ZINC250208507. Đồng thời, biên độ dao động ở các chất này cũng rất nhỏ, cho thấy khả năng gắn ổn định trong khoang của các phối tử này là rất lớn. Biểu đồ giá trị RMSD của protein (màu đen) và của phối tử (màu đỏ) trong phức hợp của 3 chất tiềm năng được trình bày trong hình 3.

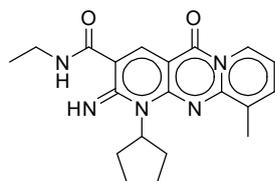


Hình 3. Biểu đồ giá trị RMSD của protein và của phối tử.

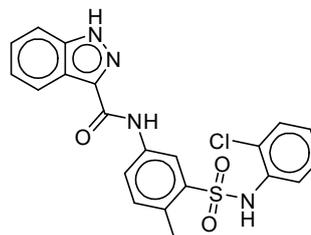
3.5. Bàn luận

Hướng tiếp cận mô hình pharmacophore dựa vào cấu trúc và dựa vào phối tử đã được thực hiện bởi 2 nhóm nghiên cứu khác

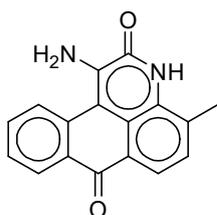
trên thế giới [1, 2]. Các chất tiềm năng của nghiên cứu này và các nghiên cứu trước đó về chất ức chế PknG được trình bày lần lượt trong hình 4 và hình 5.



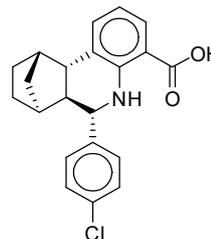
ZINC102622309



ZINC009870789



ZINC000053099

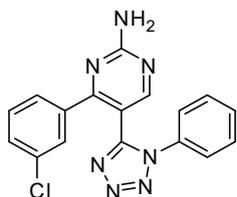


ZINC250208507

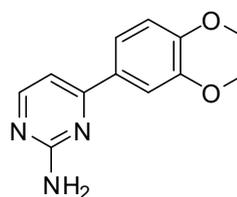
Hình 4. Các chất tiềm năng của nghiên cứu

Khi so sánh cấu trúc các chất có khả năng ức chế PknG ở kết quả của các nghiên cứu trước đây (hình 5), nhìn chung các chất này đều chứa khá nhiều vòng mà chủ yếu là các dị vòng nitơ. Điều này phù hợp với tính kỵ nước trong khoang gắn kết như Scherr và cộng sự đã công bố [4]. Các

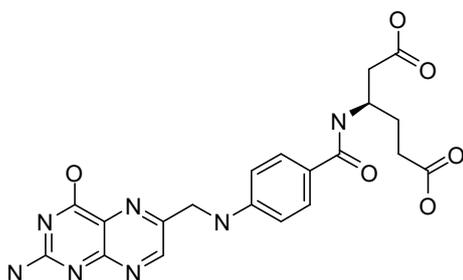
chất mà nghiên cứu tìm được cũng mang các đặc điểm tương tự. Dựa trên các kết quả khả quan đó, điều này đã gợi ý rằng việc kết hợp cả hai loại mô hình cũng là một hướng tiếp cận tiềm năng và tăng cường khả năng tìm được các chất có hoạt tính ức chế PknG.



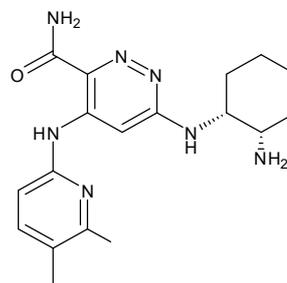
NRBO4248



FM00174



RH01440



RO9021

Hình 5. Các chất tiềm năng của nghiên cứu trước đây [1,2]

4. KẾT LUẬN

Từ hơn 12 triệu chất thuộc 2 thư viện hợp chất hoá học ZINC15 và DrugBank, nghiên cứu đã xây dựng và sàng lọc pharmacophore thu được 24.480 chất, sau đó đánh giá ADME còn 21.208 chất có đặc tính dược động học thích hợp. Tiếp theo, nghiên cứu tiến hành docking, lựa chọn được 12 chất có điểm số docking thấp hơn $-10 \text{ kcal.mol}^{-1}$ và tương tác với trên 6 acid amin quan trọng cho quá trình mô phỏng động lực học phân tử. Sau mô phỏng, các chất ZINC102622309, ZINC000053099, ZINC250208507 được đánh giá là có thể gắn ổn định trong khoang gắn kết. Đề tài đề nghị tiếp tục mô phỏng động lực học ở thời gian dài hơn và tính toán năng lượng liên kết tự do của phức hợp nhằm đánh giá sâu hơn về khả năng gắn kết cũng như độ ổn định của các chất tiềm năng. Đồng thời, các thử nghiệm *in vitro* cũng cần được thực hiện để khẳng định hoạt tính ức chế PknG của các chất này.

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh với đề tài NCM2024-44-01.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arica-Sosa A, et al. (2022), "Identifying RO9021 as a Potential Inhibitor of PknG from *Mycobacterium tuberculosis*:

Combinative Computational and *In Vitro Studies*", *ACS Omega*, 7(23), 20204 - 20218.

2. Mai T. T, et al. (2024), *The Journal of Physical Chemistry B*, 138(35), 8362 - 8375.

3. Phan T. V, et al. (2023), "Discovery of a novel AcrAB-TolC pump inhibitor using the multistep virtual screening, synthesis and biological evaluation of asymmetric imidazole-4, 5-dicarboxamide derivatives". *New Journal of Chemistry*, 47(45), 20718 - 20722.

4. Scherr N, et al. (2007), "Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 12151 - 12156.

5. Singh N, et al. (2015), "Identification of novel inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* PknG using pharmacophore based virtual screening, docking, molecular dynamics simulation, and their biological evaluation". *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(6), 1120 - 1129.

6. Walburger A, et al. (2004), "Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages", *Science*, 304(5678), 1800 - 1804.