

Nghiên cứu sàng lọc *in silico* các phân tử nhỏ có khả năng ức chế PD-L1

Đoàn Lê Thùy Trâm, Hoàng Tùng, Nguyễn Công Luận
Lê Minh Trí, Thái Khắc Minh*

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

Summary

Immunotherapy is a revolutionary in cancer treatment, especially in advanced stage, combined with radiotherapy and/or chemotherapy. PD-1/PD-L1 is an important checkpoint, has been applied in treatment and is being continued in clinical trial in the form of monoclonal antibodies in the recent years. However, the disadvantages of therapeutic antibodies may limit their applications due to immune-related adverse effects (irAEs), poor bioavailability and cost. Thus, inhibitors of the PD-1/PD-L1 by small molecules may be a promising alternative for cancer immunotherapy. We performed a five-point pharmacophore modeling to screen database libraries for substance targeting PD-L1. Then, an online ADME assessment on SwissADME helps to review physicochemical descriptors as well as to predict ADME parameters, pharmacokinetic properties, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Molecular docking study revealed that these 2668 substances have high binding affinity for the central cavity (docking scores ranged from -45.38 kJ/mol to -13.12 kJ/mol) All of them bind with residues Tyr56, Asp122 are the two most important roles in interaction between protein and ligand. The study recommended 7 potential substances conducting molecular dynamics simulation, free energy binding and invitro testing.

Keywords: PD-L1, immune checkpoint inhibitor, small-molecule inhibitors, cancer immunotherapy, virtual screening.

Đặt vấn đề

Hệ miễn dịch được xem như một hàng rào bảo vệ cơ thể khỏi các tác nhân gây bệnh cho cơ thể, đặc biệt trong bệnh lý ung thư. Sự gắn kết của PD-L1 (programmed death ligand) của tế bào ung thư với PD-1 (programmed death) của bạch cầu T bảo vệ các tế bào ác tính chống lại sự đào thải của hệ thống miễn dịch^[1]. Do đó, việc ngăn chặn PD-L1 hoặc PD-1 bằng kháng thể đơn dòng có thể làm mất tác dụng bảo vệ này và cho phép hệ thống miễn dịch nhắm vào các tế bào ác tính. Tuy nhiên, chúng vẫn có một số nhược điểm như thời gian bán hủy rất dài, tác dụng phụ liên quan đến miễn dịch (irAEs), tính thấm thấp, quá trình sản xuất phức tạp và chi phí điều trị quá cao^[2]. Tuy nhiên, hiện chưa thuốc phân tử nhỏ nào được ứng dụng trong điều trị, do đó việc nghiên cứu để tìm kiếm

phân tử nhỏ có khả năng ức chế các protein này là cần thiết. Bên cạnh đó, PD-L1 biểu hiện ở mức độ cao trong khối u và các tế bào miễn dịch sau khi tiếp xúc với các cytokine như interferon gamma nên các nghiên cứu tập trung khảo sát trên thụ thể này. Trên nhu cầu đó, các phương pháp sàng lọc ảo ra đời giúp giảm thời gian và chi phí của quá trình khám phá thuốc mới. Nghiên cứu *in silico* sàng lọc các chất có khả năng ức chế PD-L1 được tiến hành thực hiện với mục đích xây dựng mô hình 3D-pharmacophore, đánh giá dược động học ADME và mô hình mô tả phân tử docking từ tập cơ sở dữ liệu ZINC, MayBrigde HitCreator và ngân hàng thuốc DrugBank.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Cơ sở dữ liệu

Cấu trúc tinh thể phức hợp PD-L1 và ligand đồng kết tinh BMS-1001, được lấy từ ngân hàng dữ liệu Protein Data Bank (mã PDB: 5NIU). Đối tượng thử nghiệm của đề tài gồm 21.800.167 chất từ các cơ sở dữ liệu ZINC Purchasable (ZINC), MayBrigde HitCreator,

Chịu trách nhiệm: Thái Khắc Minh
Email: thaikhaclingh@ump.edu.vn
Ngày nhận: 25/9/2021
Ngày phản biện: 28/9/2021
Ngày duyệt bài: 25/10/2021

DrugBank. Vì ZINC là tập dữ liệu lưu trữ trực tuyến nên phải dùng công cụ ZINCPharmer để sàng lọc pharmacophore. Tất cả các cơ sở dữ liệu trên đều được đưa qua phần mềm MOE 2015.10 để xoá trùng lặp sau khi thực hiện sàng lọc trên mô hình pharmacophore. Đánh giá ADME được thực hiện trực tuyến bằng công cụ SwissADME. Các hợp chất thoả mãn các đánh giá này sẽ được dock vào mô hình mô tả phân tử docking nhằm tìm ra các chất tiềm năng nhất.

Phương pháp nghiên cứu

Quá trình sàng lọc các phân tử nhỏ có khả năng ức chế PD-L1 được thực hiện qua các giai đoạn: Xây dựng mô hình 3D-pharmacophore; Đánh giá ADME; Xây dựng mô hình mô tả phân tử docking

Xây dựng mô hình 3D-Pharmacophore

Mô hình 3D-pharmacophore được xây dựng bằng phương pháp dựa trên cấu trúc ligand (ligand-based). Từ những chất ức chế PD-L1 đã được công bố từ 5 bằng sáng chế [3-7], 10 chất có hoạt tính ức chế PD-L1 mạnh (giá IC₅₀ nhỏ hơn 10 nM) được chọn ra, xếp vào Tập xây dựng. Tập hợp dùng để đánh giá mô hình pharmacophore bao gồm hai tập: 58 chất có IC₅₀ tốt nhất (trong đó, bao gồm 10 chất xây dựng mô hình pharmacophore), gọi là tập hoạt tính và 259 chất có IC₅₀ chưa xác định, có tính chất đối lập với 10 chất ức chế mạnh trong tập xây dựng, được tạo bằng phần mềm DecoyFinder 2.0, gọi là tập không hoạt tính.

Đánh giá ADME

Các hợp chất sau khi được sàng lọc qua mô hình pharmacophore sẽ được chuyển thành danh pháp SMILES trong phần mềm MOE 2015.10 bằng cách chọn cột mol → File → Save as → Output: SMILES/Text (.txt). Tập .txt tạo thành chứa danh sách các hợp chất theo thứ tự tương ứng với tập dữ liệu gốc sẽ được sao chép lên cửa sổ SMILES của SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) [8] → chọn Run! để tiến hành đánh giá. Kết quả được tải về ở mục Retrieve Data → CSV và đưa vào Microsoft Excel để thực hiện sàng lọc bằng chức năng Filter. Các tiêu chí sàng lọc là: Không có vi phạm trong các mô hình PAINS, Brenk, Ghose (Amgen), Verber (GSK), Egan (Pharmacia) và Muegge (Bayer); mô hình BOILED-Egg và không ức chế tất cả 5 cytochrom có trong mô hình (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4).

Re-docking

Nhằm chứng minh độ tin cậy của quy trình docking, các ligand đồng kết tinh cần được re-docking vào khoang gắn kết với phối tử đã tối thiểu hóa năng lượng bằng công cụ Minimize Energy của phần mềm MOE 2015.10. Kết quả redocking bao gồm giá trị RMSD thể hiện khoảng cách giữa các cấu dạng của phối tử dock với ligand đồng kết tinh nguyên thủy và khả năng tái tạo liên kết với các acid amin quan trọng. Mô hình đáng tin cậy khi giá trị RMSD của ba trường hợp redocking không quá 2 Å [9].

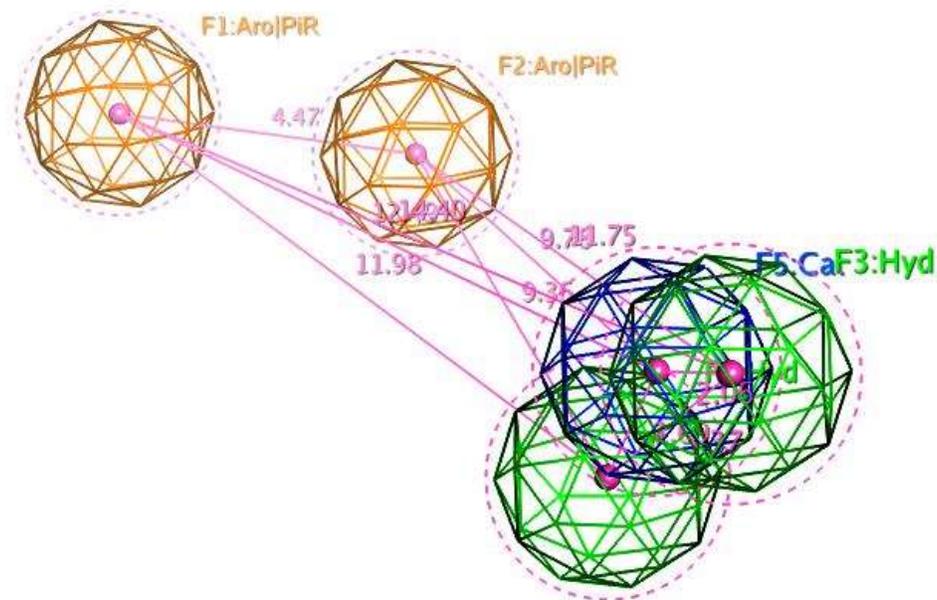
Xây dựng mô hình docking phân tử

Protein đã được chuẩn bị bằng MOE 2015.10 sẽ được tải lên LeadIT 2.1.8 để tiến hành docking. Đầu tiên, các vị trí quan trọng trong khoang gắn kết được lựa chọn bằng công cụ Define Binding Site. Sau đó từ vị trí hoạt động của protein mở rộng 6,5 Å xung quanh ligand đồng kết tinh. Quá trình docking được thực hiện bằng công cụ FlexX được tích hợp sẵn trong phần mềm LeadIT 2.1.8 và lưu kết quả là điểm số docking dưới dạng tệp *.sdf. Điểm số docking (đơn vị kJ/mol) thể hiện ái lực gắn kết phối tử - protein dựa trên mức độ tương thích với vị trí gắn kết tại đích tác động. Điểm số docking càng nhỏ, ái lực gắn kết càng tốt.

Kết quả

Mô hình 3D-Pharmacophore

Kết quả thu được tổng cộng 697 mô hình 3D-pharmacophore. Trong đó có 544 mô hình 5 điểm và 153 mô hình 4 điểm. Các mô hình này được đánh giá qua thang điểm của MOE và điểm số GH, cụ thể: độ chính xác (Accuracy scoring) là 1,0000, điểm chồng phủ (overlap scoring) > 6,5 và GH (Goodness of hit list) > 0,7. Trong đó, mô hình A001 có điểm số GH cao nhất là 0,91 cho thấy khả năng dự đoán tốt các "hit" tiềm năng có khả năng ức chế PD-L1. Mô hình A001 là mô hình 5 điểm gồm 2 vòng thơm, 2 nhóm kỵ nước và 1 trung tâm mang điện tích dương được trình bày ở hình 1. Ngoài ra, độ đặc hiệu (Sp) của mô hình là 0,98, nghĩa là tỉ lệ nhầm lẫn chất không hoạt tính thành chất có hoạt tính của mô hình chỉ có 0,02. Độ nhạy cao (Se = 0,93) cho thấy khả năng dự đoán đúng hơn 90% các chất có hoạt tính. Điều này có ý nghĩa rất quan trọng trong việc sàng lọc trên các cơ sở dữ liệu lớn, giúp hạn chế việc giành thời gian và chi phí nghiên cứu cho các chất không có hoạt tính.

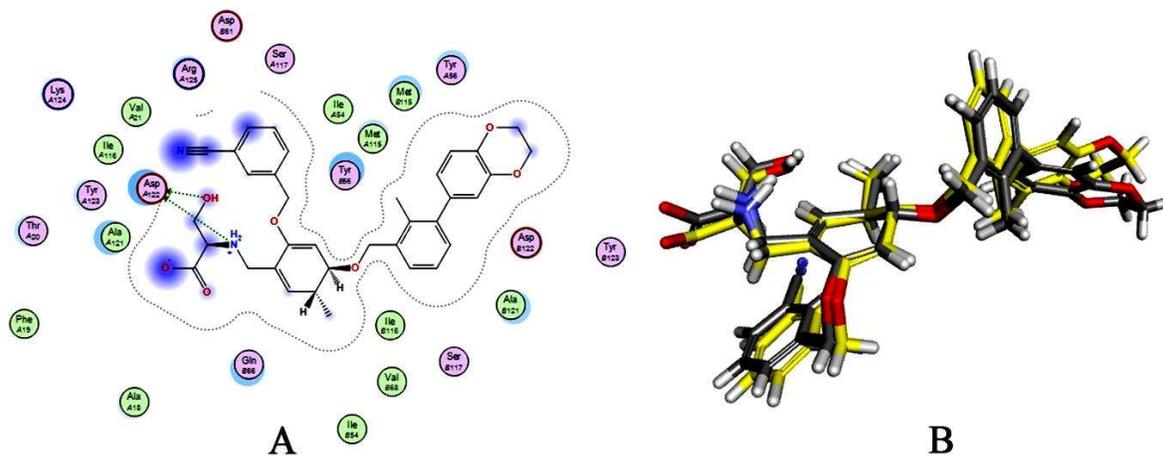


Hình 1. Mô hình pharmacophore cho các chất có khả năng gắn kết với PD-L1 với Aro: vòng thơm, Hyd: nhóm kỵ nước và Cat: trung tâm mang điện tích dương

Kết quả re-docking

Kết quả re-docking với giá trị RMSD là 0,7384 Å (nhỏ hơn 2,00 Å), cho thấy sự sai lệch cấu dạng trước và sau khi docking là không đáng kể. Cấu dạng của ligand đồng kết tinh tái

tạo được liên kết với acid amin Tyr56, Asp122, Lys 124 và Arg125 là các acid amin quan trọng quyết định hoạt tính ức chế PD-L1 [10]. Tại khoang gắn kết ở hình 2 nhóm amino của phối tử tạo các liên kết hydro chặt chẽ với Asp122.



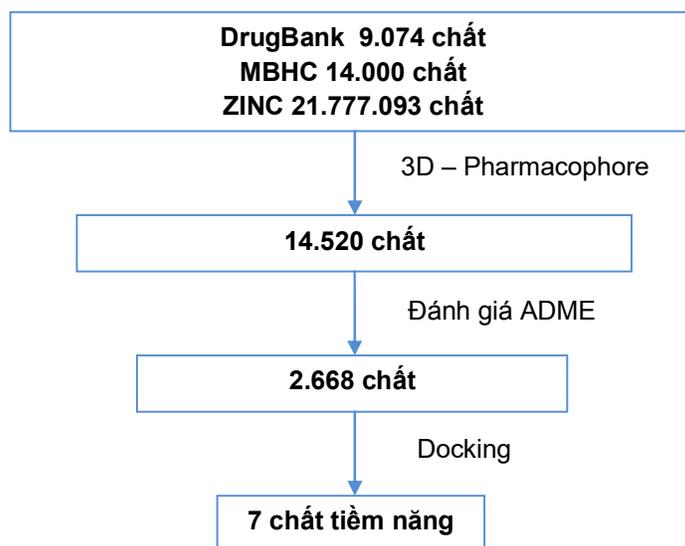
Hình 2. Kết quả re-docking ligand BMS-1001 vào protein (PDB ID: 5NIU)
A: Tái tạo liên kết với các acid amin quan trọng, B: Cấu trúc 3D của ligand đồng kết tinh BMS-1001 trước (màu xám) và sau (màu vàng) docking

Ứng dụng sàng lọc ảo

Quá trình được trình bày ở hình 3 và kết quả 7 chất có kết quả tốt nhất khi sàng lọc ảo được trình bày ở bảng 1. CSDL 21.800.167 chất được sàng lọc qua mô hình 3D – Pharmacophore A001 đã được xây dựng. Kết quả thu được 14.529 dẫn chất thỏa mãn mô hình. Tiếp tục sử dụng công cụ Unique trên phần mềm MOE 2015.10 để xóa trùng lặp, chọn ra được 14.520 chất. Các chất sau khi được sàng lọc tiếp qua SwissADME để thỏa những tiêu chí sẽ có khả năng đạt những tiêu chuẩn cho các hợp chất dùng làm thuốc đường uống, cũng như có một độ an toàn về dược động học nhất định. Tổng số 2668 vượt qua được các đánh giá ADME.

Kết quả phân tích cho thấy cả 2668 chất đều

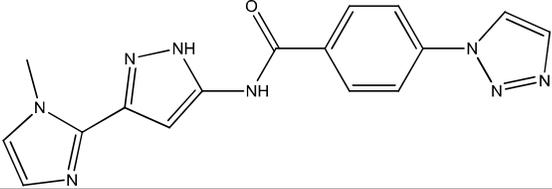
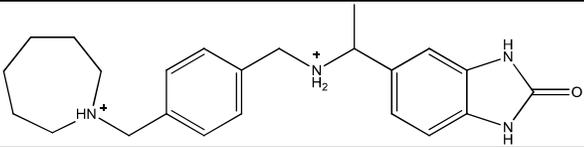
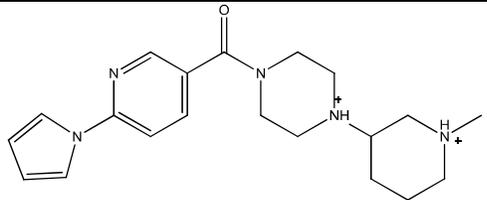
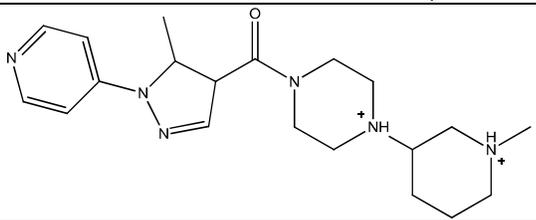
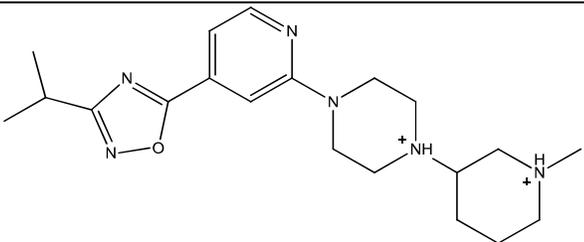
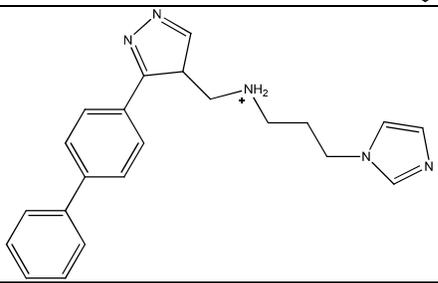
docking thành công vào khoang gắn kết. Điểm số docking dao động trong khoảng từ $-45,3840 \text{ kJ.mol}^{-1}$ đến $-13,1230 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Trong đó có 285 chất có điểm số thấp hơn -30 kJ/mol , chiếm tỉ lệ 11% trong số các phối tử được khảo sát. Tỷ lệ các phối tử hình thành được tương tác với các acid amin quan trọng Tyr56, Asp122, Lys124, Arg125 lần lượt là 99,4 %, 99,7 %, 36 % và 29 %. Đặc biệt, hầu hết các phối tử đều tạo liên kết H với Asp122 trong khi đó liên kết kỵ nước ($\pi - \pi$) giữa vòng thơm của phối tử và phenol của Tyr56 lại ít được quan sát thấy. Phân tích tương tác với acid amin trong khoang gắn kết, nghiên cứu chọn ra 7 chất có điểm số docking tốt, vừa tạo liên kết hydro hoặc liên kết kỵ nước với Tyr56 và Asp122 – 2 acid amin quan trọng nhất.



Hình 3. Sơ đồ mô tả tổng quát quá trình sàng lọc ảo các chất có khả năng ức chế PD-L1

Bảng 1. Kết quả 7 chất thu được sau khi sàng lọc ảo

STT	Tên chất	Cấu trúc	Điểm số docking (kJ/mol)
1	DB03916	<chem>Cc1ccc(cc1)N2C(=N3C=CC(=N3)N2c4ccc(cc4)N5CCN(CCCN)CC5)c6ccc(cc6)Cl</chem>	- 45,38

2	ZINC89864841		- 36,03
3	ZINC91312677		- 35,85
4	ZINC84604166		- 35,40
5	ZINC90632186		- 35,15
6	ZINC78262976		- 34,90
7	ZINC39356574		- 34,90

Bàn luận

Mô hình pharmacophore và đánh giá ADME đã cho hiệu năng sàng lọc ban đầu tốt, với 100 % số chất thỏa pharmacophore và ADME đã được docking thành công. Các chất sau khi được sàng lọc tiếp qua SwissADME để thỏa những tiêu chí sẽ có khả năng đạt những tiêu

chuẩn cho các hợp chất dùng làm thuốc đường uống, cũng như có một độ an toàn về dược động học nhất định. Từ kết quả sàng lọc thu được, phần lớn các chất được chọn là những chất mang các nhóm thế như amid, amin được gắn vào vị vòng thơm 5 hoặc 6 cạnh. Trong đó, các vị vòng tạo liên kết kỵ nước với Tyr56, các

nhóm amino tạo liên kết hydro với Asp122 và tạo tương tác Van der Waals với các acid amin khác (Tyr123, Lys 124...) trong khoang góp phần làm tăng khả năng gắn kết của các chất. Nghiên cứu sẽ tiếp tục hướng tới việc sử dụng mô hình pharmacophore để tiến hành sàng lọc các tập cơ sở dữ liệu khác như ngân hàng thuốc cổ truyền Trung Hoa (TCM tcm.cmu.edu.tw), thư viện các mảnh cấu trúc của ChemDiv (www.chemdiv.com)... nhằm tìm ra những chất ức chế mới có hiệu quả chọn lọc cao. Với 7 chất tiềm năng tìm được, nghiên cứu sẽ tiến hành chạy Mô phỏng động học phân tử và tính toán năng lượng gắn kết tự do, từ đó tạo tiền đề cho các phương pháp thử sinh học *in vitro*, *in vivo*.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được mô hình sàng lọc ảo các chất ức chế PD-L1 dựa trên mô hình 3D-Pharmacophore, đánh giá ADME và mô hình mô tả phân tử docking và tiến hành sàng lọc trên 3 cơ sở dữ liệu ZINC, Maybridge HitCreator và DrugBank. Mô hình pharmacophore là mô hình 5 điểm gồm 2 vòng thơm, 2 nhóm kỵ nước và 1 trung tâm mang điện tích dương. Đây là những điều kiện cần có của một chất ức chế PD-L1. Các chất này sau khi được sàng để thỏa những tiêu chí ADME sẽ có khả năng đạt những tiêu chuẩn cho các hợp chất dùng làm thuốc đường uống, cũng như có một độ an toàn về dược động học nhất định. Kết quả docking cho thấy các chất này có ái lực gắn kết cao với khoang trung tâm (điểm số docking giao động từ -45,38 kJ/mol đến -12 kJ/mol) và gần như tất cả các chất tạo liên kết với Tyr56, Asp122 là 2 acid

amin quan trọng nhất, cũng như đánh giá được khả năng tạo liên kết kỵ nước, liên kết hydro giữa protein và phối tử.

Tài liệu tham khảo

1. Acúrcio R. C. (2018), "Structure function analysis of immune checkpoint receptors to guide emerging anticancer immunotherapy", *J. Med Chem.*, 66 , PP. 10957-10975.
2. Patel S. P., K. R. (2015), "PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy", *Mol. Cancer Ther.*, 14 (4) , pp. 847-856.
3. United States patent application, US9850225.
4. United States patent application, US10144706B2.
5. United States patent application, US20210094932A1.
6. United States patent application, US20180177784A1.
7. United States patent application, US20170174671A1.
8. Daina A., M. O. (2017), "SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules", *Scientific Reports*, 7 (1) , 42717.
9. Gohlke H., Hendlich M. , Klebe G. J. J. O. M. B. (2000), "Knowledge - based scoring function to predict protein - ligand interactions", *J. Mol. Biol.*, 295 (2),pp. 337-356.
10. Suliman Almahmoud, H. A. (2019), "Molecular modeling studies on the binding mode of the PD-1/PD-L1 complex inhibitors", *Int. J. Mol. Sci.*, 20 (18), 4654.