

Nghiên cứu khả năng gắn kết của gilteritinib với cấu trúc Fms – like tyrosin kinase 3 (FLT3) tự nhiên và đột biến bằng phương pháp docking

Thái Khắc Minh¹, Phạm Xuân Tiên¹, Trần Thị Bích Phượng¹
Nguyễn Thị Thảo Nhung¹, Mai Thành Tấn¹, Trần Huệ Tịnh,² Lê Minh Trí^{1,3*}

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

²Bệnh viện Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh

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

Summary

Point mutation is one of the most important causes of the resistance to Fms – like tyrosin kinase 3 (FLT3) inhibitors, which are used in treatment of acute myeloid leukemia (AML). Gilteritinib is a second-generation type I FLT3 inhibitor with selective and strong inhibitory activities. The purposes of this research are to search for the point mutations that have a strong inhibitory effect on gilteritinib and to identify the structures of some potential molecules to inhibit those types of mutation. The methods used in this study include creating *in silico* point mutations by Sybyl-X 2.0 software, building molecular docking model and indentifying mutation through prediction tools. In this study, 128 point mutations were created on several important amino acids. The result shows that V624L has the strongest resistance to gilteritinib. Mitoxantron, ENMD-2076 and MRX-2843 could exhibit a better inhibitory activity on V624L than gilteritinib. The *in silico* models and the methods for evaluating binding affinity of gilteritinib with wild-type and mutant forms of FLT3 were successfully generated and applied for the further research, in which the strongest resistance mutation namely V624L and potential small molecule inhibitors of V624L were also determined.

Keywords: Docking, *in silico*, molecule structures, FLT3 inhibitors.

Đặt vấn đề

Bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (AML, Acute myeloid leukemia) đặc trưng bởi sự gia tăng các tế bào dòng tủy và ngăn cản sự trưởng thành của chúng, dẫn đến suy giảm chức năng tạo máu (giảm bạch cầu hạt, giảm tiểu cầu hoặc thiếu máu) kèm hoặc không kèm tăng bạch cầu [1]. Một trong những nguyên nhân gây ra AML là đột biến trên Fms-tyrosin kinase 3 (FLT3) và đột biến FLT3-ITD là một trong những đột biến xảy ra thường xuyên nhất trong AML [2]. Bên cạnh đó, đột biến protein làm thay đổi tương tác thuốc là nguyên nhân chính gây ra sự đề kháng thuốc [3]. Gilteritinib là thuốc ức chế FLT3 loại I, thế hệ 2 có tác dụng ức chế chọn lọc và mạnh mẽ, là thuốc thuộc nhóm ức chế FLT3 đầu tiên được FDA chấp thuận sử dụng đơn trị liệu trong AML

ở những bệnh nhân bị tái phát AML có FLT3 đột biến [4]. Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định các dạng đột biến điểm FLT3 có nguy cơ đề kháng mạnh gilteritinib và xác định cấu trúc các chất có tiềm năng ức chế các dạng đột biến điểm FLT3 kháng mạnh gilteritinib được xác định bằng phương pháp *in silico*.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Dựa trên cấu trúc tinh thể của FLT3 (PDB code: 6jqr) với phối tử đồng kết tinh gilteritinib lấy từ Ngân hàng dữ liệu Protein data bank, các chất ức chế FLT3 được tổng hợp từ các bài báo nghiên cứu. Mô hình và phương pháp *in silico* được sử dụng để nghiên cứu này là phương pháp tạo đột biến bằng phần mềm Sybyl-X 2.0, dự đoán cấu trúc, chức năng đột biến bằng công cụ PROVEAN, SIFT, PMUT, SNAP2, PolyPhen-2, mô tả phân tử docking bằng phần mềm LeadIT 2.1.8.

Kết quả và bàn luận

Các acid amin tương tác với phối tử gilteritinib và tạo đột biến *in silico*

Chịu trách nhiệm: Lê Minh Trí
Email: leminhtri@ump.edu.vn
Ngày nhận: 08/12/2020
Ngày phản biện: 14/01/2021
Ngày duyệt bài: 22/01/2021

LeadIT 2.1.8 giúp nhận biết các acid amin tạo liên kết hydro với phối tử gồm có: Glu692, Cys694 và Gly831. Nhóm carbamoyl của gilteritinib tạo 2 liên kết hydro với Glu692 và Cys694. Nhóm carbonyl của Gly 831 tạo liên kết hydro với nhóm amin của của phối tử. Các acid amin có tương tác kỵ nước với phối tử gồm có: Gly831, Leu818, Gly617, Leu832, Tyr693, Leu616, Gly697, Cys695, Tyr696, Val624.

Các đột biến thay thế nucleotid được lựa chọn để tạo đột biến *in silico* bằng Sybyl-X 2.0 được chia thành 3 nhóm:

Nhóm 1: Các đột biến điểm kháng thuốc ức chế FLT3 được nghiên cứu *in vitro* và những báo cáo trong lâm sàng.

Nhóm 2: Các đột biến điểm ở các acid amin tương tác trực tiếp, các acid amin tương tác kỵ nước và các acid amin nằm gần với gilteritinib tự xây dựng. Các acid amin này được thay thế bằng các acid amin khác mà đột biến thay thế

acid amin đó dễ xảy ra trong tự nhiên (các đột biến có xác suất $\geq 10/10000$ theo bảng PAM1).

Nhóm 3: Các đột biến điểm được dự đoán bằng công cụ dự đoán chức năng của đột biến.

Kết quả docking các đột biến FLT3 với gilteritinib

Có 128 đột biến FLT3 được tạo ra bởi Sybyl-X 2.0, các dạng đột biến này được chuẩn bị trong phần mềm MOE 2015.10 sau đó docking lại với phối tử gilteritinib trong phần mềm LeadIT 2.1.8 và được ghi lại điểm số docking. Điểm số docking càng thấp (càng âm), khả năng gắn kết giữa protein và phối tử càng tăng. Ngược lại, điểm số docking càng cao, khả năng gắn kết càng giảm. Sự thay đổi về khả năng gắn kết của phối tử gilteritinib với các đột biến của FLT3 so với dạng FLT3 tự nhiên khi chưa đột biến được đánh giá thông qua phần trăm độ tăng điểm số docking của gilteritinib với mỗi dạng đột biến so với dạng tự nhiên [5].

Bảng 1. Thống kê độ tăng điểm số docking theo nhóm

Đột biến được tạo ra	Tổng	Nhóm I < 0%	Nhóm II 0-5%	Nhóm III 5-10%	Nhóm IV 10-15%	Nhóm V > 15%
Nhóm 1	24	13	11	0	0	0
Nhóm 2	48	23	18	6	0	1
Nhóm 3	64	40	21	3	0	0
Tổng cộng*	128	71	47	9	0	1
		52,47%	36,72%	7,03%	0,00%	0,78%

* Tổng cộng được tính bằng tổng số lượng đột biến của 3 nhóm trừ đi đột biến trùng lặp giữa các nhóm.

Chú thích: Màu sắc tương ứng với mỗi nhóm phân theo độ tăng điểm số docking



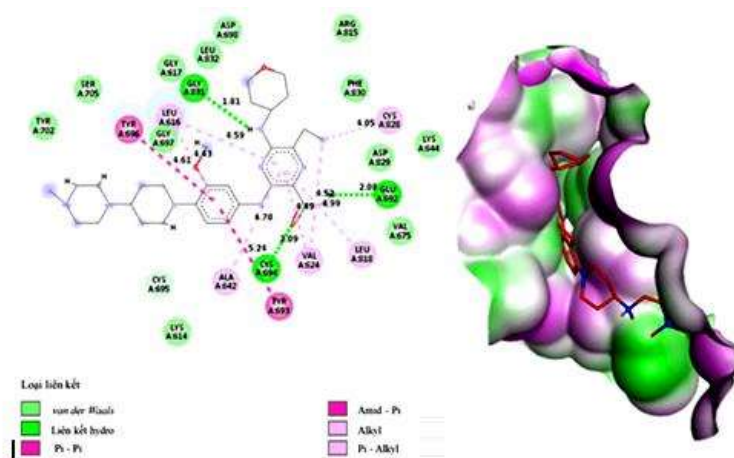
Khả năng gắn kết của gilteritinib với các dạng đột biến điểm giảm dần từ nhóm I đến nhóm V, ứng với phần trăm độ tăng điểm số docking tăng dần cho thấy mức độ đề kháng tăng dần với gilteritinib. Từ bảng 1 nhận thấy rằng khoảng một nửa các đột biến điểm tạo ra làm tăng sự nhạy cảm của FLT3 với gilteritinib (71/128 đột biến, chiếm 55,47%). Trong số các đột biến gây kháng thuốc thì nhóm có độ tăng điểm số

docking 0 - 5% chiếm tỉ lệ nhiều nhất (47/128 đột biến, chiếm 36,72%). Đột biến có điểm số docking tăng từ 5 - 10% chiếm tỉ lệ khá thấp (7,03%). Không có đột biến nào có phần trăm tăng điểm số docking từ 10 - 15% và chỉ duy nhất 1 đột biến (V624L) trong 128 đột biến tạo ra (chiếm tỉ lệ 0,78%) nằm trong nhóm có độ tăng điểm số docking cao nhất là > 15%.

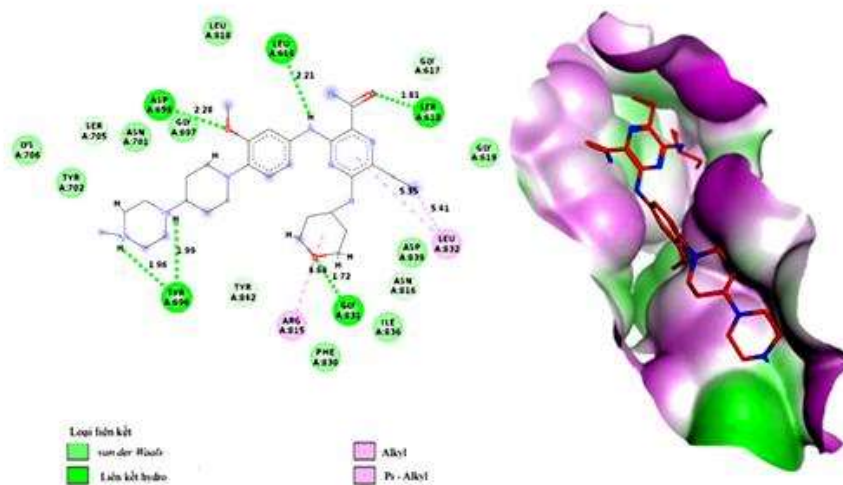
Bảng 2. Thông tin về tương tác giữa gilteritinib với FLT3 ban đầu và 3 FLT3 đột biến kháng thuốc nhất

Dạng	Số acid amin tương tác trực tiếp	Số liên kết hydro tạo thành	Độ dài liên kết hydro (Å)	Số acid amin tương tác kỵ nước	Số tương tác kỵ nước	Số liên kết van der Waals
Tự nhiên	3	3	1,81 - 2,09	6	9	14
V624L	5	6	1,72 - 2,28	2	3	9
E692D	3	3	1,80 - 1,99	5	7	12
G619D	3	3	1,60 - 2,02	6	8	12

Mô hình 2D thể hiện sự gắn kết giữa phối tử gilteritinib với protein FLT3 dạng tự nhiên và FLT3 dạng đột biến (V624L) được trình bày lần lượt ở hình 1 và hình 2.



Hình 1. Mô hình gắn kết và tương tác của gilteritinib với FLT3 tự nhiên có điểm số docking -29,34 kJ/mol



Hình 2. Mô hình gắn kết và tương tác của gilteritinib với dạng đột biến V624L của FLT3 có điểm số docking -22,82 kJ/mol

Từ bảng 2, hình 1 và hình 2, nhận thấy rằng sau khi gây đột biến chuyển Val624 thành Leu số lượng liên kết hydro tăng so với dạng tự nhiên, số tương tác kỵ nước và liên kết van der Waals giảm mạnh. Dạng tự nhiên có nhiều hơn dạng đột biến V624L: 6 tương tác kỵ nước và 5 liên kết van der Waals. Các liên kết hydro và tương tác kỵ nước đóng vai trò quan trọng đối với tính đặc hiệu, khả năng gắn kết, độ ổn định tương tác giữa phối tử gilteritinib với protein.

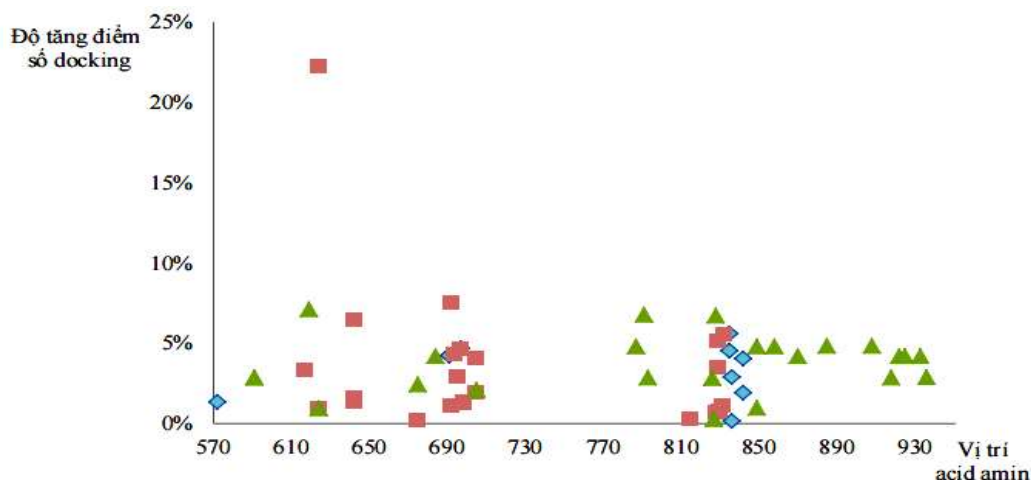
Bên cạnh đó, có 2 dạng đột biến kháng thuốc đáng chú ý nhưng có độ tăng điểm số docking thấp hơn là E692D (7,50%) và G619D (7,11%) và thấp hơn khoảng 3 lần so với đột biến V624L (22,23%). Ở 2 dạng đột biến này vẫn có khả năng tạo 3 liên kết hydro với 3 acid amin quan trọng, nhưng số lượng tương tác kỵ nước và liên kết *van der Waals* giảm ít hơn dạng đột biến V624L khi so với dạng tự nhiên (bảng 2). Do vậy kết quả điểm số docking tăng dần theo thứ tự E692D < G619D < V624L là hợp lí. Một tiêu chí

khác để lựa chọn đột biến V624L là đột biến kháng thuốc chính là đột biến chỉ tạo được 1 trong 3 liên kết hydro với 3 acid amin quan trọng (Glu692, Cys694, Gly831) trong sự gắn kết thuốc, đó là Gly831.

Đánh giá kết quả docking các đột biến FLT3 với phối tử gilteritinib

Nghiên cứu 128 đột biến điểm *in silico* của protein FLT3, các đột biến tạo ra có thể làm thay đổi khả năng gắn kết với protein của gilteritinib theo nhiều chiều hướng và mức độ khác nhau.

Trong tổng số 128 đột biến nghiên cứu có 57 đột biến có độ tăng điểm số docking > 0% (là đột biến thuộc nhóm II, III, IV, V trong bảng 1). Vị trí các đột biến này trên trình tự acid amin của protein FLT3 (cấu trúc tinh thể 6jqr) được thể hiện ở biểu đồ hình 3, với trục tung thể hiện độ tăng điểm số docking, trục hoành là vị trí acid amin có đột biến kháng thuốc trên cấu trúc trình tự acid amin của protein.



Hình 3. Vị trí các đột biến trên cấu trúc trình tự protein

Từ hình 3 các đột biến kháng thuốc không chỉ ở những acid amin tương tác với phối tử mà có thể nằm ở bất kì vị trí nào trên trình tự acid amin của protein FLT3. Đa số các đột biến kháng thuốc đều nằm ở mức 7%, mức độ đề kháng không cao, chứng tỏ gilteritinib là một thuốc có tác dụng ức chế tốt, ít bị đề kháng kể cả đối với những đột biến kháng những chất ức chế FLT3 khác.

Kết quả docking các đột biến FLT3 kháng mạnh gilteritinib với các chất khác

Đột biến V624L của FLT3 có khả năng kháng mạnh nhất (độ tăng điểm số docking là 22,23%) với gilteritinib sẽ được tiến hành docking với 64 chất đã được nghiên cứu là có tác dụng ức chế FLT3 bằng công cụ FlexX được tích hợp trong phần mềm LeadIT2.1.8.

Bảng 3. Thống kê điểm số docking của 64 chất ức chế FLT3 với đột biến V624L và FLT3 dạng ban đầu

Điểm số docking (kJ/mol)	Số lượng và phần trăm chất có điểm số docking thuộc khoảng tương ứng			
	Đột biến V624L		FLT3 tự nhiên	
	Số lượng	Tỉ lệ	Số lượng	Tỉ lệ
> -15,00	7	10,94%	3	4,69%
-20,00 đến -15,00	19	29,69%	10	15,63%
-25,00 đến -20,00	20	31,25%	21	32,81%
-30,00 đến -25,00	13	20,31%	18	28,13%
< -30,00	2	3,13%	10	15,63%
Dock không thành công	3	4,69%	2	3,13%
Tổng	64	100%	64	100%

Bảng 3 cho thấy số lượng các chất trong các nhóm có khoảng điểm nhỏ hơn (âm hơn) có xu hướng giảm sau khi đột biến. Như vậy phần lớn các chất này đều bị đột biến V624L đề kháng và mức độ đề kháng, độ tăng điểm số docking ở mỗi chất là khác nhau.

Điểm số docking của gilteritinib với đột biến V624L và FLT3 tự nhiên lần lượt là -22,82 và -29,34 kJ/mol. Trong số 64 chất có tác dụng ức chế FLT3 thì có 21 chất (32,81%) có điểm số

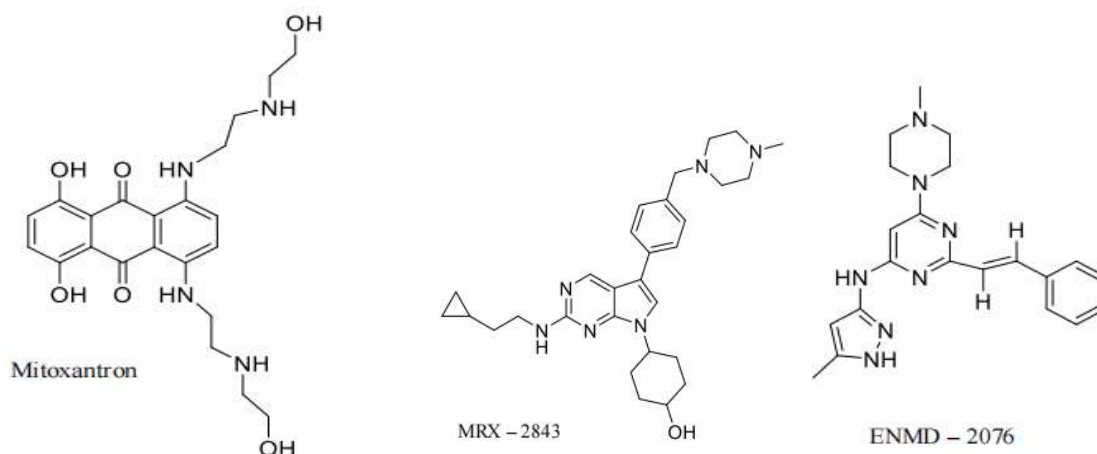
docking thấp hơn (âm hơn) so với gilteritinib khi docking với đột biến V624L. Từ 21 chất này thì có 10 chất gắn kết với các acid amin quan trọng vừa có điểm số docking thấp hơn gilteritinib khi docking với đột biến V624L được trình bày trong bảng 4. Tuy nhiên 9/10 chất này vẫn bị đột biến làm cho tăng điểm số docking, chỉ có 1 chất là đột biến làm tăng nhạy cảm với chất ức chế, đó là chất ENMD – 2076.

Bảng 4. Các chất có khả năng gắn kết với đột biến V624L tốt hơn gilteritinib

STT	Chất	Mã Chất	Điểm số docking (kJ/mol)	
			V624L	Tự nhiên
1	KW – 2449	CID_11427553	-27,06	-29,48
2	Mitoxantron	CID_4212	-31,62	-33,12
3	AAE871	CID_9892122	-22,84	-29,93
4	ENMD – 2076	CID_16041424	-26,20	-25,37
5	AKN028	CID_44177328	-23,74	-28,85
6	AMG 925	CID_60202647	-26,88	-33,14
7	G - 749	CID_78357765	-28,63	-31,85
8	MRX – 2843	CID_89495685	-31,79	-32,85
9	Dovitinib (TKI – 258. CHIR258)	CID_135398510	-28,23	-31,38
10	UNC2025	UNC2025	-27,32	-29,64

Bảng 5. Thông tin tương tác của 3 chất gắn kết tốt với V624L so sánh với gilteritinib

Dạng	Số acid amin tương tác trực tiếp	Số liên kết hydro tạo thành	Độ dài liên kết hydro (Å)	Số acid amin tương tác kỵ nước	Số tương tác kỵ nước	Số liên kết van der Waals
Gilteritinib	5	6	1,72 – 2,28	2	3	9
Mitoxantron	6	11	1,68 – 2,77	4	6	8
ENMD – 2076	3	4	1,54 – 2,13	6	10	8
MRX – 2843	4	5	1,80 – 2,37	7	10	8



Hình 4. Cấu trúc hóa học của các chất đáng chú ý có khả năng gắn kết tốt với V624L so với gilteritinib

Kết luận

Bằng phương pháp tạo đột biến *in silico* và docking, nghiên cứu đã tạo ra 128 đột biến *in silico*, trong đó có 71/128 đột biến (chiếm 55,47%) là tăng nhạy với gilteritinib, 57/128 đột biến (chiếm 44,53%) có xuất hiện đề kháng với thuốc, tuy nhiên đa số các trường hợp đề kháng yếu chỉ có 1 đột biến đáng chú ý là V624L có khả năng kháng thuốc mạnh (có độ tăng điểm số docking là 22,23%). Đồng thời nghiên cứu cũng đã tìm ra được 10 cấu trúc có tiềm năng ức chế dạng đột biến V624L này. Để tiến xa hơn trong việc tìm ra các đột biến kháng thuốc và các chất có tác dụng ức chế tốt các đột biến này, nghiên cứu đưa ra những kiến nghị: Mở rộng phạm vi nghiên cứu trên tất cả các acid amin có trong trình tự cấu trúc

của FLT3 và tiến hành chạy mô phỏng động lực học phân tử và tính toán năng lượng liên kết tự do các đột biến quan trọng và các chất ức chế tốt các đột biến đó để có khẳng định rõ ràng hơn về khả năng gắn kết và tác dụng của các chất được nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

1. Lowenberg B. et al. (1999), *New England J. Med.*, 341 (14), pp. 1051-1062.
2. Zhao J. et al (2019), *Biomarker Res.*, 7 (1), pp. 19.
3. Dong Y. et al. (2017), *Mol. Med. Rep.*, 16 (6), pp. 9409- 9414.
4. Tarver T. C. et al (2020), *Blood Adv.*, 4 (3), pp. 514-524.
5. Tran-Nguyen V. K. et al (2019), *SAR QSAR Environ. Res.*, 30 (12), pp. 899-917.