

PENAPISAN VIRTUAL BERBASIS STRUKTUR DARI DATABASE BAHAN ALAM ZINC SEBAGAI INHIBITOR BRUTON TYROSINE KINASE

Fauzan Zein Muttaqin¹, Wayan Ayu Puje Astuti¹, La Ode Aman², Ellin Febrina³, Aiyi Asnawi⁴*

¹Fakultas Farmasi, Universitas Bakti Kencana

²Departemen Farmasi, Universitas Negeri Gorontalo

³Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

⁴Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung

*Email: aiyiasnawi@fa.itb.ac.id

Artikel diterima: 15 Agustus 2019; Disetujui: 11 Oktober 2019

ABSTRAK

Bruton Tirosin kinase (BTK) memainkan peran penting dalam banyak jalur pensinyalan seluler sehingga menjadikannya target potensial dalam mengobati penyakit autoimun dan kanker. Database senyawa bahan alam digunakan untuk penelitian ini dikarenakan senyawa bahan alam biasanya memiliki tingkat toksisitas yang lebih rendah. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan penapisan virtual berbasis struktur terhadap database bahan alam ZINC. Metode penapisan virtual yang digunakan adalah penapisan berbasis farmakofor dengan reseptor BTK (PDB ID 6E4F). Dengan menggunakan farmakofor berbasis struktur, model farmakofor dibuat dengan memiliki tiga buah fitur hidropobik, satu buah cincin aromatik, empat fitur akseptor ikatan hidrogen dan sembilan buah fitur donor ikatan hidrogen. Penapisan berbasis farmakofor terhadap 12 terhadap database bahan alam ZINC (151.837 senyawa) terhadap menghasilkan 1.345 hit dengan nilai fit score sebesar 58,81. Selanjutnya hit ini didocking ke dalam situs ATP-binding dari domain kinase BTK menggunakan vina wizard dan autodock wizard (PyRx 8.0) menghasilkan berturut-turut 148 dan 75 hit. Dapat disimpulkan, tiga senyawa dengan nilai afinitas besar terhadap BTK adalah ZINC00627911, ZINC05450876, dan ZINC85569217, dan dapat digunakan sebagai molekul pemandu potensial dalam merancang inhibitor BTK.

Kata kunci: Bruton tirosine kinase, BTK inhibitor, Docking, Farmakofor, Penapisan virtual

ABSTRACT

Bruton's tyrosine Kinase (BTK) plays a critical role in many cellular signalling pathways making it a potential target to treat autoimmune diseases and cancer. Database of natural product was used for this study because natural product usually has lower levels of toxicity. In this study, we have implemented structure-based virtual screening against natural product ZINC database. Virtual screening was carried out by using pharmacopore model followed by molecular docking to identified the inhibitor of BTK (PDB ID 6E4F). By using structure based

pharmacophore, a four-point pharmacophore hypothesis was derived, with three hydrophobic, one aromatic rings, four hydrogen bond acceptor and nine hydrogen bond donor. Screening of 12 natural product ZINC databases (151,837 compounds) against pharmacophore returned 1,345 hits with matching chemical features of 58.81. Docking these hits against the ATP-binding site of the BTK kinase domain through a virtual screening docking-based by using vina wizard and autodock wizard (PyRx 8.0) returned 148 and 75 hits, respectively. In conclusion, three hit compounds with high affinity towards BTK were identified, and it could be used as a potent lead molecule for designing BTK inhibitor.

Keywords: *Bruton's tyrosine kinase, BTK inhibitors, Docking, Pharmacophore, Virtual screening*

PENDAHULUAN

Leukemia adalah penyakit neoplastik yang ditandai dengan diferensiasi dan proliferasi sel hematopoietik, sehingga menyebabkan penekanan dan penggantian unsur sumsum tulang yang normal (Aslinda, 2017). Salah satu kinase yang memainkan peran penting dalam signaling onkogenik untuk kelangsungan hidup sel leukemia dari keganasan sel B adalah Bruton Tyrosine kinase (BTK) (Choi & Kipps, 2012). BTK juga terlibat dalam banyak jalur pensinyalan lainnya dalam sel B, termasuk kemokin reseptor, reseptor Toll-like (TLR) dan reseptor Fc signaling (Sakthivel & Habeeb, 2018).

Sejumlah inhibitor BTK yang menjanjikan telah dirancang antara lain, ibrutinib (Pan *et al.*, 2007) untuk

pengobatan limfoma sel mantel (MCL) dan leukemia limfositik kronis (CLL). Ibrutinib adalah inhibitor BTK selektif dan ireversibel yang membentuk ikatan kovalen dengan residu sistein nonconserved (Cys481) proksimal ke situs aktif BTK (Honigberg *et al.*, 2010). Meskipun keberhasilannya belum pernah terjadi sebelumnya, resistensi yang ditemukan terhadap ibrutinib telah diamati pada pasien dengan CLL (Woyach *et al.*, 2014) dan MCL (Chiron *et al.*, 2014). Didorong oleh situasi ini, ada kebutuhan mendesak untuk menemukan inhibitor BTK dengan secara *in silico*.

Beberapa penelitian melakukan pencarian senyawa obat anti kanker berupa senyawa aktif yang diisolasi dari tumbuhan dan sudah dimodifikasi menjadi senyawa baru yang memiliki

aktivitas yang lebih tinggi. Lebih dari 400 spesies dalam 315 genus dan 97 famili mempunyai aktivitas sebagai penghambat kanker dan leukimia seperti alkaloid, flavonoid dan fenol (Chasani *et al.*, 2011). Oleh karena itu dalam penelitian ini digunakan database Zinc Natural product sebagai kelompok senyawa uji.

Penapisan virtual kimia komputasi dalam mencari senyawa pemandu dengan cara mereduksi sejumlah besar senyawa kimia untuk dilihat interaksinya terhadap protein target. Penapisan virtual digunakan karena dapat menghemat biaya dan waktu yang dibutuhkan tidak terlalu lama. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan penapisan virtual berbasis struktur untuk mendapatkan inhibitor BTK dari database bahan alam ZINC.

METODE PENELITIAN

Piranti Keras

Piranti keras yang digunakan berupa sistem operasi Windows Pro 10, 64-bit; Intel xeon double processor X5670 @ 2,93 GHz; Memori 65536 MB RAM; dan VGA Dedicated 4 GB 64-bit.

Preparasi Struktur Protein, Dataset Aktif, Decoy Set, dan Database Bahan Alam ZINC

Preparasi struktur protein

Makromolekul yang digunakan yaitu dengan PDB ID 6E4F dan diunduh dalam format *.pdb untuk proses selanjutnya. Khusus untuk tahapan molekular docking maka protein ini perlu dipisahkan dari ligan alaminya dan disimpan dalam dua file terpisah untuk keduanya.

Preparasi dataset aktif dan decoy

Sebanyak 40 senyawa aktif BTK sebagai kontrol positif yang digunakan sebagai validasi saat melakukan penapisan virtual diperoleh dari situs web <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (Davies *et al.*, 2015) diubah dalam bentuk .sdf dengan bantuan software OpenBabel GUI 2.4.1. (Melville & Hirst, 2007) dan 1600 decoy didesain menggunakan software DecoyFinder 2.0 (Adrià *et al.*, 2012).

Preparasi database bahan alam ZINC

Database yang diperoleh dari hasil download dari Zinc natural product database dengan sumber dari berbagai database bahan alam. Semua dataset, database dan decoy diubah format ke dalam *.ldb.

Pemodelan Farmakofor

Validasi model farmakofor

Model farmakofor yang dibuat selanjutnya divalidasi menggunakan dataset aktif dan senyawa decoy. Validasi tersebut menghasilkan jumlah hit yang didapatkan dan kurva ROC yang berisi nilai AUC dan EF yang dikatakan sudah valid apabila nilai AUC lebih dari 0,50 dan EF lebih dari 1,0. Jika parameter validasi tersebut telah terpenuhi, maka model farmakofor telah valid dan disimpan dalam bentuk 3D.

Penapisan virtual berbasis farmakofor

Dilakukan penapisan virtual menggunakan model farmakofor yang telah divalidasi. Penapisan virtual ini dilakukan dengan menggunakan software LigandScout 4.3 (Wolber & Langer, 2005) terhadap database bahan alam ZINC (ZINC natural product). LigandScout 4.3 akan mencari senyawa yang terdapat pada database yang memiliki fitur farmakofor yang sama dengan model farmakofor sehingga diperoleh hasil sebagai hits. Hasil yang didapatkan selanjutnya disimpan dan dilakukan proses selanjutnya.

Pemodelan Docking

Optimalisasi parameter docking

Disiapkan makromolekul dan ligan alami yang telah dipreparasi sebelumnya. Dibuat peta untuk proses penambatan molekul dengan mengatur posisi dan ukuran kubus (gridbox) hingga didapatkan koordinat x, y, dan z yang sesuai untuk penambatan dimana diatur gridboxnya sampai menutupi binding site.

Evaluasi model docking

Koordinat gridbox (kubus) yang diperoleh pada tahap sebelumnya; lalu dilakukan evaluasi penapisan virtual menggunakan dataset aktif dan dataset decoy yang telah dipreparasi pada tahap sebelumnya. Tahapan pengerjaannya sama dengan tahapan validasi docking hanya berbeda dari jumlah ligan yang diinput berupa dataset aktif dan dataset decoy serta ukuran gridbox yang lebih besar. Setelah dioptimasi ligan, dijalankan docking sehingga energi dan pose. Nilai energi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk membuat kurva ROC berbasis website <http://stats.drugdesign.fr> (Empereur-Mot *et al.*, 2016). Dari kurva ROC ini akan diperoleh nilai AUC dengan

parameter kevalidan jika nilainya lebih dari 0,5 dan EF lebih dari 1,0.

Penapisan virtual berbasis docking

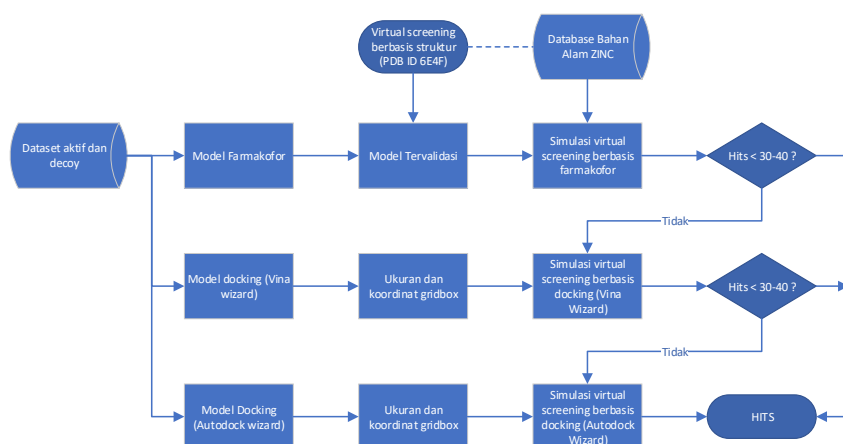
Penapisan virtual berbasis docking menggunakan PyRX 8.0 (Dallakyan & Olson, 2015) baik vina wizard maupun autodock wizard menggunakan parameter yang sama dengan tahap validasi model docking, hanya berbeda input ligan menggunakan database bahan alam ZINC. Hasil penapisan virtual diinterpretasi untuk mendapatkan hits

senyawa yang terbaik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bruton Tyrosine Kinase

Struktur kristal PDB ID 6E4F (<https://www.rcsb.org/structure/6e4f>) merupakan ARQ 531 terkompleks dalam domain BTK, dimana ARQ 531 merupakan inhibitor BTK yang kuat dan reversibel dengan aktivitas tambahan terhadap Src family kinase dan kinase yang terkait dengan pensinyalan ERK (Reiff *et al.*, 2016).



Gambar 1. Laju alir penapisan virtual berbasis struktur untuk reseptor BTK (PDB ID 6E4F)

Pembuatan Model Farmakofor dan Evaluasi Model

Model farmakofor dibangun berbasis struktur dari ligan alami (HRA) yang terdapat pada reseptor 6E4F. Setelah ligan alami dioptimasi dan dibangun farmakofor maka

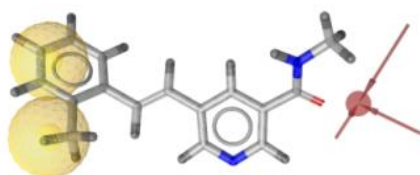
diperoleh 17 buah fitur dimana terdapat 3 buah fitur hidrofobik, 1 buah fitur cincin aromatik, 9 buah fitur donor ikatan hidrogen, dan 4 buah fitur akseptor ikatan hidrogen. Fitur-fitur farmakofor tersebut menandakan adanya sisi-sisi yang akan terjadi

interaksi dari ikatan antara ligan terhadap reseptor (Seidel *et al.*, 2010).

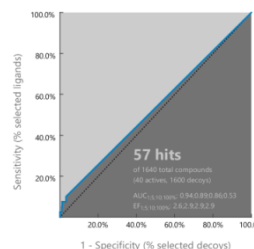
Evaluasi model farmakofor dilakukan secara coba-coba dengan mengubah komposisi fitur awal farmakofor terhadap dataset aktif dan decoy sampai diperoleh nilai ROC > 0,5 dan EF >1,0. Model farmakofor yang tervalidasi mempunyai nilai ROC dan EF berturut-turut adalah 0,53 dan 2,9; dengan hits sebanyak 57 senyawa. Model farmakofor tersebut memiliki skor sebesar 58,59. Model tervalidasi terdiri dari 12 fitur yaitu 1

buah hidrofobik, 1 buah cincin aromatik, 4 buah donor ikatan H, dan 6 buah akseptor ikatan H (Gambar 2). Dari fitur-fitur farmakofor yang terbentuk menandakan bahwa pada model 12 memiliki potensi interaksi aktif dari ikatan antara ligan terhadap reseptor [20].

Kemudian dilakukan pencarian kurva ROC yang memenuhi nilai standar AUC lebih dari 0,50 atau EF lebih dari 1,0 (Braga & Andrade, 2013).



(a)



(b)

Gambar 2. Model fitur (a) dan kurva ROC (b) tervalidasi

Hits Penapisan Virtual Berbasis Farmakofor

Model farmakofor telah divalidasi untuk menyaring senyawa dari database bahan alam ZINC yang berjumlah 151.837 senyawa dari gabungan 12 database yang ada. dan 33.283 senyawa ditetapkan masing-

masing setelah pemetaan farmakofor. Setelah dilakukan penapisan virtual, diperoleh 1.345 hits. Hits ini diperoleh berdasarkan nilai fit score sebesar 58,81. Jika nilai fit score farmakofor > 50% artinya fitur memiliki keaktifan yang baik. Sedangkan, fitur dari senyawa tersebut dianggap memiliki

aktifitas yang kurang apabila nilai fit score farmakofornya berada dikisaran 35-50%. Rentang nilai skor fit farmakofor berkaitan dengan tingkat keaktifan fitur senyawa terhadap reseptor (Mughtaridi et al., 2017). Output hits tahap ini selanjutnya menjadi input senyawa untuk penapisan virtual berbasis docking.

Penapisan Virtual Berbasis Docking

Pada tahapan penapisan virtual berbasis docking based, ada 2 tahapan skrining menggunakan perangkat lunak dengan parameter bervariasi.

Evaluasi Penapisan Virtual Menggunakan Autodock Wizard dan Vina Wizard

Setelah optimalisasi parameter docking, selanjutnya dilakukan evaluasi penapisan virtual berbasis docking autodock wizard dan vina wizard dengan dataset aktif dan dataset decoy. Protokol docking tervalidasi digunakan untuk memperbaiki hit yang diambil dan mengurangi tingkat positif palsu melalui interaksi reseptor-ligan.

Hits Penapisan Virtual Berbasis Docking

Hasil screening 1.345 senyawa untuk mendapatkan senyawa yang

lebih baik berdasarkan nilai energi bebas ikatan dan pose. Penapisan virtual pada tahap ini dilakukan menggunakan vina wizard dan autodock wizard yang ada pada software PyRx 8.0. Tahapan docking menggunakan Vina Wizard dilihat berdasarkan afinitas pengikatan. Afinitas pengikatan merupakan kemampuan obat untuk berikatan dengan reseptor. Semakin kecil nilai afinitas pengikatan maka afinitas reseptor dengan ligan semakin tinggi begitu pula sebaliknya (Saputri *et al.*, 2016). Maka, diperoleh sebanyak 148 hits (Tabel 1) yang memiliki afinitas pengikatan yang lebih kecil dari ligan alami yaitu -10,00 kkal/mol.

Dikarenakan output hits dari vina wizard masih > 30-40 hits, maka dilanjutkan molecular docking dengan autodock wizard sehingga diperoleh hits sebanyak 75 senyawa yang memiliki binding energi lebih kecil dari ligan alami ($E = -8,8$ kkal/mol) (Tabel 1).

Hasil analisis terhadap 75 senyawa ini, diperoleh tiga hits yaitu ZINC00627911, ZINC05450876, dan ZINC85569217 dengan nilai energi ikatan lebih baik dari ligan alami

secara berturut-turut adalah -9,37 kkal/mol; -8,91 kkal/mol; dan -9,78 kkal/mol. Sedangkan nilai konstanta inhibisinya adalah 135,95 nM; 259,38 nM; dan 3,73 nM.

Tabel 1. Hasil Penapisan virtual berdasarkan Molecular Docking Autodock Wizard

No	ZINC Natural Products	Jumlah Database ZINC	Hasil penapisan virtual model farmakofor	Hasil penapisan virtual <i>vina wizzard</i>	Hasil penapisan virtual <i>autodock wizzard</i>
1	Afropen Natural Product	884	4	-	-
2	AnalytiConDiscovery Natural Product	11217	72	1	-
3	Herbal Ingredients In-Vivo Metabolism	652	-	-	-
4	Herbal Ingredients Targets	801	-	-	-
5	IBScreen Natural Product	84099	726	76	37
6	Indofine Natural Product	142	-	-	-
7	NPACT Database	1421	10	1	1
8	NuBBE Natural Product	584	1	-	-
9	Princeton Natural Product	14084	396	60	34
10	Specs Natural Product	1488	2	-	-
11	TCM Database	35993	133	10	3
12	UEFS Natural Product	472	1	-	-
	Total	151.837	1.345	148	75

KESIMPULAN

Penapisan virtual berbasis farmakofor dan docking mampu mereduksi database bahan alam ZINC menjadi berturut-turut 1.345 hits dan 75 hits. Dari analisis interaksi terhadap 75 hit diperoleh tiga ligand terbaik sebagai senyawa pemandu inhibitor BTK.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada LPPM BKU yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah internal BKU Bandung 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrià, C.M., Garcia-Vallvé, S. and Pujadas, G., 2012. DecoyFinder, a tool for finding decoy molecules. *Journal of cheminformatics*, 4(S1), p.P2.
- Berman, H.M., Bhat, T.N., Bourne, P.E., Feng, Z., Gilliland, G., Weissig, H. and Westbrook, J., 2000. The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(11s), p.957.
- Braga, R.C. and Andrade, C.H., 2013. Assessing the performance of 3D pharmacophore models in virtual screening: how good are they?. *Current topics in*

- medicinal chemistry*, 13(9), pp.1127-1138.
- Chasani, M., Iswanto, P., Vaulina, E., Putra, W.S. and Hanafi, M., 2011. SEMI SINTESIS SENYAWA 2, 4, 6-TRINITROFENILHIDRAZON KALANON DAN UJI AKTIVITAS TERHADAP SEL LEUKIMIA L1210. *Molekul*, 6(2), pp.66-73.
- Chiron, D., Di Liberto, M., Martin, P., Huang, X., Sharman, J., Blecua, P., Mathew, S., Vijay, P., Eng, K., Ali, S. and Johnson, A., 2014. Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer discovery*, 4(9), pp.1022-1035.
- Choi, M.Y. and Kipps, T.J., 2012. Inhibitors of B-cell receptor signaling for patients with B-cell malignancies. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 18(5), p.404.
- Dallakyan, S. and Olson, A.J., 2015. Small-molecule library screening by docking with PyRx. In *Chemical biology* (pp. 243-250). Humana Press, New York, NY.
- Davies, M., Nowotka, M., Papadatos, G., Dedman, N., Gaulton, A., Atkinson, F., Bellis, L. and Overington, J.P., 2015. ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. *Nucleic acids research*, 43(W1), pp.W612-W620.
- Empereur-Mot, C., Zagury, J.F. and Montes, M., 2016. Screening explorer—An interactive tool for the analysis of screening results. *Journal of chemical information and modeling*, 56(12), pp.2281-2286.
- Hevener, K.E., Zhao, W., Ball, D.M., Babaoglu, K., Qi, J., White, S.W. and Lee, R.E., 2009. Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. *Journal of chemical information and modeling*, 49(2), pp.444-460.
- Honigberg, L.A., Smith, A.M., Sirisawad, M., Verner, E., Loury, D., Chang, B., Li, S., Pan, Z., Thamm, D.H., Miller, R.A. and Buggy, J.J., 2010. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29), pp.13075-13080.
- Melville, J.L. and Hirst, J.D., 2007. TMACC: Interpretable Correlation Descriptors for Quantitative Structure–Activity Relationships. *Journal of chemical information and modeling*, 47(2), pp.626-634.
- Muchtaridi, M., Syahidah, H., Subarnas, A., Yusuf, M., Bryant, S. and Langer, T., 2017. Molecular docking and 3D-pharmacophore modeling to study the interactions of chalcone derivatives with

- estrogen receptor alpha. *Pharmaceuticals*, 10(4), p.81.
- Pan, Z., Scheerens, H., Li, S.J., Schultz, B.E., Sprengeler, P.A., Burrill, L.C., Mendonca, R.V., Sweeney, M.D., Scott, K.C., Grothaus, P.G. and Jeffery, D.A., 2007. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*, 2(1), pp.58-61.
- Reiff, S.D., Mantel, R., Smith, L.L., McWhorter, S., Goettl, V.M., Johnson, A.J., Eathiraj, S., Abbadessa, G., Schwartz, B., Byrd, J.C. and Woyach, J.A., 2016. The Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor ARQ 531 effectively inhibits wild type and C481S mutant BTK and is superior to ibrutinib in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia.
- Sakthivel, S. and Habeeb, S.K.M., 2018. Combined pharmacophore, virtual screening and molecular dynamics studies to identify Bruton's tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(16), pp.4320-4337.
- Saputri, K.E., Fakhmi, N., Kusumaningtyas, E., Priyatama, D. and Santoso, B., 2016. Docking Molekular Potensi Anti Diabetes Melitus Tipe 2 Turunan Zerumbon Sebagai Inhibitor Aldosa Reduktase Dengan Autodock-Vina. *Chimica et Natura Acta*, 4(1), pp.16-20.
- Seidel, T., Ibis, G., Bendix, F. and Wolber, G., 2010. Strategies for 3D pharmacophore-based virtual screening. *Drug Discovery Today: Technologies*, 7(4), pp.e221-e228.
- Spowage, B.M., Bruce, C.L. and Hirst, J.D., 2009. Interpretable correlation descriptors for quantitative structure-activity relationships. *Journal of cheminformatics*, 1(1), p.22.
- Wolber, G. and Langer, T., 2005. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *Journal of chemical information and modeling*, 45(1), pp.160-169.
- Woyach, J.A., Furman, R.R., Liu, T.M., Ozer, H.G., Zapatka, M., Ruppert, A.S., Xue, L., Li, D.H.H., Steggerda, S.M., Versele, M. and Dave, S.S., 2014. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *New England Journal of Medicine*, 370(24), pp.2286-2294