

QUERCETIN DERIVATIVES DOCKING BASED ON STUDY OF FLAVONOIDS INTERACTION TO CYCLOOXYGENASE-2

Docking Turunan Kuersetin Berdasarkan Studi Interaksi Flavonoid Terhadap Enzim Siklooksigenase-2

Rahmana Emran Kartasasmita^{1*}, Rina Herowati¹, Nuraini Harmastuti², and Tutus Gusdinar¹

¹School of Pharmacy, Bandung Institute of Technology, Jl. Ganesha 10 Bandung 40132

²Faculty of Pharmacy, Setia Budi University, Jl. Letjen Sutoyo Solo 57127

Received September 3, 2008; Accepted June 23, 2009

ABSTRACT

Due to their ability to inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2), certain flavonoids show anti-inflammatory effects. Quercetin is a flavonoid suitable to be chosen as the lead compound for development of safe anti-inflammatory agent, because in addition to its anti-inflammatory effect, quercetin shows also protective effect in gastrointestinal track. The objective of this research is to study the binding modes of certain flavonoids and predict the quercetin derivatives inhibition activity on COX-2 by means of docking method using ArgusLab 4.0.1 software. Some flavonoids (7-hydroxyflavone, apigenin, galangin, kaempferol, quercetin, naringenin and daidzein) and quercetin derivatives were used as ligands for docking study. The COX-2 structure was obtained from Brookhaven protein databank. After assigning hydrogen atoms and charges, computational docking was performed. The docking results were evaluated based on the binding energy and hydrogen bonding of the ligands on binding site of COX-2. A curve constructed by plotting binding energy versus logarithm of IC_{50} of flavonoids shows a good correlation with a regression equation of $\log IC_{50} = 0.8069 \Delta G_{bind} + 9.4456$ ($r = 0.9226$; $P < 0.05$). Applying this equation, the IC_{50} values of the quercetin derivatives were calculated. The predicted IC_{50} values of quercetin-3-O-acetate; 6-chloroquercetin, 3-O-acetate; 6,8-dibromoquercetin; 6,8-dichloroquercetin-3-O-acetate and 6,8-dibromoquercetin-3-O-acetate are lower than that of quercetin. These results show that only substitutions at certain position on quercetin with acetyl group, chlorine and bromine atoms increase the inhibitory activity of quercetin against COX-2.

Keywords: Docking, flavonoids, quercetin derivatives, cyclooxygenase-2, anti-inflammatory

PENDAHULUAN

Rancangan obat berbasis struktur (*Structure-Based Drug Design, SBDD*), dimana struktur tiga dimensi dari target obat digunakan sebagai dasar untuk pengembangan obat, saat ini berkembang pesat didukung oleh berkembangnya teknik rancangan obat dengan bantuan komputer (*Computer-Aided Drug Design, CADD*). Prediksi struktur tiga dimensi dari kompleks antara protein target dan kandidat obat berperan penting dalam SBDD. Saat ini banyak program komputer yang bisa digunakan untuk memprediksi interaksi antara protein-ligan, yang dikenal dengan istilah *docking*, seperti GOLD, FlexX, Glide, DOCK dan AutoDock [1]. ArgusLab merupakan salah satu perangkat lunak untuk pemodelan molekul yang juga menyediakan fasilitas *docking* (pada versi 4.0.1), dengan hasil *docking* yang bermakna secara biologis [2]. ArgusLab menyediakan dua jenis perangkat *docking*, yaitu ArgusDock dan GADock yang mampu melakukan *docking* molekular dengan cara menempatkan suatu ligan pada suatu tempat pengikatan (*binding site*) dari

reseptor, dengan memanfaatkan data struktur kristal sinar-x dari *Protein databank*. Akurasi dan signifikansi biologis GADock lebih baik dari pada ArgusDock, sehingga metode ini yang digunakan dalam penelitian ini [1].

Siklooksigenase (COX) atau prostaglandin-endoperoksida sintase (PGHS) merupakan enzim bifungsional yang mula-mula mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin G_2 (PGG_2) melalui dioksigenasi, kemudian mengkatalisis peroksidasi PGG_2 menjadi PGH_2 . PGH_2 adalah prekursor pembentukan beberapa mediator penting untuk nyeri, demam dan radang. Dikenal dua bentuk isoform enzim siklooksigenase, yaitu COX-1 dan COX-2. COX-1 merupakan enzim konstitutif yang berperan dalam regulasi beberapa proses selular, meliputi homeostatis vaskular, perlindungan saluran gastrointestinal dan fungsi ginjal. COX-2 bersifat terinduksi dan berada pada jaringan yang radang. Penghambatan enzim COX ini merupakan mekanisme kerja utama dari obat-obat antiradang nonsteroid yang banyak digunakan [3].

* Corresponding author. Tel/Fax : +62-8179230403/+62-022-2504852
Email address : emran_kartasasmita@yahoo.de

Beberapa flavonoid mempunyai aktivitas antiradang melalui penghambatan enzim siklooksigenase-2 (COX-2). Tabel 1 menunjukkan aktivitas penghambatan (dinyatakan dengan nilai IC_{50}) biosintesis COX-2 yang diinduksi lipopolisakarida pada makrofag peritoneal tikus oleh berbagai flavonoid [4]. Kuersetin merupakan salah satu flavonoid yang dipilih sebagai senyawa pemandu untuk pengembangan obat antiradang karena selain mempunyai aktivitas antiradang, juga mampu melindungi terhadap tukak lambung, sementara obat antiradang klasik justru mempunyai efek samping tukak lambung. Keterbatasan kuersetin adalah rendahnya bioavailabilitas, sehingga tidak aktif pada pemakaian oral [5-6]. Untuk menghasilkan turunan kuersetin dengan aktivitas antiradang yang kuat namun memiliki efek samping tukak lambung yang ringan diperlukan rancangan modifikasi kuersetin yang diawali dengan pemodelan dan komputasi molekul agar modifikasi dapat dilakukan secara terarah.

Docking beberapa flavonoid termasuk kuersetin sudah dilakukan terhadap enzim COX-1 untuk meramalkan aktivitas antiplatelet dengan metode CHARMM [7]. Asam-asam amino penyusun enzim COX-1 dan COX-2 hampir sama, dengan perbedaan utama adalah residu asam amino pada posisi A523 adalah isoleusin pada COX-1 dan valin pada COX-2. Residu valin yang relatif lebih kecil pada COX-2 membentuk daerah hidrofobik, dimana residu isoleusin pada COX-1 secara sterik lebih terhalang [8]. Halangan sterik ini nampak dari hasil penelitian di atas, dimana molekul flavonoid hanya berikatan dengan asam-asam amino di gerbang dari sisi aktif COX-1 yaitu arginin 120 dan tirosin 355. Sedangkan studi *docking* yang dilakukan oleh Zheng *et al.* menunjukkan bahwa untuk aktif sebagai inhibitor selektif COX-2 diperlukan interaksi ligan dengan residu histidin A90 dan serin A353 dari enzim COX-2 [9].

Penelitian ini dirancang untuk mengetahui afinitas dan interaksi antara flavonoid terhadap enzim COX-2, dengan cara melakukan perhitungan *docking* antara flavonoid tertentu sebagai ligan terhadap sisi pengikatan COX-2. Penelitian ini juga bertujuan untuk memprediksikan aktivitas penghambatan COX-2 dari

Tabel 1. Penghambatan biosintesis COX-2 yang diinduksi lipopolisakarida pada makrofag tikus oleh berbagai flavonoid

Flavonoid		IC_{50} (μ M)
Subklas	Nama	Residu OH
Flavon	7-Hidroksiflavanon	7
	Apigenin	5,7,4'
		3,3
Flavanol	Galangin	3,5,7
	Kaempferol	3,5,7,4'
	Kuersetin	3,5,7,3',4'
Flavanon	Naringenin	5,7,4'
		7,8
isoflavanon	Bidzein	7,4'
		37,8

Tabel 2. Struktur turunan kuersetin

Struktur inti kuersetin	Nama turunan kuersetin	R ₃	R ₆	R ₈
	Q-3OAc	COCH ₃	H	H
	Q-3OMe	CH ₃	H	H
	Q-6Cl	H	Cl	H
	Q-6Br	H	Br	H
	Q-6Cl,3OAc	COCH ₃	Cl	H
	Q-6Cl,3OMe	CH ₃	Cl	H
	Q-6Br,3OAc	COCH ₃	Br	H
	Q-6Br,3OMe	CH ₃	Br	H
	Q-6,8diBr	H	Br	Br
	Q-6,8diCl	H	Cl	Cl
	Q-6,8diCl-3OAc	COCH ₃	Cl	Cl
	Q-6,8diBr-3OAc	COCH ₃	Br	Br

beberapa turunan kuersetin melalui program *docking*. Mula-mula dibuat kurva korelasi antara nilai IC_{50} dari beberapa flavonoid dengan nilai energi ikatan yang didapatkan dari studi *docking*, sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Ji dan Zhang yang melakukan studi interaksi antara flavonoid dengan asetilkolin esterase (AChE) dan monoamin oksidase (MAO) [10]. Analog dengan metode di atas, pada studi ini, berdasarkan persamaan garis yang didapat dan nilai energi ikatan hasil studi *docking* nilai IC_{50} dari turunan kuersetin dapat dihitung. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar untuk melakukan penelitian eksperimental selanjutnya.

METODE PENELITIAN

Bahan

Struktur enzim COX-2 yang sudah berikatan dengan ligan, diperoleh dari *Protein Databank* (PDB), yaitu 6COX dengan ligan asli SC-558 (1-fenilsulfonamid-3-trifluorometil-5-para-bromofenilpirazol), suatu inhibitor selektif COX-2 [8]. Ligan uji yang digunakan adalah berbagai flavonoid dengan data IC_{50} eksperimental terhadap COX-2 (Tabel 1) serta beberapa turunan kuersetin (Tabel 2).

Alat

Alat yang digunakan adalah komputer dengan prosesor berkecepatan 1,86 GHz dan kapasitas memori 2 GB dengan perangkat lunak ArgusLab 4.0.1.

Prosedur Kerja

Optimasi geometri ligan

Masing-masing senyawa uji dibuat struktur tiga dimensinya, kemudian ditambahkan molekul hidrogen. Selanjutnya dilakukan optimasi geometri dengan metode mekanika kuantum AM1 (Austin Model 1) [11].

Evaluasi Pemilihan Metode dan Pengaturan Parameter Docking

Perhitungan *docking* dilakukan dengan menggunakan metode *docking Lamarckian Genetic Algorithm* (GADock) dan *Exhaustive Search* (ArgusDock), dengan resolusi grid 0,4 Å, dengan fungsi perhitungan energi bebas ikatan *Ascore*, sisi pengikatan : 23,409 x 18,141 x 23,742 angstrom, iterasi 1000 kali hingga dicapai nilai konvergensi 0,0016 kkal/mol. Validitas metode *docking* dievaluasi berdasarkan nilai RMSD (*root mean square deviation*) hasil tumpang tindih ligan *copy* SC-558 setelah di-*docking* terhadap sisi pengikatan enzim COX-2 dibandingkan dengan struktur tiga dimensi ligan SC-558 pada posisi pengikatan yang

sama dari hasil pengukuran menggunakan metode difraksi sinar X. Nilai RMSD menunjukkan perbedaan koordinat antara dua ligan. Semakin kecil nilai RMSD, semakin mirip kedua struktur ligan yang ditumpangtindihkan. Nilai RMSD yang masih dapat diterima yaitu < 2,0 [12,13].

Docking ligan terhadap enzim

Mula-mula dibuat sisi pengikatan (*binding site*) dari ligan asli, kemudian masing-masing senyawa uji di-*docking*-kan pada sisi pengikatan enzim COX-2 dengan metode terpilih dengan resolusi grid 0,4 Å, dengan fungsi perhitungan energi bebas ikatan *Ascore*, sisi pengikatan : 23,409 x 18,141 x 23,742 angstrom, iterasi 1000 kali hingga dicapai nilai konvergensi 0,0016 kkal/mol. *Docking* dilakukan dengan replikasi masing-masing 10 kali. Semua *docking* dilakukan dalam kondisi tanpa menghilangkan molekul air untuk mendekati dengan keadaan sebenarnya dalam tubuh [12].

Analisis hasil

Analisis hasil *docking* meliputi energi bebas ikatan dan ikatan hidrogen antara ligan dengan enzim. Kemudian dibuat kurva korelasi antara nilai log IC_{50} dengan energi bebas ikatan flavonoid-enzim. Kurva korelasi selanjutnya digunakan untuk memprediksikan aktivitas penghambatan enzim COX dari turunan kuersetin [9,10].

HASIL DAN PEMBAHASAN

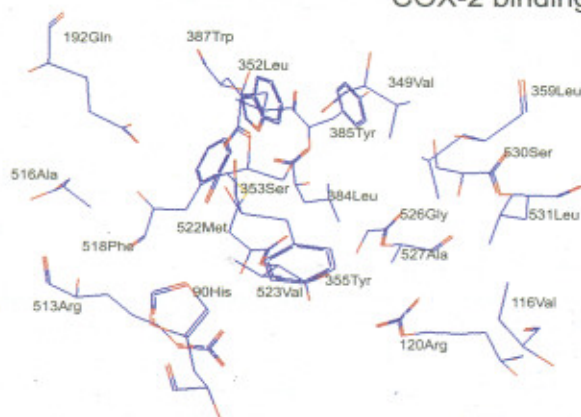
ArgusLab menyediakan dua fasilitas *docking engine*, yaitu ArgusDock (*ShapeDock* atau *Exhaustive Search*) dan GADock (*Lamarckian Genetic Algorithm Dock*). Kedua metode *docking* ini berbeda dalam hal pendekatan yang digunakan. Pada metode ArgusDock ligan hanya diarahkan pada suatu posisi tertentu dalam struktur molekul target, sedangkan pada metode GADock, ligan diarahkan pada berbagai posisi yang memungkinkan. Hal ini menyebabkan metode ArgusDock bersifat reproduibel sedangkan metode GADock bersifat nonreproduibel. Pada metode GADock untuk mendapatkan hasil *docking* yang valid perlu dilakukan replikasi, menurut pustaka yang ada minimal 10 kali [12].

Docking ligan *copy* SC558 terhadap sisi pengikatan COX-2 dengan metode ArgusDock memberikan nilai RMSD sebesar 13,4355 Å, sedangkan metode GADock hanya 0,65319 Å. Hal ini menunjukkan bahwa metode GADock dan pengaturan parameter perhitungan yang digunakan sudah memenuhi kriteria validitas metode *docking* (RMSD < 2,0 Å). Gambar 1 menunjukkan perbandingan konformasi antara SC558 dari struktur kristal sinar-X

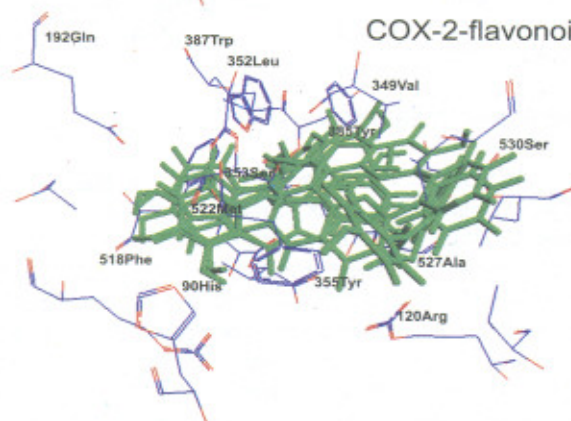


Gambar 1. Perbandingan konformasi antara SC-558 dari struktur kristal sinar-X (hitam) dengan hasil perhitungan *docking* (abu-abu)

COX-2 binding site



COX-2-flavonoid



Gambar 2. Sisi pengikatan COX-2 (atas) dan interaksinya terhadap berbagai flavonoid (bawah)

dari kompleks SC558-COX2 dengan konformasi yang diperoleh dari perhitungan *docking* menggunakan GADock. Walaupun memberikan konformasi yang sedikit berbeda, tapi ligan *copy* maupun ligan asli berinteraksi dengan enzim COX-2 melalui cara yang sama, yaitu terbentuknya ikatan hidrogen antara atom O dari gugus sulfonil ligan dengan atom N dari residu fenil alanin nomor 518, dengan jarak ikatan 2,4 angstrom. Interaksi lain seperti ikatan hidrofobik, van der waals, tidak dapat diperlihatkan menggunakan *software* ArgusLab.

Gambar 2 menunjukkan interaksi antara berbagai flavonoid dengan COX-2. Pada Gambar tersebut dapat diamati bahwa residu asam amino yang terlibat dalam interaksi adalah serin A530, serin A353, tirosin A355, tirosin A385, histidin A90, alanin A527, arginin A513, glisin A192, leusin A352 dan fenilalanin A518. Hal ini sejalan dengan studi yang dilakukan Akaho et al [14] tentang model pengikatan berbagai anti-radang nonsteroid klasik dengan program Dock 4.0 yang menyatakan bahwa residu-residu asam amino yang sering berinteraksi dengan obat adalah serin A530, serin A353, tirosin A355, tirosin A385, histidin A90, alanin A527, arginin A120, valin A349, glisin A192, leusin A352, tripsin A387, fenilalanin A518, dan metionin A522.

Fasilitas *docking* ArgusLab menyediakan satu fungsi perhitungan energi bebas ikatan, yaitu *Ascore*, serta hanya menampilkan interaksi berupa ikatan hidrogen. Nilai akhir energi bebas ikatan (*Ascore*) yang didapat merupakan kontribusi dari bermacam efek berdasarkan persamaan berikut :

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{hydrophobic}} + \Delta G_{\text{H-bond}} + \Delta G_{\text{H-bond (chg)}} + \Delta G_{\text{deformation}} + \Delta G_0$$

Persamaan di atas menyatakan bahwa yang berkontribusi dalam hasil akhir perhitungan energi bebas ikatan berturut-turut adalah ikatan van der waals, efek hidrofobik, efek ikatan hidrogen dari atom-atom netral, efek ikatan hidrogen atom-atom bermuatan, efek jumlah ikatan berotasi dan nilai dari regresi. Dengan demikian penentuan afinitas berdasarkan nilai terendah energi bebas ikatan (ΔG) lebih diutamakan daripada jumlah ikatan hidrogen.

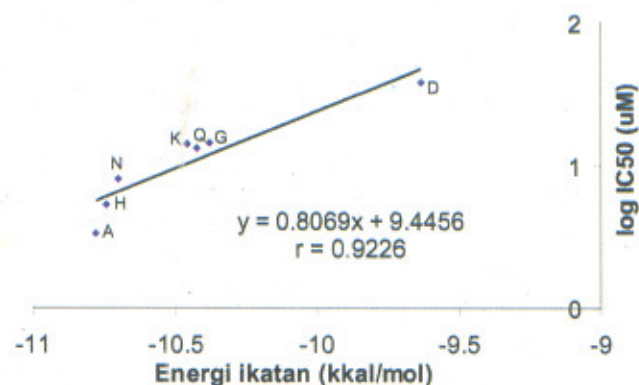
Secara eksperimental energi bebas (ΔG) berhubungan langsung dengan konstanta inhibisi (K_i), sesuai persamaan : $\Delta G = -RT \ln K_i$. Dengan demikian nilai energi bebas ikatan dapat digunakan untuk memprediksikan kemampuan suatu senyawa untuk menghambat enzim [14]. Nilai energi bebas ikatan terendah dari masing-masing flavonoid yang diperoleh dari studi *docking* dikorelasikan dengan $\log IC_{50}$, sehingga didapat persamaan $\log IC_{50} = 0,8069 \Delta G_{\text{bind}} + 9,4456$ dengan nilai $r = 0,9226$, $n = 7$, $F = 28,590$, $s = 0,145$ (Gambar 3). Analisis regresi linear menunjukkan korelasi yang baik antara potensi IC_{50} eksperimental dari flavonoid dengan nilai energi bebas ikatan (ΔG). Hal ini menunjukkan bahwa program komputasi *docking* dengan metode GADock ini dapat digunakan untuk memprediksikan aktivitas penghambatan COX-2 dari turunan kuersetin.

Turunan kuersetin yang digunakan sebagai ligan dalam studi *docking* selanjutnya adalah turunan 3-O-metil, 3-O-asetil, 6-kloro, 6,8-dikloro, 6-bromo, 6,8-dibromo dan kombinasi dari turunan-turunan tersebut. Turunan metil dan asetil diharapkan akan meningkatkan lipofilitas kuersetin sehingga

meningkatkan bioavailabilitas oralnya, sedangkan turunan kuersetin terklorinasi dan terbrominasi diharapkan mampu meningkatkan aktivitas antioksidan sehingga mengurangi resiko efek samping tukak lambung. Dari hasil perhitungan energi ikatan antara berbagai ligan dan COX-2, yang dinyatakan sebagai energi bebas Gibbs, diketahui urutan kekuatan interaksi adalah Q-6Cl,3OAc; Q-6,8diBr-3OAc; Q-6,8diCl-3OAc; Q-6,8diBr; Q-3OAc; Q-6Br,3OMe; Q-6Br,3OAc; Q-6,8diCl; Q-6Br; Q-6Cl,3QMe; Q-3OMe dan Q-6Cl.

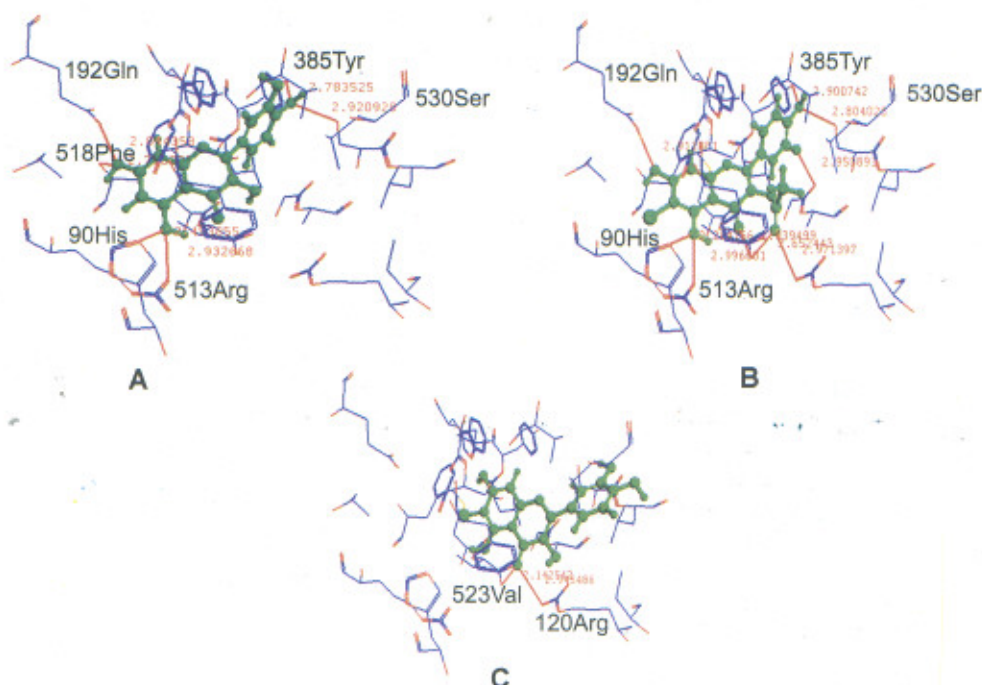
Metode GADock memposisikan kuersetin pada sisi pengikatan COX-2 serupa dengan flavonoid lain, yaitu gugus 5-OH dan 7-OH pada cincin sinamoil berinteraksi dengan residu glisin A192, fenil alanin A518, histidin A90 dan arginin A513, sedangkan gugus 3'-OH dan 4'-OH pada cincin benzoil berinteraksi dengan residu tirosin A385 dan serin A530 (Gambar 4a). Turunan kuersetin dengan kekuatan interaksi tertinggi yaitu Q-6Cl,3OAc (6-klorokuersetin-3-O-asetat) juga diposisikan pada daerah yang sama. Dapat diamati bahwa gugus karbonil dari gugus asetil membentuk ikatan hidrogen dengan residu arginin A120, serta bersama dengan gugus karbonil pada C4 membentuk ikatan hidrogen dengan residu tirosin A355 (Gambar 4b). Hal ini meningkatkan kekuatan interaksi dibandingkan kuersetin. Turunan kuersetin dengan kekuatan interaksi terendah yaitu Q-6Cl (6-klorokuersetin) diposisikan pada daerah yang berbeda dari kuersetin (Gambar 4c).

Prediksi nilai IC_{50} turunan kuersetin dilakukan dengan memasukkan nilai energi bebas ikatan terendah turunan kuersetin dalam kurva korelasi di atas. Hasilnya menunjukkan bahwa turunan Q-3OAc; Q-6Cl,3OAc; Q-6,8diBr; Q-6,8diCl-3OAc dan Q-6,8diBr-3OAc diprediksikan mempunyai aktivitas penghambatan terhadap COX-2 lebih tinggi dibanding kuersetin (Tabel 3).



Keterangan : A (Apigenin), H(7-Hidroksi flavon), N (Naringenin), K (Kaempferol), Q (Kuersetin), G (Galangin), D (Daidzein)

Gambar 3. Korelasi antara $\log IC_{50}$ dan energi bebas ikatan antara flavonoid-COX-2



Gambar 4. Interaksi sisi pengikatan COX-2 dengan (A) kuersetin, (B) 6-klorokuersetin-3-O-asetat dan (C) 6-klorokuersetin

Tabel 3. Data energi bebas ikatan turunan kuersetin - COX-2 dan IC₅₀ prediksi

No	Kode turunan kuersetin	Energi bebas ikatan (kkal/mol)	IC ₅₀ prediksi (μM)
1	Kuersetin (Q)	-10,46	10,13
2	Q-3OAc	-10,60	7,81
3	Q-3OMe	-8,79	225,37
4	Q-6Cl	-8,13	768,25
5	Q-6Br	-10,18	17,04
6	Q-6Cl,3OAc	-11,83	0,79
7	Q-6Cl,3OMe	-10,07	20,90
8	Q-6Br,3OAc	-10,37	11,97
9	Q-6Br,3OMe	-10,39	11,53
10	Q-6,8diBr	-10,71	6,36
11	Q-6,8diCl	-10,19	16,72
12	Q-6,8diCl-3OAc	-11,26	2,29
13	Q-6,8diBr-3OAc	-11,62	1,17

* diperoleh dengan memasukkan energi ikatan dalam persamaan $\log IC_{50} = 0,8069 \Delta G_{bind} + 9,4456$

KESIMPULAN

Ada korelasi antara energi bebas ikatan dengan nilai log IC₅₀ flavonoid terhadap COX-2, dengan persamaan regresi $\log IC_{50} = 0,8069 \Delta G_{bind} + 9,4456$, $r = 0,9226$. Turunan Q-3OAc; Q-6Cl,3OAc; Q-6,8diBr; Q-6,8diCl-3OAc dan Q-6,8diBr-3OAc diprediksikan mempunyai aktivitas penghambatan terhadap COX-2 lebih tinggi dibanding kuersetin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Kementerian Negara untuk Riset dan Teknologi atas dana Program Insentif Riset Terapan tahun 2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Oda, A., Okayasu, M., Kamiyama, Y., Yoshida, T., Takahashi, O., and Matsuzaki, H., 2007, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 80, 10, 1920-1925.
- Joy, S., Nair, P.S., Hariharan, R., and Pillai, M.R., 2006, *In Silico Biology*, 6, 53.
- Soberman, R.J. and Christmas, P., 2003, *J. Clin. Invest.*, 111, 1107-1113.
- Takano-Ishikawa, Y., Goto, M., And Yamaki, K., 2006, *Phytomedicine*, 13, 5, 310-317.
- Chen, Y.C., Shen, S.C., Lee, W.R., Hou, W.C., Yang, L.L., and Lee, T.J., 2001, *J. Cell. Biochem.*, 82, 537-548.
- Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., and Morikawa, S., 2003, *Life Sci.*, 26, 6, 709-21.
- Wu, C.M., Wu, S.C., W., Chung, W.J., Lin. H.C., Chen, K.T., Chen, Y.C., Hsu, M.F., Yang, J.M., Wang, J.P., and Lin, C.N., 2007, *Int. J. Mol. Sci.*, 8, 830-841.
- Kiefer, J.R., Pawlitz, J.L., Moreland, K.T., Stegeman, R.A., Hood, W.F., Gierse, J.K., Stevens, A.M., Goodwin, D.C., Rowlinson, S.W., Marnett, L.J., Stallings, W.C., and Kurumbail, R.G., 2000, *Nature*, 405, 97-101.
- Zheng, M., Zhang, Z., Zhu, W., Liu, H., Luo, X., Chen, K. and Jiang, H., 2006, *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 3428-3437.
- Ji, H.F. and Zhang, 2006, *J. Mol. Struct., THEOCHEM*, 767, 3-9.
- Anonymous, 2004, ArgusLab 4.0.1., Tutorial and FAQs, Mark Thompson and Plannaria Software LLC.
- Akaho, E., Fujikawa, C., Runion, H.I., Hill, C.R., and Nakano, H., 1999, *DOCK : Applied Structure-Based Drug Design*, University of California, San Francisco.
- Morris, G.M., and Lim-Wilby, M., "Molecular Docking" in *Methods in Molecular Biology*, vol. 443, *Molecular Modeling of Proteins*. Eds. Andreas Kukol., Humana Press, New Jersey, 2001, 365-83.
- Akaho, E., Morris, G., Goodsell, D., Wong, D., and Olson A., 2001, *J. Chem. Software*, 7 (3), 416-231.