

Studi Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas, Fitur Farmakofor, dan Docking Molekuler Senyawa Turunan Pirazolo-[3,4-d]-pirimidin sebagai Inhibitor Mer Tirosin Kinase

*Daryono Hadi Tjahjono¹ dan Nursalam Hamzah^{1,2}

¹Kelompok Keilmuan Farmakokimia, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10 Bandung 40132

²Fakultas Ilmu Kesehatan, UIN Alauddin, Jalan Sultan Alauddin No. 36, Samata Gowa

Abstrak

Mer Tirosin Kinase diekspresikan secara ektopik dalam sel T dan B pasien Leukemia Limfoblastik Akut (LLA), tetapi tidak diekspresikan pada sel T dan B manusia normal pada setiap tahap perkembangannya. Oleh karena itu, Mer Tirosin Kinase dapat menjadi target pengobatan LLA dengan selektivitas yang baik. Penghambatan fosforilasi reseptor Mer oleh suatu inhibitor transduksi sinyal dapat menurunkan proliferasi sel dan meningkatkan apoptosis, sehingga menekan perkembangan sel leukemia. Pirazolo-[3,4-d]-pirimidin adalah obat generasi baru yang bertindak sebagai inhibitor dari Mer Tirosin Kinase. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan deskriptor yang berpengaruh terhadap aktivitas penghambatan reseptor Mer Tirosin Kinase, menentukan fitur farmakofor ligan dan reseptor yang penting pada pengikatan ligan reseptor dan mempelajari model dan nilai energi bebas interaksi pirazolo-[3,4-d]-pirimidin dengan Mer. Pemodelan dan optimasi geometri menggunakan perangkat lunak HyperChem[®]. Struktur molekul optimasi geometri menggunakan metode *Ab initio*. Nilai prediktor dihitung menggunakan MOE[®] dan perhitungan statistik untuk menyusun persamaan HKSA menggunakan SPSS[®]. Persamaan terpilih ditentukan dengan kriteria statistik terbaik, yaitu r^2 , korelasi pearson, dan q^2 validasi *Leave One Out*. Penentuan fitur farmakofor menggunakan 'Pharmacophore Query Editor' dalam perangkat lunak MOE, dengan menggunakan model senyawa hasil optimasi. Studi Docking Molekuler menggunakan 'Simulations Dock' dimana nilai scoring dihitung menggunakan pendekatan *London dG*. Deskriptor yang paling berperan penting berturut-turut yaitu mr, vdw vol, ASA_H, log S dan Energi LUMO. Fitur farmakofor ligan tersusun atas satu donor proton, satu akseptor proton, satu kation dan donor proton, dan satu aromatik. Jarak fitur kation dan donor proton dengan aromatik (6.92 Å) penting untuk dipertahankan sebagai inhibitor Mer. Fitur farmakofor reseptor tersusun atas satu akseptor proton (Met 674), tiga donor proton (Pro 672, Arg 727 dan Asn 728) dan satu anion (Asp 678), yang penting dalam pengikatan dengan fitur farmakofor ligan. Seluruh senyawa turunan pirazolo-[3,4-d]-pirimidin memiliki *scoring* yang baik dimana senyawa 40 memiliki nilai terbaik yaitu -12.7584 kkal/mol.

Kata kunci: leukemia limfoblastik akut, pirazolo-[3,4-d]-pirimidin, Mer, HKSA, fitur farmakofor.

Abstract

Mer Tyrosine Kinase is ectopically expressed in T and B cells of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) patient, but is not expressed in normal human T and B cells at any stage of its development. Therefore Mer Tyrosine Kinase can be a treatment target *all* with a good selectivity. Phosphorylation inhibition of Mer receptor by signal transduction inhibitor decreases cell proliferation and increases apoptosis, thereby suppressing the development of leukemia cells. Pirazolo-[3,4-d]-pyrimidines are a new generation of drugs that act as inhibitors of Mer Tyrosine Kinase. The purposes of the present search are to determine descriptors that influence the inhibitory activity on Mer receptor Tyrosine Kinase, to determine the ligands pharmacophore features and receptors which play important roles in ligand-receptors binding and to study model and free energy value of pirazolo-[3,4-d]-pyrimidines with Mer interactions. Modeling and optimization geometry was carried out using HyperChem[®] software. Molecules structure were geometrically optimized using *Ab initio* method. Predictors values were computed using MOE[®] and statistical calculations of QSAR equations was carried out using SPSS[®]. The selected equation was determined by the best statistical criteria, such as r^2 , Pearson correlation, and q^2 *Leave One Out* validation. Determination of pharmacophore features used optimized model structure using 'Pharmacophore Query Editor' in the MOE software. The study Molecular docking used 'Simulations Dock' where the scoring values were calculated using the London Gapproach. The most important descriptors were mr, vdw, ASA_H, logS and LUMO energy. Ligands pharmacophore features were composed of a proton donor, a proton acceptor, one cations and proton donors, and aromatic. Distance (6.92 Å) between cation and proton donors features with aromatic group play important role as Mer inhibitors. Receptor pharmacophore features were composed of a proton acceptor (Met 674), three proton donors (Pro 672, Arg727 and Asn728) and one anion (Asp 678), which is important in the binding with ligand features pharmacophore. All of pirazolo-[3,4-d]-pyrimidines derivatives had good docking score where as compound 40 had the best scoring -12.7584 kcal/mol.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidine, Mer, QSAR, pharmacophore features

* Penulis korespondensi, e-mail: daryonohadi@fa.itb.ac.id

Pendahuluan

Leukemia merupakan penyakit yang jarang terjadi, tetapi insiden kematiannya cukup tinggi. Pada tahun 2008, insiden leukemia untuk setiap 100.000 penduduk pada negara maju adalah 9,1 untuk pria dan 6,0 pada wanita dengan kematian pada pria 53% dan wanita 48% dari total pasien. Sedangkan untuk negara berkembang adalah 4,5 untuk pria dan 3,6 pada wanita dengan kematian pada pria 82% dan wanita 80% dari total pasien. Terdapat 5,8 (2.8%) insiden leukemia dari 206 pasien kanker untuk setiap 100.000 penduduk (Jemal et al. 2008).

Umumnya leukemia terbagi atas dua yaitu akut dan kronik. Hal ini didasarkan pada perbedaan dalam sel asal dan pematangan sel *line*, presentasi klinis, cepatnya perkembangan penyakit yang tidak diobati, dan respon terhadap terapi. Empat leukemia utama yang diakui: leukemia limfositik (atau limfoblastik) akut (*Acute Lymphoblastic Leukemia/ALL*), leukemiamieloid akut (*Acute Myeloid Leukemia/AML*), leukemia limfositik kronis (*Chronic Lymphocytic Leukemia/CLL*), dan leukemia mieloid kronis (*Chronic Myeloid Leukemia/CML*). Leukemia akut adalah kanker yang paling umum pada anak-anak dan penyebab utama kematian terkait kanker pada pasien yang lebih muda dari usia 35 tahun (Dipiro et al. 2008).

Mer adalah anggota dari keluarga reseptor tirosinkinase, disebut sebagai keluarga (Tyro3/Axl/Mer) TAM. Keluarga ini memiliki urutan kinase domain yang unik dan tentunya memiliki potensi untuk menjadi target selektif sehubungan dengan berbeda keluarga kinase lainnya. Mer tidak ditemukan dalam sel T dan B manusia dan tikus pada setiap tahap perkembangan limfosit, tetapi ditemukan sangat besar dalam sampel sel T *ALL* dan sel B *ALL*, akibat translokasi E2A-PBX1 yang secara drastis menghasilkan Mer-RNA. Ekspresi ektopi kini telah diidentifikasi sebagai produk sebagai kelangsungan hidup sel tumor pada sel *ALL* dan penyebab potensi resistensi kimia *ALL*.

Sebagaimana umumnya kelompok reseptor tirosin kinase (RTK), Mer terdapat pada membran sel (*trans-membran*) yang menghubungkan antara lingkungan ekstraselular ke sitoplasma dan nukleus. Reseptor TAM berfungsi sebagai reseptor *signaling* dalam regulasi pembersihan makrofag sel apoptosis, agregasi platelet dan diferensiasi sel NK (*natural killer cells*) (Linger et al. 2008).

ALL merupakan salah satu kanker ganas yang paling umum pada anak-anak. Pengobatan menggunakan kemoterapi saat ini masih menimbulkan masalah yang berhubungan dengan toksisitas jangka pendek dan

jangka panjang. Oleh karena itu, senyawa baru dengan toksisitas yang rendah yang diperlukan. Reseptor Mer Tirosin Kinase yang diekspresikan secara ektopik dalam sampel sel *ALL*. Penghambatan ekspresi Mer mengurangi sinyal pro-hidup (*pro-survival signal*), khemosensitivitas meningkat, sehingga menunda perkembangan sel leukemia. Inhibitor Mer Tirosin Kinase adalah kandidat yang sangat baik sebagai target pengobatan leukemia. Pengembangan senyawa pirazolopirimidin menunjukkan keberhasilan sebagai strategi baru dalam pengobatan *ALL*.

Liu et al. (2012) telah melakukan studi SAR (*Structure Activity Relationship*) senyawa turunan pirazolo-[3,4-d]-pirimidin terhadap aktivitas inhibisi enzim Mer Tirosin Kinase (MERTK) berdasarkan konstanta inhibisi ATP menggunakan *microfluidic capillary electrophoresis (MCE)*. Liu et al. (2012) juga telah mengelucidasi struktur kokristal Mer dikompleks dengan senyawa 43 turunan pirazolo-[3,4-d]-pirimidin ditentukan pada resolusi 2.69 Å dengan modulus pengikatannya. Dari data tersebut dibuat studi HKSA terhadap senyawa turunan pirazolo-[3,4-d]-pirimidin. Hasil HKSA ini akan diterapkan untuk memprediksi beberapa senyawa turunan pirazolo-[3,4-d]-pirimidin. Hasil prediksi aktivitas diharapkan berguna dalam menentukan senyawa mana yang akan dilakukan sintesis dan uji selanjutnya. Selain itu, juga ditentukan fitur farmakofor yang berperan dalam pengikatan ligan pada reseptor. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh model HKSA dan fitur farmakofor senyawa turunan pirazolo-[3,4-d]-pirimidin yang berperan dalam pengikatan ligan-reseptor.

Percobaan

Software

HyperChem[®] Release 8.0, *Molecular Operating Environment (MOE 2009.10)*, *SPSS Statistics 17.0*.

Hardware

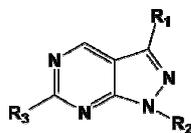
Prosesor: Intel[®] Core™ i5-3210M CPU @ 2.50 GHz 2.50 GHz; RAM: 4 GB; Tipe sistem: 64 bit *Operating System*; Sistem Operasi: *Windows*[®] 7 *Professional*.

Prosedur

Penyusunan model persamaan HKSA

Pemodelan struktur senyawa dibuat dengan menggunakan paket program *HyperChem*. Senyawa-senyawa ini merupakan senyawa turunan pirazolo-[3,4-d]-pirimidin sesuai dengan hasil penelitian Liu et al. (2012), sebanyak 14 senyawa. Pembuatan model terdiri atas pemilihan atom, jenis ikatan, dan muatan

total dari molekul uji. Struktur tiga dimensi (3D) setiap senyawa disimpan dalam format ekstensi *.hin.



Gambar 1. Struktur senyawa pirazolo-[3,4-d]-pirimidin dengan tiga posisi substituen.

Struktur senyawa dioptimasi dengan perangkat lunak *HyperChem* menggunakan metode *Ab initio* dengan parameter basis set minimal dan *convergence limit* 10^{-5} . File yang telah dioptimasi disimpan dalam format ekstensi *.mol. Hasil perhitungan *Ab initio* lebih akurat bila dibandingkan dengan semi empirik, sebab *Ab initio* menyelesaikan semua persamaan mekanika kuantum secara eksak dan semua elektron yang ada diperhitungkan (Pranowo dan Hetadi 2011).

Sebanyak 14 senyawa yang akan dihitung nilai deskriptornya dibuka dengan MOE dan digabungkan dalam satu file dengan format *.mdb. Nilai deskriptor dihitung menggunakan perangkat lunak MOE. Sebanyak 13 sifat kimia fisika dihitung yang mewakili parameter hidrofobik, elektronik dan sterik, sesuai dengan model HKSA dengan pendekatan Hansch.

Tabel 1. Daftar Deskriptor

No	Simbol pada software	Simbol Umum	Deskriptor
1	AM1_dipole	μ	Momen dipol
2	AM1_E	E_{Tot}	Energi total
3	AM1_Eele	E_{Elec}	Energi elektronik
4	AM1_HOMO	E_{HOMO}	Energi HOMO
5	AM1_LUMO	E_{LUMO}	Energi LUMO
6	AM1_HF	HF	Panas pembentukan
7	ASA_H	\AA	Luas permukaan hidrofobik
8	Glob	glob	Globularitas
9	log P (o/w)	log P	Koefisien partisi
10	log S	log S	Logaritma kelarutan dalam air
11	Mr	MR	Refraktivitas molar
12	vol_vdw	Vw	Volume Van Der Waals
13	Vol	vol	Volume molekuler

Pencarian model persamaan terbaik menggunakan variabel tak bebas aktivitas inhibisi Mer ($\log 1/IC_{50}$) hasil eksperimen dan variabel bebas yang digunakan berupa nilai deskriptor. Semua variabel dianalisis menggunakan regresi multilinear metode *enter*. Hasil yang diperoleh berupa persamaan HKSA beserta nilai parameter statistik seperti nilai r , r^2 dan F . Nilai F menunjukkan kemaknaan hubungan bila dibandingkan dengan F tabel. Nilai F adalah indikator

bilangan untuk menunjukkan bahwa hubungan, yang dinyatakan oleh persamaan yang didapat, adalah benar atau merupakan kejadian kebetulan. Untuk mendapatkan model dengan nilai r tertinggi, dilakukan eliminasi senyawa yang memiliki deviasi terbesar berdasarkan nilai Z pada hasil komputasi MOE, dimana struktur senyawa dengan nilai $Z > 2$ dieliminasi dari perhitungan statistik. Selain parameter statistik tersebut, dari hasil perhitungan diperoleh juga nilai tetapan dan nilai koefisien setiap variabel bebas yang terlibat dalam persamaan yang dihasilkan. Nilai koefisien yang diperoleh digunakan untuk menghitung aktivitas inhibisi teoritis.

10 model persamaan terbaik selanjutnya divalidasi silang dengan metode *Leave One Out*, yaitu dengan cara setiap senyawa terprediksi dihilangkan dalam perhitungan analisis regresi linear. Nilai q^2 sebagai hasil validasi silang, dihitung menurut persamaan:

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2}$$

y_i = aktivitas eksperimen senyawa ke- i

\bar{y} = aktivitas eksperimen rata-rata

\bar{y}_i = aktivitas prediksi validasi silang senyawa ke- i

Selain itu, dihitung pula nilai korelasi Pearson, untuk menilai apakah deskriptor dalam persamaan tersebut memiliki hubungan korelasi dengan aktivitas ($\log 1/IC_{50}$). Persamaan HKSA yang dipilih adalah persamaan dengan nilai kriteria statistik terbaik dan memenuhi kriteria validasi yaitu $q^2 \geq 0.5$ (Jin Can *et al.* 2008).

Penentuan Fitur Farmakofor Reseptor dan Ligan

Farmakofor menurut *IUPAC* adalah faktor sterik dan elektronik yang diperlukan untuk memastikan terjadinya interaksi molekuler optimal dengan struktur target biologis spesifik sebagai penginduksi atau penghambat respon biologis (Mannhold *et al.* 2006).

Fitur farmakofor dibuat dengan mempertimbangkan model PLIF (*Protein Ligand Interaction Features*). Sidik jari interaksi protein dengan ligan dibuat dengan menggunakan 4 struktur protein yang diunduh dari situs RSCB PDB. Seluruh struktur kemudian dibuka pada Jendela MOE dan disejajarkan sehingga rantai yang memiliki struktur yang sama yang akan bergerak bersama-sama sebagai satu unit. Dengan cara ini kompleks protein-ligan dapat disejajarkan. File kemudian disimpan sebagai database dan dilakukan analisis *PLIF*.

Fitur farmakofor ditentukan melalui tiga tahapan yaitu membuat database konformasi dengan menggunakan satu set senyawa yang telah dioptimasi, membuat

Query pharmacophore dengan memilih titik anotasi berdasarkan pengikatan ligan protein yang hasil analisis *PLIF*, kemudian penyempurnaan struktur *Query* yang dapat *hit* dengan konformasi senyawa-senyawa aktif.

Docking Molekuler

Pendekatan yang digunakan adalah semi *rigid*, dimana struktur protein dibuat *rigid* sedangkan ligan fleksibel. Metode pendekatan ini akan memberikan kemungkinan interaksi dalam berbagai konformasi ligan sehingga memungkinkan untuk mendapatkan hasil yang terbaik. Jumlah bentuk konformasi yang memungkinkan sesuai dengan banyaknya ikatan *rotatable* yang ada (Patrick 2009). Tahapan prosedur *docking* terdiri dari tiga langkah, yaitu preparasi ligan, preparasi protein dan simulasi *docking*.

Ligan yang telah dioptimasi dengan metode *Ab initio* menggunakan perangkat lunak *HyperChem*, diprotonisasi untuk menambahkan hidrogen dan muatan parsial. dengan setting pH 7,4 dan *cutoff* 10,0. File kemudian disimpan dalam database (*.mdb).

Struktur reseptor diunduh dari situs *RSCB.PDB* dengan kode 3TCP dalam format *.pdb/ent. Molekul air kemudian dihapus dari struktur. Protein kemudian diprotonisasi dengan langkah yang sama pada preparasi ligan. Asam amino arginin, lisin dan histidin yang memiliki gugus basa akan mengion pada pH 7,4 sehingga membentuk lingkungan kationik. Gugus-gugus asam seperti rantai samping karboksilat asam aspartat dan glutamat akan terdeprotonisasi menghasilkan gugus anion COO⁻ yang dapat berinteraksi dengan gugus kation (Levita dan Mustarichie 2012).

Ligan dan Reseptor yang telah diprotonisasi dibuka dalam Jendela MOE. Panel Simulasi *docking* dibuka. Pada panel, *Placement* diatur *Triangle Matcher*, *rescoring 1* menggunakan *London dG*, dan *refinement* diatur *Force Field*. Posisi *docking* terbaik dipilih berdasarkan kedekatan dengan struktur ligan alami dan nilai *scoring* terendah.

Hasil dan Pembahasan

Kajian HKSA

Kajian HKSA menggunakan 14 senyawa. Pemilihan senyawa-senyawa ini didasarkan pada kemiripan kerangka struktur dari senyawa tersebut, dan aktivitas inhibisi Mer diperoleh dari hasil penelitian Liu et al. (2012). Nilai deskriptor untuk setiap senyawa dihitung dengan program MOE. Senyawa-senyawa yang digunakan harus memiliki nilai Z aktivitas ≤ 2 ,

yang berarti bahwa IC₅₀ berada dibawah 2 kali simpangan baku.

Hasil perhitungan prediktor yang didapat selanjutnya dianalisis statistik menggunakan analisis regresi multilinier dengan bantuan perangkat lunak SPSS 17. Prediktor-prediktor tersebut diregresikan terhadap aktivitas inhibisi Mer (Log 1/IC₅₀, μM) sebagai variabel dependen. Prediktor-prediktor diposisikan sebagai variabel independen pada proses analisis regresi dikombinasikan antara satu dengan lainnya dengan kombinasi 3 – 5 jenis prediktor.

Hasil regresi multilinier tersebut kemudian disusun dan diranking berdasarkan nilai parameter statistik, meliputi koefisien korelasi (r), koefisien regresi (r²), standar error (SE), kriteria Fischer (F). 10 model persamaan terbaik kemudian divalidasi silang *leave-one-out* (LOO) menggunakan kriteria q². Model persamaan harus memenuhi kriteria yaitu nilai q² $\geq 0,5$.

Pemeriksaan aktivitas prediksi yang dibuat oleh model ini dibandingkan dengan aktivitas eksperimen tidak menunjukkan pola yang jelas jika hanya aktivitas prediksi molekul yang diperiksa. Namun, jika pemeriksaan meliputi nilai q², pola akan mulai berkembang. Nilai q², dalam konteks ini, merupakan selisih kesalahan dimana adanya ketidaksesuaian model. Nilai-nilai q² yang mendekati nilai 1 menunjukkan jumlah yang lebih kecil dari kesalahan, dan nilai-nilai yang lebih kecil dari 1 menunjukkan kuantitas yang lebih besar dari kesalahan yang tersisa. Nilai negatif dari q² menunjukkan ketidaksesuaian yang besar.

Tabel 2. Nilai Aktivitas dan Z

Molekul	Log sepe _r IC ₅₀ Mer	Nilai Z Mer
9	-0,3802	0,6603
10	-1,4472	1,4023
12	-0,9823	0,9618
13	0,0655	0,2185
14	0,6778	0,1561
15	0,6990	0,1951
16	1,2518	1,6842
17	0,7447	0,7226
39	2,7447	0,1989
40	3,1192	1,4721
41	3,6021	1,7069
42	3,8239	0,1422
43	2,5376	0,9484
44	2,5229	1,0788

Model HKSA yang dipilih adalah model dengan nilai kriteria statistik terbaik. Tabel 3 menyajikan komparasi 4 kriteria statistik dari model-model persamaan yang memiliki nilai koefisien regresi r² dan

validasi silang LOO q^2 tertinggi. Kedua nilai kriteria model-model persamaan ini tidak jauh berbeda sehingga sulit untuk menentukan persamaan terbaik jika hanya menggunakan kedua nilai kriteria ini. Untuk itu perlu ditentukan pula kriteria statistik lain yaitu koefisien regresi kurva hubungan IC_{50} eksperimen dengan prediksi dan nilai korelasi Pearson deskriptor. Persamaan 1 dipilih sebagai model untuk HKSA inhibitor Mer sebab memiliki nilai koefisien regresi kurva hubungan IC_{50} eksperimen dengan prediksi lebih tinggi dibandingkan persamaan 3.

Tabel 3. Kombinasi Deskriptor dengan Nilai Kriteria Statistik dan Validasi *Leave One Out* (q^2)

No	Prediktor	r^2	F	q^2
1	vdw_vol, AM1_LUMO, LogS, ASA_H, mr	0,9893	148,5	0,9664
2	vdw_vol, AM1_LUMO, AM1_HF, AM1_HOMO, AM1_E	0,9880	131,6	0,9468
3	vdw_vol, AM1_LUMO, LogP, AM1_HOMO, mr	0,9869	120,7	0,9699
4	vdw_vol, LogS, glob, ASA_H, mr	0,9856	109,5	0,9503
5	vol, AM1_LUMO, AM1_HF, AM1_HOMO, AM1_E	0,9854	107,9	0,9602
6	vol, AM1_LUMO, LogP, AM1_HOMO, mr	0,9852	106,8	0,9636
7	vdw_vol, AM1_LUMO, glob, LogS, mr	0,9850	104,8	0,9628
8	vdw_vol, AM1_LUMO, AM1_HF, AM1_HOMO, AM1_Eele	0,9846	102,4	0,9570
9	vdw_vol, AM1_LUMO, glob, LogP, mr	0,9844	101,1	0,9411
10	vol, AM1_LUMO, AM1_HF, AM1_HOMO, AM1_Eele	0,9841	99,3	0,9306

Regresi multilinier terbaik berisi lima deskriptor menghasilkan korelasi yang kuat dengan hasil eksperimen ($r^2 > 0,98$). Kelima deskriptor dianggap signifikan menurut korelasi Pearson.

Menurut Liu *et al.* (2012), gugus aril lebih dipilih pada posisi R1 dan gugus alkil lebih dipilih diposisi R3. Hal ini sesuai dengan deskriptor yang diidentifikasi paling berpengaruh termasuk dalam deskriptor sterik, walaupun sampai pada volume tertentu aktivitas akan menurun. Deskriptor yang paling berpengaruh adalah refraktivitas molar (mr).

Tabel 4. Perbandingan Persamaan Antar Model Persamaan Dengan Kriteria Statistik Terbaik

Model	A	B	C	D
1* [†]	0,9893	0,9664	1 S, 4 SS	0,9767
3**	0,9869	0,9699	1 S, 4 SS	0,8841

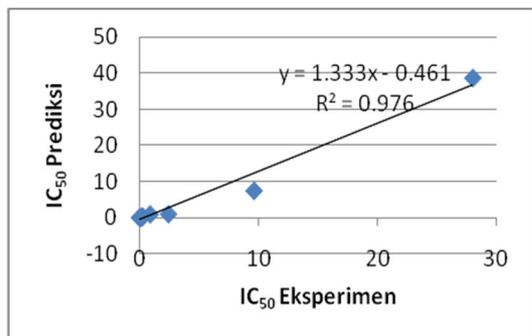
A: r^2 model persamaan,
B: q^2 validasi silang leave one out,
C: Signifikansi Korelasi Pearson Deskriptor,
D: r^2 kurva hubungan IC_{50} Eksperimen dengan Prediksi,
S: Signifikan,
SS: Sangat Signifikan.
* Model persamaan dengan nilai r^2 tertinggi,
** Model persamaan dengan nilai validasi silang LOO tertinggi.
[†] Model persamaan yang dipilih.

Tabel 5. Korelasi Pearson Deskriptor terhadap Log IC_{50}

Persamaan 1 (dengan nilai koefisien regresi (r^2) terbaik)					
Korelasi Pearson	AM1_LUMO	ASA_H	LogS	Mr	vdw_vol
Log $1/IC_{50}$	-0,607 ^a	0,93 ^b	-0,88 ^b	0,945 ^b	0,941 ^b
Signifikansi	0,0208	1,48 x 10^{-6}	3,28 x 10^{-5}	3,69 x 10^{-7}	5,32 x 10^{-7}
* signifikansi pada level 0.05			1 deskriptor		
** signifikansi pada level 0.01			4 deskriptor		
Persamaan 3 (dengan nilai validasi silang <i>Leave One Out</i> q^2 terbaik)					
Korelasi Pearson	AM1_HOMO	AM1_LUMO	LogP	Mr	Vdw_vol
Log $1/IC_{50}$	0,716 ^b	-0,609 ^a	0,786 ^b	0,945 ^b	0,941 ^b
Signifikansi	3,96 x 10^{-3}	2,08 x 10^{-2}	8,63 x 10^{-4}	3,70 x 10^{-7}	5,32 x 10^{-7}
^a signifikansi pada level 0,05			1 deskriptor		
^b signifikansi pada level 0,01			4 deskriptor		

Sebagian deskriptor tampaknya termasuk deskriptor yang relevan dengan interaksi protein-ligan, yaitu deskriptor elektronik dan sterik. Deskriptor dalam model ini memungkinkan untuk ditafsirkan untuk modifikasi struktur secara sistematis dalam rangka

mengembangkan SAR yang pada akhirnya akan mengarah pada inhibitor lebih kuat dan spesifik.



Gambar 2. Kurva hubungan IC_{50} inhibitor Mer Eksperimen dan Prediksi.

Tabel 6. Nilai IC_{50} eksperimen dan prediksi persamaan 1

Senyawa	IC_{50} Mer (μM)	
	Eksperimen	Prediksi
9	2,4	1,00010
10	28	38,67920
12	9,6	7,46410
13	0,86	0,93549
14	0,21	0,30756
15	0,2	0,29708
16	0,056	0,07767
17	0,18	0,13323
39	0,0018	0,00209
40	0,00076	0,00074
41	0,00025	0,00048
42	0,00015	0,00011
43	0,0029	0,00247
44	0,003	0,00204

Kajian Fitur Farmakofor

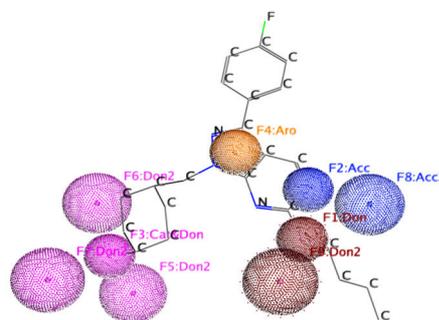
Tujuan dari penyusunan *query* farmakofor adalah untuk menjelaskan struktur 3D fiturpirazolo-[3,4-d]-pirimidin menggunakan senyawa turunannya yang penting untuk pengikatan dengan reseptor dengan menghasilkan farmakofor dan untuk mengukur fitur struktur dari Mer yang penting untuk aktivitas biologis dengan melihat residu asam amino yang berperan pada pengikatan. Untuk penyusunan farmakofor menggunakan *Pharmacophore Query Editor* dan *Protein-Ligand Interaction Fingerprint* pada Program MOE. Farmakofor hipotetik yang dihasilkan juga akan menjelaskan pengikatan ligan dalam situs pengikatan atau katalitik dari reseptor. Oleh karena itu, digunakan konformasi yang telah dioptimasi yang memiliki struktur paling stabil.

Struktur kristal kompleks Mer dengan ligan, telah lama diteliti. Terdapat lima struktur senyawa yang telah dilaporkan dan dapat diunduh dari situs

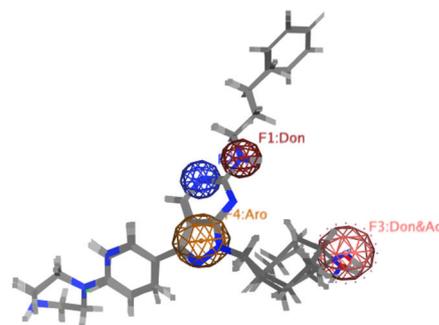
www.rcsb.org, tetapi hanya empat struktur kompleks yang terikat ligan yaitu dengan kode 3TCP, 2P0C, 3BRB, 3BPR, sedangkan struktur protein tanpa ligan adalah 2DBJ (Liu *et al.* 2012; Huang *et al.* 2009).

Dengan menggunakan 4 struktur kompleks ligan-protein tersebut di atas, dapat dibuat sidik jari interaksi ligan-protein dengan membandingkan cara pengikatan masing-masing ligan terhadap residu protein di sisi pengikatan protein. Metode ini berguna untuk meringkas interaksi antara ligan dan protein menggunakan skema sidik jari. Interaksi seperti ikatan hidrogen, interaksi ionik dan kontak permukaan yang diklasifikasikan sesuai dengan residu asal, dan dibangun dalam skema sidik jari yang merupakan representasi dari database dari protein-ligan kompleks. Terlihat bahwa Pro 672 (donor proton), Met 674 (akseptor proton), Asp 678 (ionik), Arg 727 (donor proton) dan Asn 728 (donor proton).

Pola *query* farmakofor dibuat secara komputasi dari model struktur tiga-dimensi molekul penuntun yaitu senyawa 43. Pola ini didasarkan pada model fisik dan mekanisme pengikatan, sehingga sensitif terhadap perubahan konformasi. Hasil yang lebih baik dapat diperoleh bila didukung oleh data kristal atau NMR structural (Xu *et al.* 2002).



Gambar 3. *Query* Farmakofor. **Don:** Donor Proton, **Acc:** Akseptor Proton, **Cat&Don:** Cation dan Donor Proton, **Aro:** Cincin Aromatik, **Don2:** Proyeksi Donor Proton, **Acc2:** Proyeksi Akseptor Proton.



Gambar 4. Penyelarasan struktur molekul

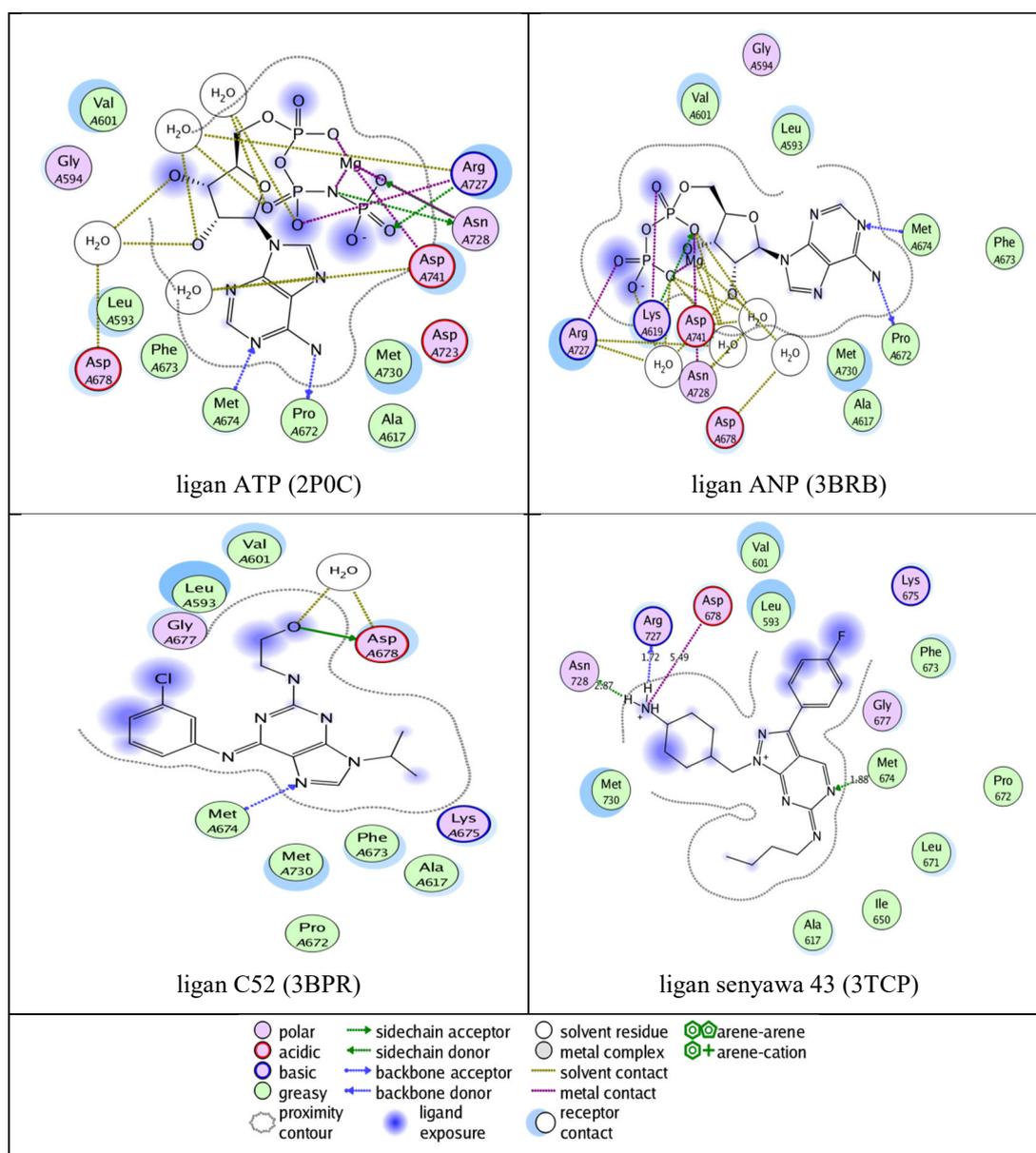
Jarak 6.92 Å antara cincin aromatik pirazol (F4:Aro) dengan gugus polar pada rantai R2 (F3:Cat&Don) penting untuk dipertahankan (Liu, J., 2012). Gugus polar berperan dalam menduduki sisi katalitik enzim sehingga menghalangi ATP untuk diubah menjadi ADP sehingga penerusan sinyal terhenti, sedangkan gugus aromatik (F4:Aro), gugus pendonor proton (F1:Don) dan gugus penarik proton (F2:Acc) akan menduduki sisi pengikatan adenosin (Huang et al. 2009). Jarak ini perlu dijaga sedemikian rupa pada saat desain obat baru, sebab perubahan konformasi ikatan ini berpengaruh signifikan pada aktif atau tidaknya senyawa hasil desain.

Pola ini selanjutnya dapat digunakan untuk menguji senyawa hasil desain apakah aktif atau tidak aktif

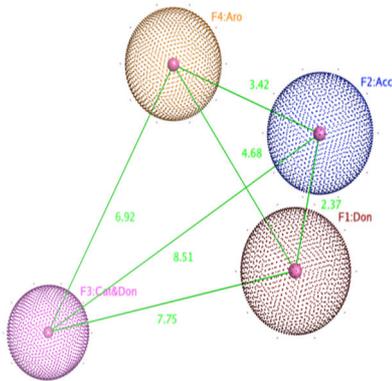
dengan melihat kecocokan antara fitur-fitur farmakofor yang ada pada senyawa hasil desain dengan *query* farmakofor dengan lebih cepat, atau seberapa banyak atom atau gugus yang *hit* dengan *query* farmakofor.

Kajian Docking Molekuler

Sebelum dilakukan *docking*, molekul target harus dipreparasi terlebih dahulu. Molekul yang telah didownload dari situs rscb ditampilkan pada jendela MOE. Agar tidak mengganggu proses *docking*, molekul-molekul air sebaiknya dihilangkan sehingga dipastikan yang berantaraksi adalah molekul uji sebagai ligan dan molekul target.



Gambar 5. Model pengikatan ligan pada Mer.

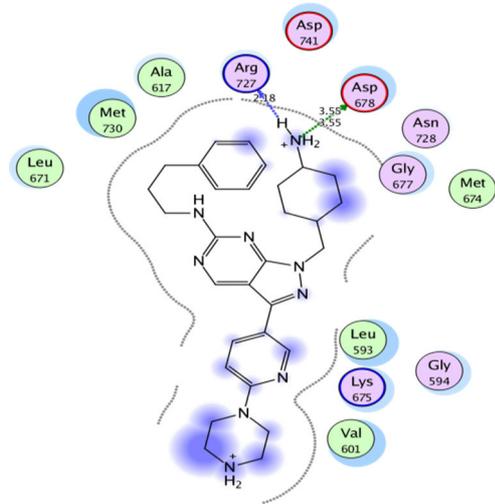


Gambar 6. Jarak antar fitur-fitur dalam farmakofor query.

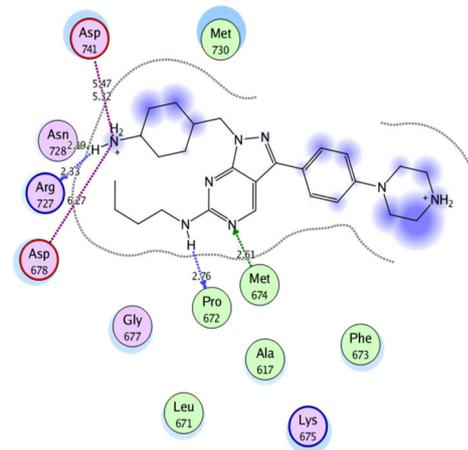
Tahapan selanjutnya adalah protonasi, untuk menambahkan muatan atom dan hidrogen pada molekul. Struktur protein yang digunakan adalah struktur 3TCP. Tahap selanjutnya adalah simulasi *docking* senyawa-senyawa uji terhadap Mer. Pada proses *docking* senyawa uji ini digunakan perangkat lunak MOE 2009. Proses simulasi *docking* diawali dengan mengidentifikasi *binding site* dari protein Mer. *Binding site* akan secara otomatis teridentifikasi dengan menggunakan fasilitas *show pocket*. *Binding site* tersebut teridentifikasi sebagai residu-residu asam amino yang berada pada jarak 5 Å dari ligan alami. Selanjutnya dengan fasilitas *simulation dock*, senyawa-senyawa uji sebagai ligan di-*docking*-kan pada Mer sebagai reseptor, serta diarahkan pada *binding site* yang sebelumnya telah diidentifikasi. Proses *docking* menggunakan ligan fleksibel and reseptor *rigid* menggunakan metode *scoring London dG*.

Validasi metode *docking* dilakukan dengan *redocking native* ligan pada *binding site*. Didapatkan nilai rmsd (*root mean square deviation*) sebesar 1.3226 yang berarti metode tersebut memiliki validitas yang tinggi yang dibuktikan dengan nilai rmsd < 2, artinya posisi ligan *copy* mirip dengan posisi ligan asli.

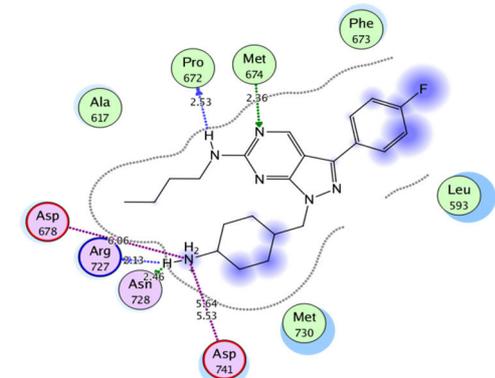
Secara umum, pirazolo-[3,4-d]-pirimidin berikatan dengan reseptor Mer dengan mengikat Asp 678, Arg 727, Asn 728 yang merupakan residu katalitik dari Mer melalui suatu ikatan hidrogen dan ionik. Atom N dari cincin pirimidin juga akan berikatan dengan Met 674 dengan dan gugus NH dari rantai R3 berikatan dengan residu Pro 672. Secara keseluruhan, jika dibandingkan dengan interaksi dengan ligan alami seperti ADP atau senyawa 43, meskipun memiliki struktur yang berbeda dengan ligan alami.



Gambar 7. Model pengikatan hasil docking senyawa 40.



Gambar 8. Model pengikatan hasil docking senyawa 41.



Gambar 9. Model pengikatan hasil docking senyawa 43.

Tabel 7. Hasil Docking Senyawa Turunan Pirazolo-[3,4-d]-Pirimidin Terhadap Mer

Senyawa	Docking Score Ld (S) (kkal/mol)	Jumlah ikatan hidrogen	Jarak ikatan (Å)	Residu asam amino yang terikat	Gugus yang berikatan	
09	-9.5750	Hidrogen	3	2.11 2.16 2.56	Asp 678 Met 674 Pro 672	HO dari R2 ^{Don} N inti pirimidin ^{Acc} HN dari R3 ^{Don}
10	-9.2021	Ionik Hidrogen	1 2	5.52 2.32 2.45	Asp 678 Met 674 Pro 672	NH ₂ ⁺ dari R2 ^{Cat} N inti pirimidin ^{Acc} HN dari R3 ^{Don}
12	-10.0051	Ionik Hidrogen	1 3	4.91 2.01 2.17 2.40	Asp 678 Arg 727 Met 674 Pro 672	NH ₂ ⁺ dari R2 ^{Cat} H ₂ N ⁺ dari R2 ^{Don} N inti pirimidin ^{Acc} HN dari R3 ^{Don}
13	-9.7344	Hidrogen	2	3.70 2.75	Arg 727 Met 674	HO dari R2 ^{Don} N inti pirimidin ^{Acc}
14	-9.2363	-	-	-	-	-
15	-8.9855	Hidrogen	3	2.03 2.50 2.41	Asn 728 Met 674 Pro 672	HO dari R2 ^{Don} N inti pirimidin ^{Acc} HN dari R3 ^{Don}
16	-10.6099	Ionik Hidrogen	1 4	6.13 2.40 2.38 2.20 2.15	Asp 678 Asn 728 Arg 727 Met 674 Pro 672	NH ₃ ⁺ dari R2 ^{Cat} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} N inti pirimidin ^{Acc} HN dari R3 ^{Don}
17	-10.1707	Ionik Hidrogen	1 3	3.82 2.29 2.21 2.28	Asp 678 Arg 727 Met 674 Pro 672	NH ₃ ⁺ dari R2 ^{Cat} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} N inti pirimidin ^{Acc} HN dari R3 ^{Don}
39	-11.6571	Ionik Hidrogen	1 3	6.29 2.59 2.31 2.14	Asp 678 Arg 727 Asn 728 Lys 675	NH ₃ ⁺ dari R2 ^{Cat} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} H ₂ N ⁺ dari R1 ^{Don}
40	-12.7584	Ionik Hidrogen	1 2	3.55 2.18 3.15	Arg 727 Asp 678 Asp 678	H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Cat} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don}
41	-11.9987	Ionik Hidrogen	1 4	6.27 / 5.32 2.33 2.19 2.61 2.76	Asp 678 / Asp 741 Arg 727 Asn 728 Met 674 Pro 672	NH ₃ ⁺ dari R2 ^{Cat} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} N inti pirimidin ^{Acc} HN dari R3 ^{Don}
42	-11.2583	Ionik Hidrogen	1 2	3.99 2.06 2.67	Asp 678 Arg 727 Met 674	NH ₃ ⁺ dari R2 ^{Cat} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} N inti pirimidin ^{Acc}
43	-10.5672	Ionik Hidrogen	1 4	6.06 / 5.53 2.13 2.46 2.36 2.53	Asp 678 / Asp 741 Arg 727 Asn 728 Met 674 Pro 672	NH ₃ ⁺ dari R2 ^{Cat} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} N inti pirimidin ^{Acc} HN dari R3 ^{Don}
44	-11.8373	Ionik Hidrogen	1 2	3.96 200 2.67	Asp 678 Arg 727 Met 674	NH ₃ ⁺ dari R2 ^{Cat} H ₃ N ⁺ dari R2 ^{Don} N inti pirimidin ^{Acc}

^{Acc}: Akseptor proton, ^{Don}: Donor proton, ^{Cat}: Kation, Ld: London dG

Interaksi yang terjadi antara senyawa-senyawa pirazolo-[3,4-d]-pirimidin dengan Mer ditunjukkan dengan nilai *docking score* (S), makin rendah nilai S maka interaksi antara keduanya makin kuat. Fungsi *scoring* sering tidak bekerja dengan baik di semua kelas protein (Kitchen et al. 2003; Moitessier et al. 2008). Kasus yang sama juga terjadi pada penelitian ini ketika memodelkan inhibisi pirazolo-[3,4-d]-pirimidin terhadap aktivitas reseptor Mer. Nilai *scoring* senyawa nomor 40 lebih besar daripada senyawa 41 yang memiliki aktivitas terbaik, tetapi hal ini tidak berarti efisiensi yang rendah pada tingkat selektivitas dan efek samping, bahkan sebaliknya memiliki banyak manfaat, seperti menghindari resistensi obat dan toksisitas (Wei et al. 2008).

Kesimpulan

Hubungan kuantitatif struktur dan aktivitas senyawa turunan pirazolo-[3,4-d]-pirimidin sebagai inhibitor Mer menunjukkan bahwa lima prediktor berpengaruh terhadap aktivitas senyawa, sebagaimana digambarkan dengan persamaan HKSA terbaik:

$$\text{Log } 1/IC_{50} = 1.731 (\pm 1.417) - 3.201 (\pm 0.984) \text{AM1_LUMO} - 0.065 (\pm 0.012) \text{ASA_H} - 0.846 (\pm 0.144) \text{LogS} - 8.348 (\pm 1.262) \text{mr} + 0.243 (\pm 0.036) \text{vdw_vol}$$

Asam amino yang penting dalam interaksi protein Mer dengan senyawa pirazolo-[3,4-d]-pirimidin adalah Pro 672, Met 674, Asp 678, Arg 727 dan Asn 728 dengan kode sidik jari (daDID). Adapun *query* farmakofor yang berperan dalam interaksi ligan-reseptor memiliki fitur satu gugus donor proton, gugus akseptor proton, gugus kation dan donor proton, dan gugus aromatik.

Daftar Pustaka

DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM, 2008, *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, Edisi ke-7, McGraw-Hill Co. Inc., New York, 2259

Huang X, Finerty P (Jr.), Walker JR, Butler-Cole C, Vedadi M, Schapira M, Parker SA, Turk BE, Thompson DA, Dhe-Paganon S, 2009, Structural insights into the inhibited states of the Mer receptor tyrosine kinase. *J. Struct. Biol.* 165(2): 88–96.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ, 2008, *Cancer statistics 2008*, *CA Cancer J Clin.* 58(2): 71-96.

Jin Can C, Li Q, Yong S, LanMei C, KangCheng ZA, 2008, QSAR Study and Molecular Design of Benzothiazole Derivatives as A Potent Anticancer Agents, *Sci. in China Ser B.*, 51(2): 111-119.

Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J, 2003, *Docking and scoring* in virtual screening for drug discovery: methods and applications, *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 935-949.

Levita J, Mustarichie R, 2012, *Pemodelan Molekul dalam Kimia Medisinal*, Graha Ilmu, Yogyakarta, 23.

Linger RMA, Keating AK, Earp HS, Graham DK, 2008, TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer, In *Advanced Cancer Research*, Academic Press: New York, 100, 35–83.

Liu J, Yang C, Simpson C, DeRyckere D, Van Deusen A, Miley MJ, Kireev D, Norris-Drouin J, Sather S, Hunter D, Korboukh VK, Patel HS, Janzen WP, Machius M, Johnson GL, Earp HS, Graham DK, Frye SV, Wang X, 2012, Discovery of Small Molecule Mer Kinase Inhibitors for the Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, *Med. Chem. Lett.* 3(2): 129-134.

Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G, 2006, *Pharmacophore and Pharmacophore Searches*, Wiley-VCH, Weinheim, 3.

Moitessier N, Englebienne P, Lee D, Lawandi J, Corbeil CR, 2008, Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go, *British Journal of Pharmacology*, 153, S7–S26.

Patrick GL, 2009, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, edisi ke-4, Oxford University Press, New York. 352-361.

Pranowo HD, Hetadi AKB, 2011, *Pengantar Kimia Komputasi*, Lubuk Agung, Bandung, 41.

Wei D, Jiang X, Zhou L, Chen J, Chen Z, He C, Yang K, Liu Y, Pei Y, Lai L, 2008, Discovery of Multitarget Inhibitors by Combining Molecular Docking with Common Pharmacophore Matching, *J. Med. Chem.* 51(24): 7882-7888.

Xu J, Hagler A, 2002, *Chemoinformatics and Drug Discovery*, *Molecules*, 7, 566-600.