

OPEN  
ACCESS

## Pemodelan Farmakofor, Skrining Virtual dan Docking Kandidat Inhibitor Baru Protein Reseptor Tirosin Kinase VEGFR2

Fredy Z. Saudale<sup>a\*</sup>

**Abstract.** VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) plays a key role on tumor angiogenesis. Inhibition of VEGFR2 mediated-biological signaling pathways by chemical compounds has been considered as an effective therapeutic option for cancer treatment. This study aims to identify new candidates of VEGFR2 inhibitor compounds using the method of computational molecular modeling (in silico) namely pharmacophore analysis, virtual screening and docking. From the results it is identified that N-chloro-9,10-dioxoanthracen-2-yl)-2,6-difluorobenzamide shows a higher affinity (-9.8 kcal/mol) to the VEGFR2 receptor protein compared to urea derivative inhibitor used as positive control (-9.0 kcal/mol). Interactions between N-(1-chloro-9,10-dioxoanthracen-2-yl)-2,6-difluorobenzamide with VEGFR2 are stabilized through a hydrogen bond with Cys917 at a distance of 2 Å, hydrophobic interactions with Glu883, Glu915, and  $\pi$ -sigma interactions with Val914 and Leu838. Toxicity prediction by the Ames method shows that N-(1-chloro-9,10-dioxoanthracen-2-yl)-2,6-difluorobenzamide is not mutagenic but may induce damages to the liver. Further validation and optimization of structure and activity of N-(1-chloro-9,10-dioxoanthracen-2-yl)-2,6-difluorobenzamide are needed not only to verify its inhibiting potential and but also to optimize its safety and selectivity for cancer drug development.

**Keywords :** benzamide, cancer, docking, inhibitor, VEGFR2

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Nusa Cendana University, Kupang 85001, Indonesia .

Correspondence and requests for materials should be addressed to Saudale, F. Z.  
(email : [fredy\\_saudale@staf.undana.ac.id](mailto:fredy_saudale@staf.undana.ac.id))

## Pendahuluan

VEGFR2 adalah protein reseptor yang berperan penting dalam pembentukan dan pertumbuhan sel endotel pembuluh darah [1]. Aktivasi jalur persinyalan biologis VEGFR2 melalui interaksi dengan faktor pertumbuhan endotel vaskular VEGF-A adalah tahapan penting dalam jalur sinyal transduksi yang menginisiasi proses angiogenesis dimana pembuluh darah baru terbentuk dari pembuluh darah yang telah ada [2]. Jika proses angiogenesis ini berjalan tidak terkontrol maka dapat menyebabkan pertumbuhan tumor [3]. Aktivitas yang berlebihan dari jalur persinyalan biologis VEGFR2/VEGF-A telah dilaporkan berkorelasi dengan resiko tinggi perkembangan penyakit kanker [4]. Inhibisi proses angiogenesis tumor melalui penghambatan jalur persinyalan VEGFR2/VEGF-A oleh senyawa kimia telah digunakan sebagai pendekatan potensial dalam terapi anti kanker seperti karsinoma sel ginjal, paru, usus besar dan hati [5]–[8].

Beberapa senyawa inhibitor VEGFR-2 yang telah disetujui oleh FDA (Badan Pengawasan Obat di Amerika Serikat) sebagai anti terapi kanker ginjal adalah axitinib, cabozantinib, lenvatinib, sorafenib, sunitinib dan pazopanib [9]. Kebanyakan obat-obatan tersebut merupakan inhibitor kompetitif dari ATP yang meningkatkan kemampuan penghambatannya melalui interaksi yang dibentuk dengan residu asam amino di kantong pengikatan ATP pada struktur protein reseptor VEGFR2 [10]. Meskipun terapi antiangiogenik dengan obat-obatan tersebut telah secara signifikan meningkatkan kualitas hidup pasien dengan berbagai tumor dan beberapa pengujian klinis menunjukkan hasil yang menjanjikan, namun kemanjurannya masih kurang dan efek samping yang dihasilkan juga multidimensi [11]. Hal ini secara sebagian disebabkan oleh karena konservasi struktural kantong pengikat ATP pada keluarga besar protein kinase [12]. Obat-obatan tersebut telah dilaporkan menunjukkan afinitas yang juga tinggi terhadap anggota keluarga protein reseptor tirosin kinase yang lain seperti EGFR, FGFR, PDGFR, RAF, c-MET, RET, dan target lainnya [13][14]. Spektrum aktivitas yang luas dan beragam ini menyebabkan banyaknya efek samping dihasilkan. Sunitinib misalkan memiliki banyak efek samping yang terkait dengan terapi seperti kelelahan, diare, mual, anoreksia, hipertensi, perubahan warna kulit menjadi kuning, reaksi kulit kaki serta tan-

gan, dan stomatitis [15][16].

Berdasarkan latar belakang situasi yang telah dijelaskan diatas maka ada kebutuhan mendesak untuk mengembangkan senyawa inhibitor baru VEGFR2 yang tidak hanya dapat memberikan efek farmakologis yang selektif namun juga memiliki toksisitas yang lebih rendah dan kemanjuran yang lebih baik. Oleh sebab itu penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi kandidat inhibitor baru dari VEGFR2 menggunakan pendekatan komputasional (*in silico*) yakni analisis pemodelan farmakofor, skrining virtual dan docking. Keterbaruan riset ini tertuju pada identifikasi turunan senyawa kimia baru sebagai inhibitor VEGFR2 untuk dapat divalidasi dan dikembangkan dalam upaya desain dan pengembangan obat kanker.

## Metode Penelitian

**Alat dan Bahan.** Penelitian komputasional ini dilakukan menggunakan perangkat keras (*hardware*) laptop HP Pavilion x360 Convertible Signature Edition sistem operasi 64-bit dengan spesifikasi prosesor Intel(R) Core(TM) i5-6200U CPU @2.30GHz 2.40GHz, RAM 8 GB, harddisk 930 GB. Perangkat lunak (*software*) yang digunakan adalah PyRx-Python Prescription 0.8 (The Scripps Research Institute, San Diego), UCSF Chimera versi 1.13.1 (University of California, San Francisco), OpenBabel GUI (University of Pittsburgh, Philadelphia), Discovery Studio Visualizer versi 17.2.0 (Accelrys Software Inc, San Diego) dan PyMOL Molecular Graphics System versi 2.2.3. (The Schrodinger LLC, New York).

**Prosedur.** Sebanyak dua belas struktur 3D kompleks protein VEGFR2 dengan inhibitor dari manusia (*homo sapiens*) yang telah didapatkan melalui eksperimen kristalografi sinar X dengan resolusi yang dipilih yaitu 1,5-1,9 Å diunduh dari Protein Data Bank (PDB) dengan kode masing-masing 3WZD, 3WZE, 3VO3, 4ASE, 3VNT, 4AG8, 3VHE, 2XIR, 3EWH, 3BE2, 2P2H dan 1YWN dalam format file PDB [17] (Tabel 1). Sementara itu ketujuh inhibitor yang berinteraksi dengan protein VEGFR2 tersebut dengan kode masing-masing berurutan LEV, BAX, OKF, AXI, AV9, OJA, 42Q, 00J, K11, RAJ, 994 dan LIF juga diunduh dalam format file SDF yang kemudian dikonversi ke dalam format file MOL2 dengan Open Babel GUI [18].

Keduabelas inhibitor tersebut kemudian

**Tabel 1.** Struktur kompleks VEGFR dan inhibitor hasil eksperimen kristalografi sinar X dari database PDB

No	Kode PDB	Kode Inhibitor	Nama Inhibitor	Resolusi Kristal	Afinitas	Referensi
1.	1YWN	LIF	<i>N</i> -(4-{4-amino-6-[4-(methyloxy) phenyl] furo[2,3-d] pyrimidin-5-yl} phenyl)-N'-[2-fluoro-5-(trifluoromethyl) phenyl]urea	1.71 Å	3,02-15,5 nM (IC50)	[22]
2.	2P2H	994	4-(2-anilinopyridin-3-yl)-N-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1,3,5-triazin-2-amine	1.95 Å	68 nM (IC50)	[23]
3.	3BE2	RAJ	<i>N</i> -{3-[3-(dimethylamino)propyl]-5-(trifluoromethyl) phenyl}-4-methyl-3-[(3-pyrimidin-4-ylpyridin-2-yl)amino] benzamide	1.75 Å	2nM (IC50)	[24]
4.	3EWH	K11	<i>N</i> -[4-({3-[2-(methylamino)pyrimidin-4-yl]pyridin-2-yl} oxy)naphthalen-1-yl]-6-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazol-2-amine	1.6 Å	69-70 nM (IC50)	[25]
5.	2XIR	00J	<i>N</i> ,2-dimethyl-6-[[7-(2-morpholin-4-ylethoxy)quinolin-4-yl]oxy]-1-benzofuran-3-carboxamide	1.5 Å	-	-
6.	3VHE	42Q	1-{2-fluoro-4-[(5-methyl-5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidin-4-yl) oxy]phenyl}-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]urea	1.55 Å	6,2 nM (IC50)	[26]
7.	3VNT	OJA	2-chloro-3-(1-cyanocyclopropyl)-N-[5-({2-[(cyclopropylcarbonyl)amino][1,3]thiazolo[5,4-b]pyridin-5-yl}oxy)-2-fluorophenyl]benzamide	1.64 Å	2,2 nM	[27]
8.	4ASE	AV9	1-{2-chloro-4-[(6,7-dimethoxyquinolin-4-yl)oxy]phenyl}-3-[(3E)-5-methylisoxazol-3(2H)-ylidene]urea (TIVOZANIB®)	1.83 Å	0,01 nM (Ki)	[28]
9.	3VO3	OKF	<i>N</i> -[3-({2-[(cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-b]pyridazin-6-yl}oxy)phenyl]-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-5-carboxamide	1.52 Å	1,4 nM (IC50)	[29]
10.	3WZE	BAX	4-{4-[[{4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]amino} carbonyl]amino]phenoxy}-N-methylpyridine-2-carboxamide (SORAFENIB®)	1.9 Å	33 nM (Kd)	[30]
11.	3WZD	LEV	4-{3-chloro-4-[(cyclopropylcarbonyl)amino]phenoxy}-7-methoxyquinoline-6-carboxamide (LENVATINIB®)	1.57 Å	4 nM (IC50)	[30]
12.	4AG8	AXI	<i>N</i> -methyl-2-(3-((E)-2-pyridin-2-yl-vinyl)-1H-indazol-6-ylsulfanyl)-benzamide (AXITINIB®)	1.95 Å	1,1 nM (Ki)	[28]

dianalisis fitur-fitur farmakofornya menggunakan Pharmagist [19]. Model farmakofor yang telah dibangun kemudian digunakan sebagai input (query) untuk melakukan skrining virtual senyawa-senyawa kandidat inhibitor baru dengan karakteristik fisikokimia yang dipilih mengikuti aturan "Lima" Lipinski (Berat Molekul  $\leq 500$  Dalton, donor ikatan hidrogen  $\leq 5$ , akseptor ikatan hidrogen  $\leq 10$ ,  $\log P \leq 5$ , ikatan yang berotasi  $\leq 10$  dan Polar Surface Area  $\leq 140 \text{ \AA}^2$ ) menggunakan webserver Pharmit terhadap database ZINC Purchasable [20]. Sebanyak 10 senyawa top kandidat inhibitor yang telah didapatkan kemudian dipreparasi sebelum dilakukan tahapan docking. Preparasi inhibitor dilakukan dengan menambahkan atom H, muatan dan melakukan minimisasi energi struktur dengan parameter default menggunakan program AMBER dari software UCSF Chimera versi 1.13.1. Hal yang sama juga dilakukan untuk preparasi protein dengan juga menghilangkan molekul air serta ion-ion pada struktur yang didapat dari PDB. Protein VEGFR2 (kode PDB: 1YWN) digunakan untuk menambatkan senyawa kandidat inhibitor dalam proses docking dengan inhibitor N-(4-{4-amino-6-[4-(metiloksi)fenil]furo[2,3-d]pirimidin-5-yl}fenil)-N'-[2-fluoro-5-(trifluorometil)fenil]urea (Kode ligan: LIF) digunakan sebagai kontrol positif.

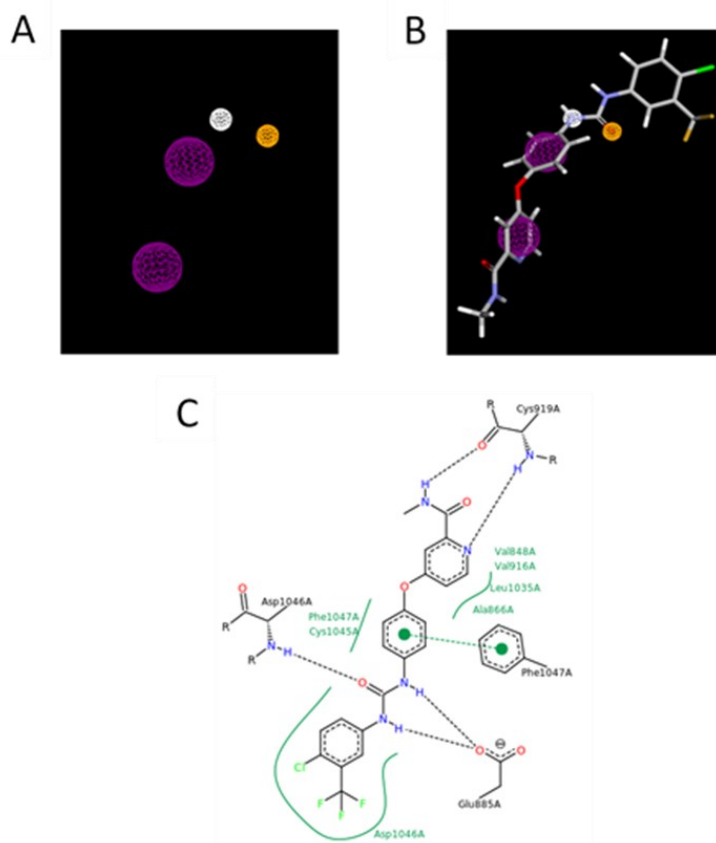
Docking dilakukan menggunakan software PyRx-Python Prescription 0.8. Besarnya energi afinitas (kcal/mol), pose atau konformasi yang terbentuk kemudian dianalisis. Interaksi hidrogen juga hidrofobik yang terbentuk antara protein VEGFR2 dengan inhibitor dianalisis secara 2D menggunakan software Discovery Studio Visualizer versi 17.2.0 dan secara 3D menggunakan PyMOL Molecular Graphics System versi 2.2.3. Parameter docking diatur sebagai berikut; exhaustiveness di set pada level 8, pusat area pencarian X: 5,2525, Y: 38,6889, Z: 23,5814 dan dimensi grid dalam satuan Angstrom adalah X: 59,6304, Y: 47,8533, Z: 62,2249 yang memastikan daerah kantong pengikatan dari protein VEGFR2 tercakup.

Top senyawa kandidat inhibitor kemudian dianalisis sifat farmakokinetikanya untuk memprediksi karakteristik absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitasnya (ADMET) menggunakan webserver pKCSM [21].

## Hasil dan Pembahasan

Untuk membantu dalam mengidentifikasi senyawa kandidat inhibitor baru VEGFR2 pertama-tama dipilih sebanyak dua belas struktur inhibitor dan obat yang telah diketahui menunjukkan interaksi dan aktivitas terhadap VEGFR2 sebagai starting compounds dari database PDB (Tabel 1). Keduabelas inhibitor/obat tersebut telah dielusidasi secara eksperimen dalam kompleks dengan struktur kristal VEGFR2 dalam rentang resolusi yang sangat baik yakni 1,5 – 1,9 Å dan dilengkapi dengan data afinitas dalam bentuk nilai IC<sub>50</sub>, K<sub>i</sub> maupun K<sub>d</sub>. Dari keduabelas senyawa inhibitor terdapat empat obat komersial yang saat ini digunakan dalam pengobatan kanker ginjal yakni TIVOZANIB®, SORAFENIB®, LENVATINIB®, AXITINIB® yang menunjukkan konsentrasi aktivitas inhibisi yang rekatif besar terhadap VEGFR2 masing-masing 0,01 nM (K<sub>i</sub>), 33 nM (K<sub>d</sub>), 4 nM (IC<sub>50</sub>) dan 1,1 nM (K<sub>i</sub>). Untuk mengetahui fitur-fitur struktural sterik dan elektronik apa yang sama-sama dimiliki oleh keduabelas senyawa inhibitor/obat tersebut yang kemungkinan berperan penting dalam menstabilkan interaksinya secara optimal dengan protein target VEGFR2 dan juga aktivitas inhibisinya maka dilakukan analisis fitur-fitur atau pemodelan farmakofor [31]. Terdapat enam fitur-fitur farmakofor yang penting yaitu donor ikatan hidrogen, akseptor ikatan hidrogen, cincin aromatik, hidrofobik, area bermuatan negatif dan positif [32][33].

Hasil analisis pemodelan farmakofor menunjukkan bahwa keduabelas senyawa inhibitor dan obat VEGFR2 mempunyai tiga kesamaan fitur sterik dan elektronik yakni 1 donor ikatan hidrogen, 1 akseptor ikatan hidrogen dan 2 cincin aromatik (Gambar 1A dan 1B). Analisis lebih lanjut dari interaksi 2D yang terbentuk menggunakan inhibitor BAX yang mewakili keduabelas senyawa menunjukkan bahwa atom O dari gugus karbonil yang merupakan akseptor ikatan hidrogen diperlukan untuk berinteraksi dengan residu Asp1046, gugus NH sebagai donor ikatan hidrogen diperlukan untuk berinteraksi dengan residu Glu885 dan satu cincin aromatik nampak diperlukan untuk menstabilkan afinitas melalui interaksi hidrofobik yang terbentuk dengan residu Cys1045 maupun interaksi  $\pi$ - $\pi$  dengan Phe1047 (Gambar 1C). Sementara itu satu cincin aromatik yang lain yakni piridin nampak diperlukan untuk berinteraksi secara hidrofobik dengan Val848, Val916, Leu1035 dan Ala 866 (Gambar 1C). Menariknya atom N dari cincin aromatik piridin juga terlihat diperlukan untuk mem-



**Gambar 1.** Fitur-fitur farmakofor dari ke-12 inhibitor VEGFR2. Fitur farmakofor yang sama ditandai dengan bulatan kuning yang menunjukkan fitur akseptor ikatan hidrogen, putih adalah donor ikatan hidrogen dan ungu menunjukkan fitur aromatik. (A) tanpa adanya inhibitor dan (B) dengan adanya inhibitor senyawa **4-{4-[[{4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl}amino]carbonyl]amino]phenoxy}-N-methylpyridine-2-carboxamide** (Kode ligan: BAX atau SORAFENIB®) yang merepresentasikan ke-12 inhibitor. (C) Gambaran nteraksi 2D inhibitor inhibitor BAX dengan VEGFR2 (Kode PDB: 3WZE). Keterangan: Garis putus-putus hitam menunjukkan ikatan hidrogen. Garis lengkung hijau menunjukkan interaksi hidrofobik. Garis putus-putus dengan dot hijau menunjukkan interaksi  $\pi$ - $\pi$  dari cincin aromatik.

bentuk ikatan hidrogen dengan residu Cys919 yang mungkin dapat meningkatkan afinitas dari senyawa inhibitor dan juga inhibisinya (Gambar 1C).

Hasil skrining virtual menggunakan model farmakofor dari duabelas inhibitor dan obat VEGFR2 didapatkan 50 senyawa kandidat yang setelah dilakukan redocking memberikan satu senyawa top kandidat ZINC000004965720 atau *N*-(1-chloro-9,10-dioxoanthracen-2-yl)-2,6-difluorobenzamide yang menunjukkan afinitas lebih tinggi dari kontrol positif inhibitor LIF (-9,8 vs -9,0 kkal/mol) (Tabel 2). Analisis interaksi dengan residu asam amino VEGFR2 di kantong pengikatan menunjukkan terdapat pembentukan ikatan hidrogen dengan Cys917 (Gambar 2A). Sementara itu interaksi hidrofobik ditunjukkan melalui interaksi dengan residu Glu883, Glu383, Leu887, Cys1043, Lys918, Gly920, Phe916 dan

Glu915) (Gambar 2A). Interaksi antara cincin aromatik dan gugus alkil dari rantai samping ditunjukkan melalui interaksi dengan residu Val914, Val846 dan Ala864 (Gambar 2A). Didapatkan juga senyawa turunan pirimidin ZINC000008686115 atau *N*-[5-(2,4-dichlorophenoxy-4-hydroxy-6-methylpyrimidin-2-yl)acetamide dengan afinitas yang jauh lebih rendah (-7,0 kkal/mol) namun menunjukkan ikatan hidrogen dengan Asp1044 dan Glu883 dan tidak terdapat interaksi ikatan hidrogen dengan Cys917 maupun interaksi hidrofobik dengan Glu883 yang kemungkinan (Tabel 2). Perbedaan ini memunculkan hipotesis pentingnya ikatan hidrogen yang terbentuk dengan residu Cys917 dan hidrofobik yang menstabilkan interaksi cincin aromatik dengan residu Glu883 bagi kandidat turunan benzamida, dan ikatan hidrogen dengan Asp1044 dan Glu883 bagi kandidat turunan pirimidin.

Hal tersebut diperkuat melalui analisis in-

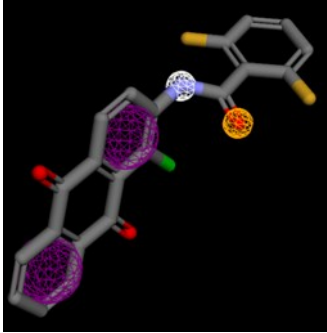
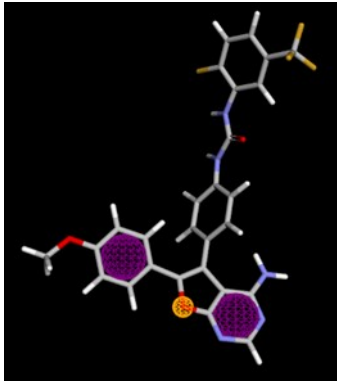
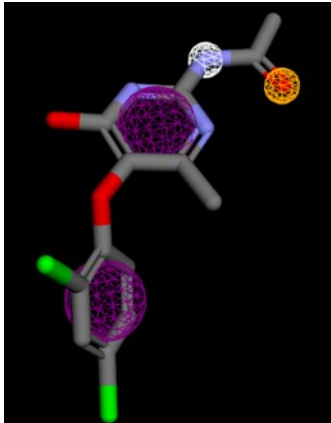


teraksi secara 3D (Gambar 2B). Ikatan hidrogen dengan residu Cys917 yang terbentuk berada pada jarak optimal yakni 2,5 Å. Sementara itu rantai samping alkil dari Leu838 berada pada jarak yang dekat untuk menstabilkan tiga cincin

melalui interaksi hidrofobik. Begitu juga rantai samping alkil dari Glu915 dan Glu883 menstabilkan cincin benzil melalui interaksi hidrofobik.

Dari prediksi absorpsi, distribusi, metabo-

**Tabel 2.** Hasil skrining virtual dan docking kandidat inhibitor baru VEGFR2

No	Kode Senyawa dan Karakteristik <sup>#</sup>	Nama Senyawa dan Fitur Farmakofor	Energi afinitas (kkal/mol)	Residu yang berinteraksi
1.	ZINC000004965720  BM=397,764 LogP= 4,6459 RoB= 2 HBA= 3 HBD= 1 PSA= 162,303	<i>N</i> -(1-chloro-9,10-dioxoanthracen-2-yl)-2,6-difluorobenzamide  	-9,8	<i>Ikatan hidrogen:</i> Cys917  <i>Interaksi hidrofobik:</i> Glu883, Glu383, Leu887, Cys1043, Lys918, Gly920, Phe916, Glu915  <i>Interaksi π-sigma dan π-alkil:</i> Val914, Val846, Ala864
2.	LIF (Kontrol positif)  BM= 537,473 LogP= 6,9495 RoB= 5 HBA= 6 HBD= 3 PSA= 217,990	<i>N</i> -(4-{4-amino-6-[4-(methyloxy)phenyl]furo[2,3-d]pyrimidin-5-yl}phenyl)- <i>N'</i> -[2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl]urea  	-9,0	<i>Ikatan hidrogen:</i> Cys917, Leu838, Arg840  <i>Interaksi hidrofobik:</i> Gly839, Gly920, Phe916, Lys866, Glu883, Leu887. Cys1043. Gly941  <i>Interaksi π-sigma dan π-alkil:</i> Val914, Val897, Val846, Leu1033, Lys1053
3.	ZINC000008686115  BM= 328,155 LogP= 3,54812 RoB= 3 HBA= 5 HBD= 2 PSA= 130,248	<i>N</i> -[5-(2,4-dichlorophenoxy)-4-hydroxy-6-methylpyrimidin-2-yl]acetamide  	-7,2	<i>Ikatan hidrogen:</i> Asp1044, Glu883  <i>Interaksi hidrofobik:</i> Leu887, Phe916, Cys917, Glu915  <i>Interaksi π-sigma dan π-alkil:</i> Val914, Val897, Cys1043, Lys866, Ala864, Leu1033, Val846, Leu838

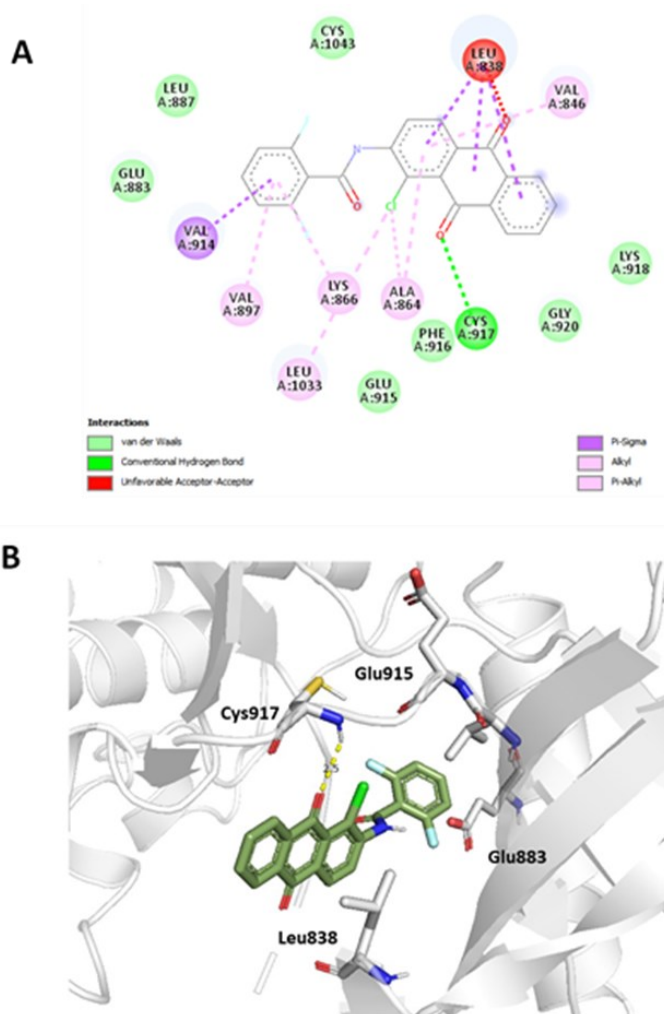
Tabel 3. Prediksi Farmakokinetika

Senyawa	Intestinal Absorption (% Absorbed)	P-Glycoprotein substrate	CNS Permeability (logPS)	CYP3A4 substrate	Total Clearance (log ml/min/kg)	AMES toxicity	Hepato Toxicity
ZINC000004965720	94,235	Yes	-1,735	Yes	0,042	No	Yes
LIF	100	Yes	-1,755	Yes	-0,393	No	Yes
ZINC000008686115	89,325	No	-2,972	No	0,091	No	Yes

lisme, ekskresi dan toksisitas didapatkan bahwa senyawa senyawa top kandidat ZINC000004965720 tidak bersifat mutagenik namun bisa berkontribusi pada kerusakan liver (Tabel 3). Selain itu senyawa top kandidat ZINC000004965720 merupakan substrat dari Glikoprotein-P dan CYP3A4 yang berperan dalam mengangkut dan memetabolisme senyawa-senyawa asing (xenobiotika) di dalam tubuh. ZINC000004965720 juga diprediksi dapat diserap dengan baik oleh usus (94%) jika diberikan secara oral. ZINC000004965720 juga diprediksi dapat masuk ke dalam sistem saraf pusat dengan

besarnya nilai log CNS permeability adalah -1,755.

Analisis pemodelan farmakofor memberikan petunjuk bahwa kurang lebih diperlukan adanya fitur-fitur donor ikatan hidrogen, donor akseptor hidrogen dan cincin aromatik yang menstabilkan interaksi inhibitor dengan VEGFR2. Fitur-fitur ini diperlukan untuk menstabilkan afinitas inhibitor dengan residu asam amino VEGFR2 di kantong pengikatan ATP. Dari penelitian ini didapatkan bahwa senyawa ZINC000004965720, suatu turunan benzamida, bisa menambat di kantong pengikatan dari protein reseptor kinase VEGFR2 melalui in-



**Gambar 2.** Interaksi top senyawa kandidat inhibitor dengan VEGFR2 (A) secara 2D menggunakan Discovery Studio dan (B) secara 3D dengan PyMOL

teraksi hidrogen dengan Cys917 dan hidrofobik dengan Leu838, Glu915 dan Glu883. Keterlibatan residu Cys917 dalam pembentukan ikatan hidrogen dan Cys1043 lewat interaksi hidrofobik dengan inhibitor yang teramati dalam penelitian ini juga didukung oleh penelitian-penelitian sebelumnya. Aziz *et al* [34] menemukan senyawa analog tricyclic pyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amine dapat berperan sebagai inhibitor VEGFR2 dengan berperilaku sebagai kompetitor bagi ATP. Analisis docking menunjukkan bahwa terdapat interaksi dengan residu Cys917 melalui pembentukan ikatan hidrogen. Sementara itu gugus 4,6-dimethylthieno[2,3-b]pyridine berinteraksi dengan Val897, Cys1043 dan Leu1033 melalui interaksi hidrofobik. Interaksi yang baru yang ditunjukkan dalam penelitian ini adalah terbentuknya interaksi hidrofobik dengan residu Leu838, Glu915 dan Glu883. Dalam penelitian sebelumnya residu Glu915, Glu883 umumnya ditemukan membentuk ikatan hidrogen dengan inhibitor [35][36]. Hal ini menunjukkan kemungkinan fleksibilitas interaksi dari gugus asam amino di kantong pengikatan ATP yang dapat meningkatkan afinitas. Penelitian ini juga menunjukkan kegunaan dari metode komputasional (*in silico*) menggunakan pemodelan farmakofor, skrining virtual dan docking pada tahapan awal identifikasi kandidat inhibitor untuk dapat dikembangkan lebih lanjut dalam desain dan pengembangan obat [37]-[38]. Visualisasi molekuler interaksi 2D dan 3D juga dapat membantu dalam mempelajari lebih detail hubungan antara struktur inhibitor dan aktivitas inhibisinya terhadap VEGFR2.

## KESIMPULAN

Senyawa N-(1-chloro-9,10-dioxoanthracen-2-yl)-2,6-difluorobenzamide menunjukkan afinitas yang lebih tinggi (-9,8 kkal/mol) terhadap protein reseptor kinase VEGFR2 dibandingkan dengan inhibitor turunan urea yang digunakan sebagai kontrol positif (-9,0 kkal/mol) *in silico*. Interaksi tersebut distabilkan melalui ikatan hidrogen dengan Cys917 dengan jarak 2 Å, interaksi hidrofobik dengan Glu883, Glu915, serta interaksi  $\pi$ -sigma dengan Val914 dan Leu838. Prediksi karakteristik toksisitas dengan metode Ames menunjukkan senyawa N-(1-chloro-9,10-dioxoanthracen

-2-yl)-2,6-difluorobenzamide tidak bersifat mutagenik namun demikian dapat menginduksi kerusakan pada liver. Validasi, optimisasi struktur dan aktivitas lebih lanjut dari senyawa N-(1-chloro-9,10-dioxoanthracen-2-yl)-2,6-difluorobenzamide diperlukan untuk memverifikasi potensi inhibisinya dan juga dalam meningkatkan keamanan serta selektifitasnya untuk dapat dikembangkan sebagai kandidat obat kanker.

## References

- [1] Apte, R. S., Chen, D. S. & Ferrara, N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. **176**. 1248–1264. (2019). DOI: [10.1016/j.cell.2019.01.021](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021)
- [2] Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. **146**. 873–887. (2011). DOI: [10.1016/j.cell.2011.08.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039)
- [3] Shibuya, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes and Cancer*. **2**. 1097–1105. (2011). DOI: [10.1177/1947601911423031](https://doi.org/10.1177/1947601911423031)
- [4] Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: Physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J. Biochem*. **153**. 13–19. (2013). DOI: [10.1093/jb/mvs136](https://doi.org/10.1093/jb/mvs136)
- [5] Battaglin, F., Puccini, A., Intini, R., Schirripa, M., Ferro, A., Bergamo, F., Lonardi, S., Zagonel, V., Lenz, H. J. & Loupakakis, F. The role of tumor angiogenesis as a therapeutic target in colorectal cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther*. **18**. 251–266. (2018). DOI: [10.1080/14737140.2018.1428092](https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1428092)
- [6] Fallah, A., Sadeghinia, A., Kahroba, H., Samadi, A., Heidari, H. R., Bradaran, B., Zeinali, S. & Molavi, O. Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. *Biomed. Pharmacother*.



110. 775–785. (2019). DOI: [10.1016/j.biopha.2018.12.022](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.022)
- [7] Frezzetti, D., Gallo, M., Maiello, M. R., D'Alessio, A., Esposito, C., Chicchinelli, N., Normanno, N. & De Luca, A. VEGF as a potential target in lung cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*. **21**. 959–966. (2017). DOI: [10.1080/14728222.2017.1371137](https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1371137)
- [8] R. Roskoski. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor inhibitors in the treatment of renal cell carcinomas. *Pharmacol. Res.* **120**. 116–132. (2017). DOI: [10.1016/j.phrs.2017.03.010](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.010)
- [9] Peng, F. W., Liu, D. K., Zhang, Q. W., Xu, Y. G. & Shi, L. VEGFR-2 inhibitors and the therapeutic applications thereof: a patent review (2012–2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* **27**. 987–1004. (2017). DOI: [10.1080/13543776.2017.1344215](https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1344215)
- [10] Qin, S., Li, A., Yi, M., Yu, S., Zhang, M. & Wu, K. Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J. Hematol. Oncol.* **12**. (2019). DOI: [10.1186/s13045-019-0718-5](https://doi.org/10.1186/s13045-019-0718-5)
- [11] Ribatti, D., Annese, T., Ruggieri, S., Tamma, R. & Crivellato, E. Limitations of Anti-Angiogenic Treatment of Tumors. *Transl. Oncol.* **12**. 981–986. (2019). DOI: [10.1016/j.tranon.2019.04.022](https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.04.022)
- [12] Zhang, J., Shan, Y., Pan, X. & He, L. Recent Advances in Antiangiogenic Agents with VEGFR as Target. *Mini-Reviews Med. Chem.* **11**. 920–946. (2011). DOI: [10.2174/138955711797068355](https://doi.org/10.2174/138955711797068355)
- [13] Ferguson, F. M. & Gray, N. S. Kinase inhibitors: The road ahead. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**. 353–376. (2018). DOI: [10.1038/nrd.2018.21](https://doi.org/10.1038/nrd.2018.21)
- [14] Gotink, K. J. & Verheul, H. M. W. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: What is their mechanism of action?. *Angiogenesis*. **13**. 1–14. (2010). DOI: [10.1007/s10456-009-9160-6](https://doi.org/10.1007/s10456-009-9160-6)
- [15] Sitohy, B., Nagy, J. A. & Dvorak, H. F. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: Reassessing the target. *Cancer Res.* **72**. 1909–1914. (2012). DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-11-3406](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3406)
- [16] Zhang, C., Tan, C., Ding, H., Xin, T. & Jiang, Y. Selective VEGFR Inhibitors for Anticancer Therapeutics in Clinical Use and Clinical Trials. *Curr. Pharm. Des.* **18**. 2921–2935. (2012). DOI: [10.2174/138161212800672732](https://doi.org/10.2174/138161212800672732)
- [17] Goodsell, D. S., Zardecki, C., Di Costanzo, L., Duarte, J. M., Hudson, B. P., Persikova, I., Segura, J., Shao, C., Voigt, M., Westbrook, J. D., Young, J. Y. & Burley, S. K. RCSB Protein Data Bank: Enabling biomedical research and drug discovery. *Protein Sci.* **29**. 52–65. (2020). DOI: [10.1002/pro.3730](https://doi.org/10.1002/pro.3730)
- [18] O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T. & Hutchison, G. R. Open Babel: An Open chemical toolbox. *J. Cheminform.* **3**. (2011). DOI: [10.1186/1758-2946-3-33](https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33)
- [19] Schneidman-Duhovny, D., Dror, O., Inbar, Y., Nussinov, R. & Wolfson, H. J. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. *Nucleic Acids Res.* **36**. Web Server issue. (2008). DOI: [10.1093/nar/gkn187](https://doi.org/10.1093/nar/gkn187)
- [20] Sunseri, J. & Koes, D. R. Pharmit: interactive exploration of chemical space. *Nucleic Acids Res.* **44**. W442–W448. (2016). DOI: [10.1093/nar/gkw287](https://doi.org/10.1093/nar/gkw287)
- [21] Pires, D. E. V., Blundell, T. L. & Ascher, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* **58**. 4066–4072. (2015). DOI: [10.1021/acs.jmedchem.5b00104](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104)
- [22] Miyazaki, Y., Matsunaga, S., Tang, J., Maeda, Y., Nakano, M., Philippe, R. J., Shibahara, M., Liu, W., Sato, H., Wang, L. & Nolte, R. T. Novel 4-amino-furo[2,3-d]pyrimidines as Tie-2 and

- VEGFR2 dual inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**. 2203–2207. (2005). DOI: [10.1016/j.bmcl.2005.03.034](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.03.034)
- [23] Hodous, B. L., Geuns-Meyer, S. D., Hughes, P. E., Albrecht, B. K., Bellon, S., Bready, J., Caenepeel, S., Cee, V. J., Chaffee, S. C., Coxon, A., Emery, M., Fretland, J., Gallant, P., Gu, Y., Hoffman, D., Johnson, R. E., Kendall, R., Kim, J. L., Long, A. M., Morrison, M., Olivieri, P. R., Patel, V. F., Polverino, A., Rose, P., Tempest, P., Wang, L., Whittington, D. A. & Zhao, H. Evolution of a highly selective and potent 2-(pyridin-2-yl)-1,3,5-triazine Tie-2 kinase inhibitor. *J. Med. Chem.* **50**. 611–626. (2007). DOI: [10.1021/jm061107l](https://doi.org/10.1021/jm061107l)
- [24] Harmange, J. C., Weiss, M. M., Germain, J., Polverino, A. J., Borg, G., Bready, J., Chen, D., Choquette, D., Coxon, A., DeMelfi, T., DiPietro, L., Doerr, N., Estrada, J., Flynn, J., Graceffa, R. F., Harriman, S. P., Kaufman, S., La, D. S., Long, A., Martin, M. W., Neervanan, S., Patel, V. F., Potashman, M., Regal, K., Roveto, P. M., Schrag, M. L., Starnes, C., Tasker, A., Teffera, Y., Wang, L., White, R. D., Whittington, D. A. & Zanon, R. Naphthamides as novel and potent vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: Design, synthesis, and evaluation. *J. Med. Chem.* **51**. 1649–1667. (2008) DOI: [10.1021/jm701097z](https://doi.org/10.1021/jm701097z)
- [25] Cee, V. J., Cheng, A. C., Romero, K., Bellon, S., Mohr, C., Whittington, D. A., Bak, A., Bready, J., Caenepeel, S., Coxon, A., Deak, H. L., Fretland, J., Gu, Y., Hodous, B. L., Huang, X., Kim, J. L., Lin, J., Long, A. M., Nguyen, H., Olivieri, P. R., Patel, V. F., Wang, L., Zhou, Y., Hughes, P. & Geuns-Meyer, S. Pyridyl-pyrimidine benzimidazole derivatives as potent, selective, and orally bioavailable inhibitors of Tie-2 kinase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**. 424–427. (2009). DOI: [10.1016/j.bmcl.2008.11.056](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.056)
- [26] Oguro, Y., Miyamoto, N., Okada, K., Takagi, T., Iwata, H., Awazu, Y., Miki, H., Hori, A., Kamiyama, K. & Imamura, S. Design, synthesis, and evaluation of 5-methyl-4-phenoxy-5H-pyrrolo [3,2-d] pyrimidine derivatives: Novel VEGFR2 kinase inhibitors binding to inactive kinase conformation. *Bioorganic Med. Chem.* **18**. 7260–7273. (2010). DOI: [10.1016/j.bmc.2010.08.017](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.08.017)
- [27] Okaniwa, M., Hirose, M., Imada, T., Ohashi, T., Hayashi, Y., Miyazaki, T., Arita, T., Yabuki, M., Kakoi, K., Kato, J., Takagi, T., Kawamoto, T., Yao, S., Sumita, A., Tsutsumi, S., Tottori, T., Oki, H., Sang, B. C., Yano, J., Aertgeerts, K., Yoshida, S. & Ishikawa, T. Design and synthesis of novel DFG-Out RAF/vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) inhibitors. 1. Exploration of [5,6]-fused bicyclic scaffolds. *J. Med. Chem.* **55**. 3452–3478. (2012). DOI: [10.1021/jm300126x](https://doi.org/10.1021/jm300126x)
- [28] McTigue, M., Murray, B. W., Chen, J. H., Deng, Y. L., Solowiej, J. & Kania, R. S. Molecular conformations, interactions, and properties associated with drug efficiency and clinical performance among VEGFR TK inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**. 18281–18289. (2012). DOI: [10.1073/pnas.1207759109](https://doi.org/10.1073/pnas.1207759109)
- [29] Miyamoto, N., Sakai, N., Hirayama, T., Miwa, K., Oguro, Y., Oki, H., Okada, K., Takagi, T., Iwata, H., Awazu, Y., Yamasaki, S., Takeuchi, T., Miki, H., Hori, A. & Imamura, S. Discovery of N-[5-({2-[(cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo [1,2-b]pyridazin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-5-carboxamide (TAK-593), a highly potent VEGFR2 kinase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **21**. 2333–2345. (2013). DOI: [10.1016/j.bmc.2013.01.074](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.074)
- [30] Okamoto, K., Ikemori-Kawada, M., Jestel, A., Von Konig, K., Funahashi, Y., Matsushima, T., Tsuruoka, A., Inoue, A. & Matsui, J. Distinct binding mode of multikinase inhibitor lenvatinib revealed by biochemical characterization. *ACS Med. Chem. Lett.* **6**. 89–94. (2015).

DOI: [10.1021/ml500394m](https://doi.org/10.1021/ml500394m)

- [31] Koes, D. R. *Pharmacophore Modeling: Methods and Applications in Computer-Aided Drug Discovery*. New York: Springer New York. 167–188. (2015).
- [32] Seidel, T., Ibis, G., Bendix, F. & Wolber, G. Strategies for 3D pharmacophore-based virtual screening. *Drug Discov. Today Technol.* **7**. (2010). DOI: [10.1016/j.ddtec.2010.11.004](https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2010.11.004)
- [33] Yang, S. Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: Challenges and recent advances. *Drug Discov. Today*. **15**. 444–450. (2010). DOI: [10.1016/j.drudis.2010.03.013](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.03.013)
- [34] Abdel Aziz, Y. M., Said, M. M., El Shihawy, H. A. & Abouzid, K. A. M. Discovery of novel tricyclic pyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amine derivatives as VEGFR-2 inhibitors. *Bioorg. Chem.* **60**. 1–12. (2015). DOI: [10.1016/j.bioorg.2015.03.004](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.03.004)
- [35] Ding, L., Tang, F., Huang, W., Jin, Q., Shen, H. & Wei, P. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 3-pyrrolo[b] cyclohexylene-2-dihydroindolinone derivatives as potent receptor tyrosine kinase inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **23**. 5630–5633. (2013). DOI: [10.1016/j.bmcl.2013.08.037](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.037)
- [36] Gao, H., Su, P., Shi, Y., Shen, X., Zhang, Y., Dong, J. & Zhang, J. Discovery of novel VEGFR-2 inhibitors. Part II: Biphenyl urea incorporated with salicylaldehyde. *Eur. J. Med. Chem.* **90**. 232–240. (2014). DOI: [10.1016/j.ejmech.2014.11.032](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.032)
- [37] Saudale, F. Z., Lerrick, R. I., Parikesit, A. A. & Mariti, F. Chemistry teachers' awareness, understanding, and confidence toward computational tools for molecular visualization. *J. Pendidik. IPA Indones.* **8**. 436–446. (2019). DOI: [10.15294/jpii.v8i4.21437](https://doi.org/10.15294/jpii.v8i4.21437)
- [38] Saudale, F. Z. & Suatu, I. R. S. Pemodelan Homologi Komparatif FABP Belalang Kembara (*Locusta migratoria*) Dengan PHYRE2 dan Skrining Virtual Inhibitor Potensial. *Indo. J. Chem. Res.* **7**. 127–140. (2020). DOI: [10.30598/ijcr.2020.7-fre](https://doi.org/10.30598/ijcr.2020.7-fre)
- [39] Saudale, F. Z., Tokan, M. B., Leo, S. Y. & Ati, S. P. FFAR4/GPR120 sebagai Target Desain dan Pengembangan Obat Diabetes Melitus Tipe 2 in silico: Suatu Tinjauan dan Perspektif. *Chem. Notes*. **1**. 12–35. (2020).