



In Silico Study of 5-BOTP and ADPB as Carriers of Radiotheranostic Compounds Against Lat-1

Holis A. Holik^{1,4}, Angela A. Elaine¹, Bernap D. P. Sitinjak¹, Shofura M. Qolbina¹, Faisal M. Ibrahim¹, Arifudin Achmad^{2,4}, Bambang S. A. Sudarmanto³, Achmad H. S. Kartamihardja^{2,4}

¹Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia.

²Departemen Kedokteran Nuklir, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

³Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia.

⁴Pusat Kolaborasi Riset Radiofarmaka Teranostik Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

Submitted 30 May 2024; Revised 29 June 2024; Accepted 09 July 2024; Published 28 October 2024

*Corresponding author: holis@unpad.ac.id

Abstract

The complexity of cancer pathogenesis makes it difficult to identify the right therapeutic target, leading to low success rates in clinical trials for cancer-related drugs. Therefore, developing a new intervention technique for cancer patients is crucial. Large-type Amino Acid Transporter 1 (LAT-1) is overexpressed in cancer cells when compared to normal cells, making it one of the particular molecular targets for cancer therapy. LAT-1 provides nutrition to cancer cells to proliferate massively so that the inhibition of LAT-1 can be used as an alternative therapy. This study aims to obtain a good activity of radiotheranostic kit for cancer by two potential compounds, 5-Benzyloxytryptophan (5-BOTP) and (S)-2-amino-4-(3,5-dichlorophenyl) butanoic acid (ADPB), with linker and bifunctional chelating agents against the antiporter site of the LAT-1. The research method consisted of the binding mode of 5-BOTP and ADPB with their derivatives with LAT-1, the docking score, and the analysis of pre-ADMET. The results showed that 5-BOTP-6AHAH2CB-DO2A and ADPB-6AHA-H2CB-DO2A have the best affinity and easier made binding complex with LAT-1, making it a potential radiotheranostic agent of cancer by inhibiting LAT-1.

Keywords: (S)-2-amino-4-(3,5-dichlorophenyl) butanoic acid, 5-Benzyloxytryptophan, Cancer, LAT-1, Radiotheranostic

Studi In Silico Senyawa 5-BOTP dan ADPB sebagai Senyawa Pembawa Radioteranostik terhadap LAT-1

Abstrak

Kompleksitas patogenesis kanker menyulitkan penentuan target terapi yang tepat, sehingga tingkat keberhasilan obat baru dalam uji klinis rendah. Oleh karena itu, studi pengembangan teknik intervensi yang baru untuk pasien kanker sangat penting. *Large-type Amino Acid Transporter 1* (LAT-1) diekspresikan secara berlebihan dalam sel kanker jika dibandingkan dengan sel normal, menjadikannya salah satu target molekuler khusus untuk terapi kanker. LAT-1 menyediakan nutrisi pada sel kanker untuk berkembang sehingga penghambatan LAT-1 dapat dijadikan alternatif terapi. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa potensial yang akan digunakan untuk radioteranostik dengan dua inhibitor LAT-1, 5-Benzyloxytryptophan (5-BOTP) dan asam (S)-2-amino-4-(3,5-diklorofenil) butanoat (ADPB), yang dikonjugasikan dengan linker dan agen pengkelat bifungsional terhadap situs antiporter LAT-1. Metode penelitian meliputi pengikatan senyawa 5-BOTP dan ADPB terkonjugasi dengan LAT-1, simulasi penambatan molekuler, dan analisis pre-ADMET. Hasil penelitian menunjukkan 5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A dan ADPB-6AHA-H2CB-DO2A memiliki afinitas terbaik dan kompleks pengikatan yang terbaik dengan LAT-1, menjadikannya agen radioteranostik potensial untuk kanker dengan menghambat LAT-1.

Kata Kunci: asam (S)-2-amino-4-(3,5-diklorofenil) butanoat, 5-Benzyloxytryptophan, Kanker, LAT-1, Radioteranostik

1. Pendahuluan

Menurut *World Health Organization* (WHO), kanker menyebabkan lebih dari 9,6 juta kematian per tahun. Hal ini menjadikan kanker sebagai penyakit utama kedua penyebab kematian setelah penyakit kardiovaskular pada tahun 2018.¹ Tantangan utama dalam menemukan target terapi yang tepat untuk kanker, yaitu sulitnya memahami patogenesis kanker yang sampai saat ini masih banyak diteliti. Hingga kini, karena patogenesis yang rumit, tingkat keberhasilan obat kanker dalam uji klinis masih rendah, hanya sekitar 3,4%.^{2,3} Sehingga, metode intervensi baru untuk pasien kanker sangat penting untuk dikembangkan.

Large-type amino acid transporter (LAT-1) adalah protein transporter yang terlibat dalam transpor asam amino esensial yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel. LAT-1 diekspresikan secara berlebihan dalam sel kanker karena kebutuhan asam amino yang meningkat pada sel kanker, tetapi keberadaan LAT-1 terbatas pada sel normal.⁴ Ekspresi LAT-1 yang berlebihan dalam sel kanker dan keberadaannya spesifik dalam sel kanker membuat LAT-1 menjadi target kanker yang menjanjikan untuk terapi dan molekul diagnostik (*theranostic*).⁵

Deteksi dini dan pengobatan kanker dalam tubuh manusia merupakan tantangan yang cukup besar. Salah satu metode yang saat ini dapat digunakan untuk mendiagnosa dan mengobati kanker adalah dengan menggunakan radiofarmaka. Radiofarmaka adalah zat yang mengirimkan atom radioaktif ke sel target. Radiasi pada radiofarmaka tidak diberikan dari luar tubuh seperti pada radioterapi. Sebaliknya, radiofarmaka bekerja secara sistemik atau regional pada jaringan kanker. Keuntungan menggunakan senyawa radiofarmaka adalah spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi, tidak merusak sel, serta tidak memberikan rasa nyeri seperti prosedur pembedahan.⁶

Singh *et al.*, 2018 melakukan studi terhadap senyawa 5-Benzyloxytryptophan (5-BOTP) dan asam (S)-2-amino-4-(3,5-diklorofenil) butanoat (ADPB) secara *in vitro*. 5-BOTP memiliki nilai IC_{50} sebesar

$1.48 \pm 0.27 \mu\text{M}$ dan ADPB sebesar $0,64 \pm 0,27 \mu\text{M}$ terhadap reseptor LAT-1.⁷ Hasil ini membuat 5-BOTP memiliki kekuatan 4 kali lebih kuat dan ADPB 10 kali lebih kuat menghambat LAT-1 jika dibandingkan dengan inhibitor reseptor LAT-1.^{2,3,4} yang telah dikembangkan dalam uji praklinis, yaitu asam 2-aminobisiklik-(2.2,1)-heptan-2-karboksilat (BCH).⁷ Maka dari itu 5-BOTP dan ADPB memiliki potensi untuk digunakan sebagai molekul pembawa (*carrier*) senyawa radiofarmaka yang menargetkan protein LAT-1 karena afinitasnya yang tinggi terhadap LAT-1.

Meskipun dapat berinteraksi dengan LAT-1, 5-BOTP dan ADPB tidak dapat dilabel secara langsung dengan logam radiokatif. Suatu senyawa kelator yang dikombinasikan terhadap 5-BOTP maupun ADPB diperlukan untuk menstabilkan posisi radionuklida agar stabil ketika radiofarmaka diberikan ke dalam tubuh pasien.⁸ Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan interaksi molekuler beserta sifat farmakokinetik yang terdiri dari absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas (ADMET) dari senyawa 5-BOTP dan ADPB yang dikombinasikan dengan *linker* dan berbagai kelator bifungsional melalui studi *in silico* untuk dapat dimanfaatkan sebagai senyawa pembawa radionuklida untuk terapi dan deteksi kanker.

2. Metode

2.1. Hardware

Komputer pribadi portabel dengan Intel Core i7-7700HQ 4-core 8-thread, CPU 2,80 GHz dengan GPU GTX 950M dan RAM 8 GB

2.2. Software

ChemDraw Ultra 12.0 dan *Chem3D Pro* 12 untuk mendesain struktur 2D dan mengkonversi struktur 2D menjadi struktur 3D, *LigandScout Advanced* 4.1 untuk visualisasi interaksi kompleks ligan-protein, *AutoDock* 4.2.6 dan *AutoDockTools* 1.5.6 untuk simulasi penambatan molekuler, *BIOVIA Discovery Studio* 2017 R2 *Client* untuk visualisasi kompleks PDB, ikatan antara

ligan dan reseptor, dan optimalisasi geometri, dan Pre-ADMET dan vNN-ADMET untuk melakukan prediksi sifat farmakokinetik (ADME) dan toksisitas.

2.3. Prosedur

2.3.1. Pemodelan Struktur Senyawa Radioteranostik

Struktur 3D LAT-1 diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB) (www.rscb.org, PDB ID: 7DSQ). Sebagai hasil mikroskop elektron, LAT-1 dikomplekskan dengan *native ligand*, yaitu molekul 3,5-Diiodotirosin (PUBCHEM ID:28094582). Pemisahan antara LAT-1 dengan 3,5-diiodotirosin dengan dilakukan dengan menggunakan *BIOVIA Discovery Studio 2017 R2 Client*. Struktur 2D dari ligan pengujian, yaitu struktur kit radioteranostik didesain dengan menggunakan *ChemDraw Ultra 12.0*. Struktur kit radioteranostik terdiri dari senyawa pembawa, *linker*, dan kelator. Struktur 2D dari kit radiotheranostik kemudian dikonversi menjadi struktur 3D dan dilakukan minimisasi energi dengan menggunakan *Chem3D Pro 12*.

2.3.2. Validasi Metode Simulasi Penambatan Molekuler

Validasi metode simulasi penambatan molekul dilakukan melalui penambatan ulang (*redocking*) senyawa *native ligand* (3,5-Diiodotirosin) terhadap situs aktif LAT-1. Validasi dilakukan dengan menggunakan *Autodock 4.2.6*. Dari hasil validasi akan diambil data nilai grid pada koordinat x,y, dan z; nilai energi ikatan; serta nilai *root mean square deviation* (RMSD) untuk mengetahui besaran simpangan hasil validasi.

2.3.3. Simulasi Penambatan Molekuler dan Visualisasi Interaksi Asam Amino

Sebelum dilakukan simulasi penambatan molekul, dilakukan analisis aktivitas dari senyawa uji terhadap LAT-1 berdasarkan QSAR. LAT-1 merupakan salah satu marker pada sel kanker, oleh karena itu ditentukan aktivitas dari senyawa uji terhadap kanker. Analisis QSAR dilakukan pada situs *way2drug* (<https://www.way2drug.com/PassOnline/predict.php>). Simulasi

penambatan molekul antara LAT-1 dan ligan dilakukan dengan menggunakan *AutoDock 4.2.6*. Ligan dengan energi ikatan terendah (ΔG) dipilih dan setiap interaksi ligan dengan residu asam amino LAT-1 divisualisasikan dengan *Biovia Discovery Studio* dan *LiganScout*.

2.3.4. Prediksi Sifat Farmakokinetik (ADME) dan Toksisitas

Prediksi sifat farmakokinetik (ADME) dan toksisitas (*drug-induced liver injury* dan kardiotoxikisitas dari senyawa diprediksi menggunakan vNN-ADMET (<https://vnnadmet.bhsai.org/vnnadmet/login.xhtml>) oleh *Schyman* dan pre-ADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>). Selain itu, dilakukan juga analisis *druglikeness* berdasarkan parameter *Lipinski Rule of Five* pada situs SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>).

3. Hasil

3.1. Validasi Metode Simulasi Penambatan Molekuler

Hasil validasi metode ditunjukkan dengan nilai RMSD sebesar 1,513 Å. Suatu metode simulasi penambatan molekul dapat dikatakan valid jika memberikan nilai RMSD kurang dari 2 Å. Berdasarkan hasil validasi metode, nilai koordinat situs penambatan molekul yang akan diterapkan terhadap senyawa uji adalah x=147,492; y=139,811; z=134,686.

3.2. Pemodelan Struktur Senyawa Radioteranostik

Struktur senyawa uji didesain secara 2D dengan menggunakan perangkat *ChemDraw Ultra 12.0* dan diubah menjadi struktur 3D menggunakan *Chem3D Pro 12.0*. Hasil modifikasi struktur 5-BOTP dan ADPB menjadi senyawa radiofarmaka dapat dilihat pada tabel 1 dan tabel 2. Desain senyawa dilakukan dengan memodifikasi struktur 5-BOTP dan ADPB melalui ikatan amida antara amina primer pada struktur 5-BOTP dan ADPB dengan gugus karboksilat yang terdapat pada senyawa *linker* asam 6-aminohexanoid (6-AHA). Kemudian

Tabel 1. Struktur Senyawa Radioteranostik dengan Senyawa Pembawa 5-BOTP

Senyawa	Formula Empiris	Struktur 2D
5-BOTP (PUBCHEM ID: 97908)	$C_{18}H_{18}N_2O_3$	
5-BOTP-6AHA-CTPA	$C_{42}H_{57}N_7O_5$	
5-BOTP-6AHA-DOTA	$C_{34}H_{44}N_6O_{10}$	
5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A	$C_{38}H_{53}N_7O_7$	
5-BOTP-6AHA-H2CB-TE2A	$C_{40}H_{57}N_7O_7$	
5-BOTP-6AHA-NOTA	$C_{36}H_{48}N_6O_9$	
5-BOTP-6AHA-TETA	$C_{42}H_{59}N_7O_{11}$	

senyawa linker 6-AHA dikonjugasikan pada 6-AHA dengan gugus karboksilat yang melalui ikatan amida antara amina primer terdapat pada kelator.

Tabel 2. Struktur Senyawa Radioteranostik dengan Senyawa Pembawa ADPB

Senyawa	Formula Empiris	Struktur 2D
ADPB (PUBCHEM ID: 72208946)	$C_{10}H_8NH_2O_2$	
ADPB-6AHA-CTPA	$C_{34}H_{50}Cl_2N_6O_4$	
ADPB-6AHA-DOTA	$C_{32}H_{48}Cl_2N_6O_{10}$	
ADPB-6AHA-H2CB-DO2A	$C_{30}H_{46}Cl_2N_6O_6$	
ADPB-6AHA-H2CB-TE2A	$C_{32}H_{50}Cl_2N_6O_6$	
ADPB-6AHA-NOTA	$C_{28}H_{41}Cl_2N_5O_8$	
ADPB-6AHA-TETA	$C_{34}H_{52}Cl_2N_6O_{10}$	

3.3. Simulasi Penambatan Molekuler

Hasil analisis aktivitas berdasarkan struktur senyawa uji dapat dilihat pada tabel 3. Hasilnya menunjukkan bahwa 11 dari 12 senyawa uji memiliki aktivitas sebagai antikanker/antineoplastik dengan $Pa > 0,3$. Pada simulasi penambatan molekuler,

senyawa uji ditambatkan berdasarkan koordinat grid box yang telah diperoleh pada tahapan validasi metode penambatan molekuler. Hasil yang diperoleh berupa nilai energi ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (KI) yang ditunjukkan pada tabel 4. Berdasarkan tahapan simulasi penambatan molekuler, senyawa dengan nilai energi ikatan paling

Tabel 3. Hasil Analisis Aktivitas Berdasarkan Struktur Senyawa Uji (QSAR).

Senyawa	Pa	Aktivitas terkait Kanker
5-BOTP-6AHA-CTPA	0,34	<i>Antineoplastic (Non-Hodgins's Lymphoma)</i>
5-BOTP-6AHA-DOTA	0,343	<i>Cancer associated disorders treatment</i>
5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A	0,325	<i>Cancer associated disorders treatment</i>
5-BOTP-6AHA-H2CB-TE2A	0,34	<i>Cancer associated disorders treatment</i>
5-BOTP-6AHA-NOTA	0,343	<i>Cancer associated disorders treatment</i>
5-BOTP-6AHA-TETA	0,349	<i>Cancer associated disorders treatment</i>
ADPB-6AHA-CTPA	0,371	<i>Antineoplastic (Non-Hodgins's Lymphoma)</i>
ADPB-6AHA-DOTA	0,315	<i>Cancer associated disorders treatment</i>
ADPB-6AHA-H2CB-TE2A	0,311	<i>Cancer associated disorders treatment</i>
ADPB-6AHA-NOTA	0,315	<i>Cancer associated disorders treatment</i>
ADPB-6AHA-TETA	0,322	<i>Cancer associated disorders treatment</i>

rendah dari masing-masing senyawa pembawa, yaitu 5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A ($\Delta G = -5,30$ kkal/mol) untuk senyawa pembawa 5-BOTP dan ADPB-6AHA-H2CB-DO2A ($\Delta G = -5,25$ kkal/mol) untuk senyawa pembawa ADPB.

3.4. Prediksi ADMET berbasis Ligan

Pada tahapan prediksi ADMET diperoleh nilai yang menggambarkan sifat farmakokinetik senyawa uji dan parameter toksisitas. Tabel 4 menunjukkan senyawa dengan ΔG terendah, 5-BOTP-LINKER-H2CB-DO2A dan ADPB-6AHA-H2CB-DO2A, memiliki HIA yang baik yakni 87,88% dan 94,12% serta tidak menembus BBB dan

Tabel 4. Hasil Simulasi Penambatan Molekuler Senyawa Radioteranostik dengan Senyawa Pembawa 5-BOTP dan ADPB

Senyawa	ΔG (kkal/mol)	KI (μM)	Interaksi Ligan-Reseptor
5-BOTP (lead compound)	-8,05		Ser66, Gly65, Ser338, Ile63, Lys204, Thr62, Gly61
JPH203 (control)	-9,4	1,2E-07	Glu136, Lys132, Asn258, Asn404, Phe252
5-BOTP-6AHA-CTPA	4,14	-	Trp257, Gly256, Gly255, Ser401
5-BOTP-6AHA-DOTA	2,29	-	Trp257, Asn404, Phe252, Tyr259, Ser144, Ile63, Gly67, Gly65, Ser66, Ser338, Cys335, Thr62, Gly255, Ala253.
5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A	-5,30	59,05	Arg141, Phe262, Glu136, Tyr259, Ser144, Ser66, Asn404, Asp116
5-BOTP-6AHA-H2CB-TE2A	-1,84	44,77x103	Gly256, Ser144, Tyr259, Ser66
5-BOTP-6AHA-NOTA	-1,90	40,16x103	Trp257, Asn404, Ser144, Tyr259, Ser66, Gly67, Phe400, Gly256
5-BOTP-6AHA-TETA	1,62	-	Ser342, Thr62, Trp257, Asn258, Gly256, Asn404, Leu251, Gly255, Ile63, Phe252, Ser144
ADPB (lead compound)	-6,57	15,23	Phe252, Gly255, Ser66
BCH (control)	-5,25	142,14	Phe252, Gly255, Ser66, Gly67, Ile64
ADPB-6AHA-CTPA	-5,89	48,45	Asn404, Ser 144, Ser338
ADPB-6AHA-DOTA	-4,3	703,52	Asn404, Gly255, Ser338, Ile63
ADPB-6AHA-H2CB-DO2A	-6,9	8,81	Leu 251, Asn 404, Gly 61, Thr62
ADPB-6AHA-H2CB-TE2A	-5,49	94,17	-
ADPB-6AHA-NOTA	-3,76	1,77	Asn404, Ser 338, Ser 66
ADPB-6AHA-TETA	1,94	-	Gly255, Ile 63, Gly67, Leu251, Asn404

Tabel 4. Hasil Simulasi Penambatan Molekuler Senyawa Radioteranostik dengan Senyawa Pembawa 5-BOTP dan ADPB

Senyawa	HIA (%)	PPB (%)	BBB	HLM	CYP					DILI	Kardio toksisitas	Drug likeness
					1A2	3A4	2D6	2C	2C19			
5-BOTP-6AHA-CTPA	88,15	26,01	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No (3 violations)
5-BOTP-6AHA-DOTA	65,16	15,90	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No (3 violations)
5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A	87,88	19,01	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No (2 violations)
5-BOTP-6AHA-H2CB-TE2A	88,90	14,79	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No (2 violations)
5-BOTP-6AHA-NOTA	80,60	18,65	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No (3 violations)
5-BOTP-6AHA-TETA	70,54	12,10	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No (3 violations)
ADPB-6AHA-CTPA	92,17	37,08	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	No (2 violations)
ADPB-6AHA-DOTA	69,28	18,48	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No	No (3 violations)
ADPB-6AHA-H2CB-DO2A	94,12	26,31	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No	No (2 violations)
ADPB-6AHA-H2CB-TE2A	94,21	17,76	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No	No (2 violations)
ADPB-6AHA-NOTA	84,82	23,23	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No	No (2 violations)
ADPB-6AHA-TETA	74,59	12,75	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No	No (3 violations)

Catatan:

- Human Intestinal Absorption (HIA)*: buruk (0-20%), sedang (20-70), baik (70-100%).
- Protein Plasma Binding (PPB)*: lemah (<90%), kuat (>90%).
- Blood-Brain Barrier (BBB)*: melintasi sawar otak (Yes), tidak melintasi sawar otak (No).
- Human Liposomal Metabolism (HLM)*
- CYP inhibitors*: 1A2; 3A4; 2D6; 2C9; 2C19.
- Drug Induced Liver Injury (DILI)* dan kardiotoxikisitas
- Druglikeness* ditentukan berdasarkan *Lipinski Rule of Five*

bukan penghambat CYP. Hasil menunjukkan bahwa 2 kandidat kit radiofarmasi tersebut tidak menimbulkan efek di otak dan tidak akan mengalami kerusakan obat sebelum obat mencapai reseptor. Berdasarkan parameter toksisitas, 5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A tidak dapat merangsang Drug-induced Liver Injury (DILI) dan tidak bersifat kardiotoxik. Sedangkan senyawa ADPB-6AHA-H2CB-DO2A memiliki potensi *Drug-induced Liver Injury*. Dari hasil druglikeness dengan menggunakan *Lipinski Rule of Five*, menunjukkan bahwa seluruh senyawa uji tidak memenuhi persyaratan karena hasilnya tidak sesuai dengan persyaratan *Lipinski Rule of Five*, yaitu bobot molekul kurang dari 500 dalton, ikatan donor hidrogen kurang dari 5, ikatan hidrogen akseptor kurang dari 10, dan log P kurang dari 5.

4. Pembahasan

4.1. Validasi Metode Simulasi Penambatan Molekuler

Validasi metode simulasi penambatan molekul dilakukan sebagai prosedur untuk memastikan metode dan perangkat lunak (*software*) yang digunakan untuk proses penambatan molekul sudah tervalidasi dan memenuhi standar serta dapat diimplementasikan sebagai prosedur pengujian dan simulasi penambatan molekul. Validasi metode simulasi penambatan molekul dilakukan dengan menambatkan kembali (*redocking*) ligan alami terhadap reseptornya yang terlebih dahulu telah dipisahkan. Pada validasi yang dilakukan, 3,5-diiodotirosin dilakukan penambatan ulang terhadap LAT-1. Parameter yang menunjukkan konformasi hasil *redocking* yang baik ditunjukkan oleh nilai Root Mean Square Deviation (RMSD) $\leq 2,0 \text{ \AA}$.⁹ Hasil dari validasi metode simulasi penambatan molekul yang dilakukan menunjukkan nilai RMSD yang diperoleh sebesar $1,513 \text{ \AA}$ (tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa metode yang dilakukan untuk penambatan molekul telah tervalidasi dan memenuhi standar sehingga dapat diaplikasikan untuk metode simulasi penambatan molekul senyawa uji terhadap protein atau reseptor target.

4.2. Pemodelan Struktur Senyawa Radioteranostik

Dalam merancang struktur 2D senyawa radioteranostik digunakan perangkat lunak *ChemDraw Ultra 12.0* (tabel 1 dan tabel 2). Struktur 2D senyawa radioteranostik terdiri dari senyawa pembawa, senyawa linker, dan kelator (BFCA). Senyawa pembawa yang digunakan merupakan senyawa yang memiliki aktivitas terhadap reseptor atau protein target, yaitu LAT-1. Senyawa linker yang digunakan merupakan senyawa asam 6-aminohexanoid (6-AHA) yang bertujuan untuk memodifikasi sifat farmakokinetik dari senyawa radioteranostik yang didesain. Senyawa kelator yang dikongjugasikan terhadap senyawa pembawa dan linker bertujuan untuk membentuk kompleks yang stabil dengan radionuklida. Sebagian besar dari senyawa pembawa tidak memiliki kemampuan untuk membentuk kompleks yang stabil dengan radionuklida, sehingga memerlukan kelator untuk berinteraksi dengan radionuklida.¹⁰

Struktur 2D yang telah didesain kemudian dikonversi menjadi struktur 3D dengan menggunakan *Chem3D*. Struktur 3D dari senyawa uji kemudian dioptimasi dengan melakukan minimisasi energi pada perangkat yang sama. Optimasi bertujuan untuk mendapatkan molekul 3D dari senyawa uji dengan bentuk geometri yang paling stabil. Struktur 3D yang telah dioptimasi dapat digunakan untuk simulasi penambatan molekul dengan protein target (LAT-1). Protein target LAT-1 (PDB ID: 7DSQ) diunduh dari situs Protein Data Bank. Protein dengan PDB ID: 7DSQ digunakan dalam penelitian karena memiliki parameter eksperimental yang baik, yaitu resolusi eksperimental $3,40 \text{ \AA}$. Nilai tersebut dapat dikatakan telah memenuhi persyaratan sebagai reseptor yang baik.¹¹ Struktur kristal dari protein LAT-1 dipreparasi dengan menggunakan perangkat *Biovia Discovery Studio 2017*. Molekul air dan native ligand protein dipisahkan dengan tujuan menyederhanakan proses kalkulasi dalam simulasi penambatan molekul.

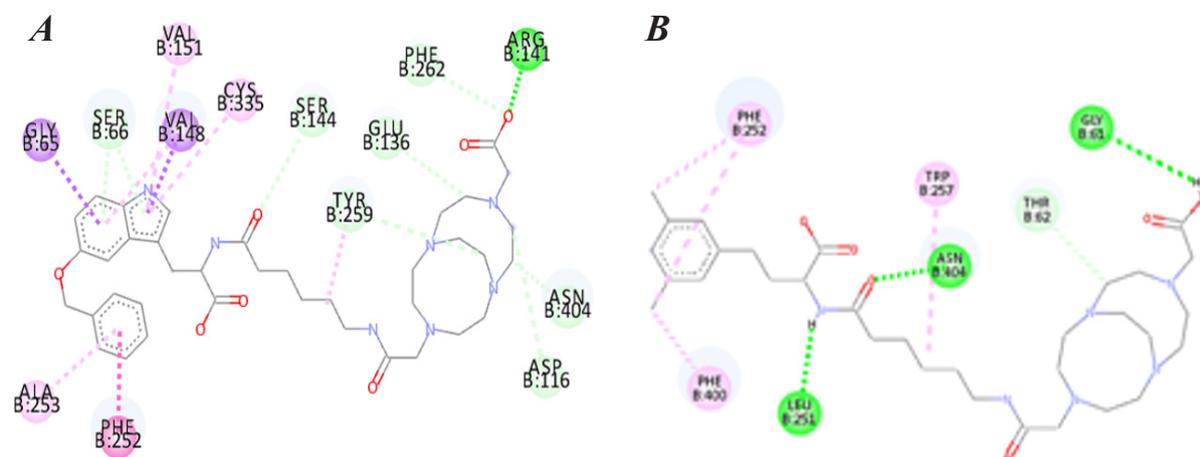
4.3. Simulasi Penambatan Molekuler

Hasil analisis QSAR menunjukkan bahwa 11 dari 12 senyawa uji memiliki probabilitas aktivitas intermediate terhadap sel kanker dengan nilai P_a sekitar 0,3. Simulasi penambatan molekuler merupakan teknik pemodelan molekul yang digunakan untuk memprediksikan interaksi antara protein dengan ligannya. Berdasarkan hasil simulasi penambatan molekuler senyawa radioteranostik dengan senyawa pembawa 5-BOTP terhadap LAT-1, senyawa pembawa yang dikonjugasikan dengan kelator H2CB-DO2A, H2CB-TE2A, dan NOTA memiliki energi ikatan negatif, sementara tiga senyawa yang dikonjugasikan dengan kelator TETA, DOTA, dan CTPA menunjukkan nilai energi ikatan yang positif (tabel 4). Hasil simulasi penambatan molekuler senyawa radioteranostik dengan senyawa pembawa ADPB menunjukkan hasil energi ikatan yang negatif untuk seluruh senyawa uji (tabel 4). Energi ikatan menentukan kekuatan interaksi antara ligan dengan reseptor. Energi ikatan yang negatif menunjukkan interaksi yang kuat dengan reseptor.¹² Selain itu, energi ikatan memiliki hubungan yang sebanding dan linier terhadap konstanta inhibisi (KI) dimana senyawa dengan energi ikatan lebih negatif akan memiliki nilai KI yang lebih rendah.¹³ Oleh karena itu, senyawa dengan energi positif dikeluarkan dari kandidat karena energi ikatan dan KI yang kurang potensial untuk berinteraksi dengan protein target.

Menurut Sing *et al* (2018), interaksi

terhadap LAT-1 akan semakin baik jika senyawa memiliki cincin benzen dikarenakan situs interaksi LAT-1 yang bersifat hidrofobik. 5-BOTP memiliki karboksil, amida, maupun oksigen pada posisi meta atau para yang terlibat pada interaksi hidrofobik terhadap sisi aktif LAT-1. Sedangkan senyawa ADPB memiliki struktur meta tirosin yang tersubstitusi halida. Sisi aktif LAT-1 yang dipenuhi gugus aromatik akan bertindak sebagai akseptor ikatan halogen dan donor hidrogen dengan halogen sehingga mendukung ikatan terhadap LAT-1.⁷

Dari kedua jenis senyawa radioteranostik yang didesain dengan menggunakan dua jenis senyawa pembawa, yaitu 5-BOTP dan ADPB, senyawa 5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A dan ADPB-6AHA-H2CB-DO2A memenuhi parameter simulasi penambatan molekuler yang paling baik dengan energi ikatan untuk masing-masing senyawa sebesar $-5,3$ kkal/mol dan $-6,9$ kkal/mol (tabel 4 dan 5). Selain nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi, interaksi ligan dengan asam amino dari protein target menentukan potensi interaksi yang terjadi antara ligan-reseptor. Kemampuan suatu ligan untuk berinteraksi dengan asam amino fungsional (asam amino katalitik) dari suatu protein target sangat penting untuk mengaktifasi protein. Protein LAT-1 memiliki asam amino fungsional Tyr117, Phe252, Trp257, Asn258, Tyr259, dan Arg348.⁴ Senyawa yang diuji harus memiliki interaksi dengan asam amino fungsional untuk dapat mengaktifkan protein dan memberikan aktivitas. 5-BOTP-6AHA-



Gambar 1. Interaksi ligan reseptor (a) 5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A dan (b) ADPB-6AHA-H2CB-DO2A

H2CB-DO2A dan ADPB-6AHA-H2CB-DO2A memiliki interaksi berupa ikatan hidrogen dengan asam amino fungsional seperti yang ditunjukkan pada gambar 1. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara residu asam amino dan ligan sangat penting karena ikatan hidrogen yang lebih kuat dan lebih stabil.⁴

4.4. Prediksi ADMET berbasis Ligan

Farmakokinetik merupakan suatu kejadian yang menjelaskan terkait proses absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi dari senyawa obat di dalam tubuh manusia.¹⁴ Tujuan dilakukan prediksi sifat farmakokinetik (ADME) dan toksisitas dalam proses penemuan dan pengembangan senyawa obat adalah untuk menghindari adanya masalah farmakokinetik yang ditimbulkan oleh senyawa obat. Oleh karena itu, prediksi absorpsi (HIA), distribusi (PPB dan BBB), metabolisme (HLM dan CYP inhibitor), dan toksisitas (DILI dan kardiotoksitas) penting dilakukan untuk memprediksikan farmakokinetik dan toksisitas dari kandidat obat. Parameter absorpsi dinyatakan dalam persen HIA yang menunjukkan jumlah absorpsi obat dalam usus manusia dan menentukan jumlah bioavailabilitas obat dalam usus manusia.¹⁵ Absorpsi obat pada usus kecil manusia sangat penting untuk menentukan bioavailabilitas (ketersediaan) obat yang diberikan secara oral di dalam tubuh. Seluruh senyawa radioteranostik yang didesain dengan menggunakan 5-BOTP dan ADPB sebagai senyawa pembawa menunjukkan kemampuan absorpsi yang baik dan cukup (%HIA: 70 – 100%).

Profil distribusi PPB menentukan derajat ikatan obat dengan protein plasma. Ikatan tersebut disebabkan adanya albumin yang cenderung mengikat obat yang bersifat asam dan netral, sementara glikoprotein mengikat senyawa bersifat basa. Nilai ikatan protein plasma dipengaruhi oleh lipofilisitas, dimana senyawa yang lebih lipofil akan menghasilkan PPB yang lebih besar. Apabila nilai ikatan terhadap protein plasma lebih kecil semakin mudah mencapai reseptor target.¹⁶ Senyawa konjugat ADPB maupun 5-BOTP memiliki

nilai PPB yang rendah (PPB < 90%). Hal ini dipengaruhi karena struktur pada 6-AHA dan BFCA yang didominasi gugus polar seperti karboksilat sehingga cenderung bersifat lebih hidrofilik. Nilai PPB melebihi 90% menunjukkan senyawa terikat kuat dengan protein plasma dan dapat menyebabkan sulitnya senyawa untuk berdifusi ke dalam jaringan.

Parameter distribusi lainnya adalah *Blood-Brain Barrier* (BBB) yang menunjukkan kemampuan senyawa untuk menembus sawar otak dan tersebar ke sistem saraf pusat. Obat yang dimaksudkan untuk berinteraksi dengan target molekulernya di sistem saraf pusat harus mampu melewati sawar otak untuk digunakan sebagai agen terapi. Sebaliknya, obat-obatan yang tidak dimaksudkan masuk ke dalam sistem saraf pusat tidak didesain untuk melewati sawar otak dengan tujuan menghindari efek samping yang tidak diinginkan.¹⁷ Senyawa dengan nilai BBB lebih dari 2,0 menunjukkan mampu berdifusi melewati sawar otak dengan baik, sedangkan senyawa dengan nilai BBB kurang dari 0,1 menunjukkan kemampuan senyawa untuk berdifusi melewati sawar otak dengan buruk. Senyawa radioteranostik yang ditujukan untuk kanker tidak didesain untuk mampu melewati sawar otak agar mudah dieliminasi, sehingga senyawa uji diharapkan memiliki nilai BBB pada rentang 2,0 – 0,1 atau nilai BBB kurang dari 0,1. Seluruh senyawa radioteranostik yang didesain dan diprediksikan kemampuannya untuk melewati sawar otak menunjukkan kemampuan difusi yang buruk.

Human Liver Microsomal (HLM) dan *cytochrome P450* (CYP) merupakan parameter yang digunakan untuk memprediksi profil metabolisme obat oleh hati. HLM adalah parameter untuk mengidentifikasi senyawa yang cepat dimetabolisme oleh hati. Senyawa obat diharapkan tidak dimetabolisme terlalu cepat oleh hati untuk mencapai konsentrasi terapeutik yang efektif. Konsentrasi obat yang stabil dalam tubuh manusia yang dinyatakan dengan $t_{1/2}$ lebih besar dari 30 menit.¹⁸ Selanjutnya untuk mengamati interaksi obat maka dilakukan prediksi terhadap enzim

cytochrome p450 (CYP 450). Lima isoform CYP manusia paling penting yang terkait dengan metabolisme obat adalah 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, dan 3A4.¹⁹ Berdasarkan hasil prediksi senyawa radioteranostik dengan senyawa pembawa ADPB dan 5-BOTP tidak menghambat enzim sitokrom P450.

Prediksi toksisitas senyawa uji dilakukan dengan melihat parameter DILI (*Drug-Induced Liver Injury*) dan human *Ether-à-go-go-Related Gene* (hERG). DILI merupakan reaksi obat pada dosis toksis terhadap kerusakan hati.²⁰ Sementara parameter hERG menggambarkan blokade fungsi jantung yang diinduksi oleh obat.²¹ Berdasarkan hasil prediksi, senyawa 5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A tidak menunjukkan risiko toksisitas, namun ADPB-6AHA-H2CB-DO2A memiliki potensi memicu DILI sehingga diperlukan analisis lanjutan berupa *in vitro* maupun *in vivo* untuk mendapatkan dosis toksik dari senyawa tersebut.

Aturan Lipinski bertujuan menilai apakah suatu senyawa memiliki sifat kimia dan fisik yang sesuai untuk sediaan oral. Menurut Aturan Lipinski, secara umum, obat oral sebaiknya tidak melanggar lebih dari satu kriteria. Adapun aturan lipinski antara lain jumlah donor ikatan hidrogen ≤ 5 , jumlah akseptor ikatan hidrogen ≤ 10 , berat molekul < 500 , dan $\text{Log P} \leq 5$.²² Berdasarkan hasil pengujian tidak terdapat satu senyawa yang memenuhi persyaratan. Hal ini dikarenakan berat molekul lebih besar dari 500 dan akseptor elektron lebih dari 10. Ligan dengan berat molekul kurang dari 500 Da lebih mudah menembus membran sel dibandingkan dengan yang berat molekulnya lebih dari 500 Da.²³ Sementara jika jumlah ikatan hidrogen tidak sesuai, aktivitas biologi ligan atau obat bisa berkurang, karena ikatan dengan molekul targetnya menjadi lebih lemah atau tidak spesifik.²⁴

5. KESIMPULAN

Studi *in silico* yang terdiri dari simulasi penambatan molekuler dan prediksi sifat farmakokinetik (ADME) serta toksisitas dari senyawa kit radiofarmaka dengan senyawa pembawa 5-BOTP dan ADPB terhadap

protein target LAT-1 telah dilakukan. Senyawa pembawa berupa 5-BOTP dan ADPB dikonjugasikan dengan senyawa linker (6-AHA) dan beberapa senyawa kelator. Senyawa 5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A dan ADPB-6AHA-H2CB-DO2A memberikan nilai energi ikatan yang paling rendah dengan nilai energi ikatan (ΔG) secara berturut-turut sebesar $-5,3$ kkal/mol dan $-6,9$ kkal/mol. Senyawa 5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A dan ADPB-6AHA-H2CB-DO2A juga mampu berinteraksi dengan asam amino katalitik dari LAT-1 sehingga berpotensi untuk memberikan aktivitas inhibisi terhadap LAT-1. Berdasarkan studi *in silico* yang telah dilakukan, senyawa 5-BOTP-6AHA-H2CB-DO2A dan ADPB-6AHA-H2CB-DO2A menjadi kandidat senyawa yang paling potensial sebagai kit radiofarmaka yang ditunjukkan dengan nilai energi ikatan yang rendah, mampu berinteraksi dengan asam amino potensial, serta memberikan hasil prediksi sifat farmakokinetik dan toksisitas yang baik.

Referensi

1. International Agency for Research on Cancer - WHO. The Global Cancer Observatory - All cancers. Globocan. 2020;199-200.
2. Lin A, Giuliano CJ, Palladino A, John KM, Abramowicz C, Yuan M Lou, et al. Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials. *Sci Transl Med*. 2019 Sep 11;11(509).
3. Wong SYS, Zhang D, Sit RWS, Yip BHK, Chung RY nork, Wong CKM, et al. Impact of COVID-19 on loneliness, mental health, and health service utilisation: a prospective cohort study of older adults with multimorbidity in primary care. *British Journal of General Practice*. 2020 Nov;70(700):e817–24.
4. Napolitano L, Galluccio M, Scalise M, Parravicini C, Palazzolo L, Eberini I, et al. Novel insights into the transport mechanism of the human amino acid transporter LAT1 (SLC7A5). Probing critical residues for substrate

- translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2017 Apr;1861(4):727–36.
5. Hayashi K, Jutabha P, Maeda S, Supak Y, Ouchi M, Endou H, et al. LAT1 acts as a crucial transporter of amino acids in human thymic carcinoma cells. *J Pharmacol Sci*. 2016 Nov;132(3):201–4.
 6. Mikolajczak R, van der Meulen NP, Lapi SE. Radiometals for imaging and theranostics, current production, and future perspectives. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2019 Aug 23;62(10):615–34.
 7. Singh N, Scalise M, Galluccio M, Wieder M, Seidel T, Langer T, et al. Discovery of Potent Inhibitors for the Large Neutral Amino Acid Transporter 1 (LAT1) by Structure-Based Methods. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 21;20(1):27.
 8. Furuya M, Horiguchi J, Nakajima H, Kanai Y, Oyama T. Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci*. 2012 Feb 15;103(2):382–9.
 9. Puratchikody A, Sriram D, Umamaheswari A, Irfan N. 3-D structural interactions and quantitative structural toxicity studies of tyrosine derivatives intended for safe potent inflammation treatment. *Chem Cent J*. 2016 Dec 30;10(1):24.
 10. Holik HA, Ibrahim FM, Elaine AA, Putra BD, Achmad A, Kartamihardja AHS. The Chemical Scaffold of Theranostic Radiopharmaceuticals: Radionuclide, Bifunctional Chelator, and Pharmacokinetics Modifying Linker. *Molecules*. 2022 May 10;27(10):3062.
 11. Karplus PA, Diederichs K. Linking Crystallographic Model and Data Quality. *Science* (1979). 2012 May 25;336(6084):1030–3.
 12. Daggupati T, Chitralla KN, Pamanji R, Yeguvapalli S. Molecular screening and analysis of novel therapeutic inhibitors against c-Jun N-terminal kinase. *Medicinal Chemistry Research*. 2017 Sep 19;26(9):2112–8.
 13. IMAN M, SAADABADI A, DAVOOD A. Molecular docking analysis and molecular dynamics simulation study of ameltolide analogous as a sodium channel blocker. *Turk J Chem*. 2015;39:306–16.
 14. Cross ME, Plunkett EVE. *Physics, Pharmacology and Physiology for Anaesthetists*. Cambridge University Press; 2014.
 15. Wang NN, Huang C, Dong J, Yao ZJ, Zhu MF, Deng ZK, et al. Predicting human intestinal absorption with modified random forest approach: a comprehensive evaluation of molecular representation, unbalanced data, and applicability domain issues. *RSC Adv*. 2017;7(31):19007–18.
 16. Jiang M, Niu C, Cao J, Ni D an, Chu Z. In silico-prediction of protein–protein interactions network about MAPKs and PP2Cs reveals a novel docking site variants in *Brachypodium distachyon*. *Sci Rep*. 2018 Oct 10;8(1):15083.
 17. Garg P, Verma J. In Silico Prediction of Blood Brain Barrier Permeability: An Artificial Neural Network Model. *J Chem Inf Model*. 2006 Jan 1;46(1):289–97.
 18. Liu R, Schyman P, Wallqvist A. Critically Assessing the Predictive Power of QSAR Models for Human Liver Microsomal Stability. *J Chem Inf Model*. 2015 Aug 24;55(8):1566–75.
 19. Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J*. 2006 Mar 1;8(1):E101–11.
 20. Ren B, Suriawinata AA, Iwai M. Drug-Induced Liver Injury. In: *Diagnosis of Liver Disease*. Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 85–96.
 21. Schyman P, Liu R, Wallqvist A. General Purpose 2D and 3D Similarity Approach to Identify hERG Blockers. *J Chem Inf Model*. 2016 Jan 25;56(1):213–22.
 22. Pollastri MP. Overview on the Rule of Five. *Curr Protoc Pharmacol*. 2010 Jun;49(1).
 23. O’ Donovan DH, De Fusco C, Kuhnke L, Reichel A. Trends in Molecular Properties, Bioavailability, and Permeability across the Bayer Compound Collection. *J Med Chem*. 2023 Feb 23;66(4):2347–60.

24. Ivanović V, Rančić M, Arsić B, Pavlović A. Lipinski's rule of five, famous extensions and famous exceptions. *Chemia Naissensis*. 2020;3(1):171–81.