

Prediksi Aktivitas Antikanker Payudara Senyawa Fevicordin dari Biji *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. pada ER α Melalui Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas metode Multiple Linear Regression Analysis dan Partial Component Analysis

Muchtaridi^{1*}, A. Mutalib², Jutti Levita, A. Diantini¹, Ida Musfiroh¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Bandung-Sumedang Km. 21 Jatinangor, Indonesia.

²PRR BATAN, Serpong, Indonesia

**korespondensi : muchtaridi@unpad.ac.id*

ABSTRACT

In this study fevicordin is proposed to be used for anti breast-cancer. The development of this compound was based on Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) study of 37 estrogen analogues using MLRA (Multiple Linier Regression Analysis) and PCA (Partial Component Analysis). QSAR equations resulted from MLRA and PCA techniques are:

$\text{Log Ki} = -16.5348 + 9.4000 \text{ Ovalitas} - 0.0472 \text{ Molar Volume} - 1.3985 \text{ Dipole Energy} + 0.4891 \text{ Dipole Length} + 0.0000 \text{ Torsion Energy} + 0.0113 \text{ Total Area}$

and $\text{Log Ki} = -16.8273 - 1.4970 \text{ Homo} - 0.0214 \text{ Area Polar} + 0.4940 \text{ Dipol} - 0.0131 \text{ Total Area}$, respectively.

The models were used to predict fevicordin's Ki value, which had been studied using radioligand binding assay by Nakata and his colleagues, and resulted $6.13 \cdot 10^{-15} \text{M}$ (in Tris buffer using 3H-estradiol as competitor) and $2.60 \cdot 10^{-14} \text{M}$ (in Hepes buffer using [¹²⁵I]estradiol as competitor), respectively.

Keywords : Fevicordin, Breast cancer, ER α , Ki, QSAR

ABSTRAK

Pada penelitian ini, fevicordin dikembangkan sebagai antikanker payudara. Pengembangan dilakukan melalui pendekatan Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA) dengan teknik Analisis Komponen Utama dan Analisis Regresi Linier Berganda pada 39 senyawa analog estrogen. Persamaan hasil HKSA adalah :

$$\text{Log Ki} = -16.5348 + 9.4000 \text{ Ovalitas} - 0.0472 \text{ Volume Molar} - 1.3985 \text{ Energi Dipol} + 0.4891 \text{ Panjang Dipol} + 0.00001 \text{ Energi Torsi} + 0.0113 \text{ Total Area}$$

dan

$$\text{Log Ki} = -16.8273 - 1.4970 \text{ Homo} - 0.0214 \text{ Area Polar} + 0.4940 \text{ Dipol} - 0.0131 \text{ Total Area}$$

Model tersebut digunakan untuk memprediksi nilai konstanta inhibisi (Ki) senyawa fevicordin, dibandingkan dengan nilai Ki hasil penelitian Nakata *et al* melalui metode *radioligand binding assay*, yaitu $6,13 \cdot 10^{-15} \text{M}$ (media buffer tris dan kompetitor 3H-estradiol); $4,75 \cdot 10^{-4} \text{M}$ (media buffer tris dan kompetitor [^3H]17beta-estradiol) dan $2,60 \cdot 10^{-14} \text{M}$ (media buffer Hepes dan kompetitor [^{125}I]estradiol).

Kata kunci : Kanker Payudara, RE α , Fevicordin, Ki, HKSA

PENDAHULUAN

Penelitian lima tahun terakhir ini, senyawa dari bahan alam turunan estradiol (fitoestrogen) seperti isoflavon daidzein, genistein, (de Lemos, 2001) dan yang terbaru glabridin (Tamir et al., 2000) menjadi senyawa yang dapat mencegah perkembangan sel kanker (*antiproliferative*), karena ikatan senyawa-senyawa tersebut dengan reseptor

estrogen lebih kuat dibandingkan estradiol. Namun, senyawa-senyawa ini belum mampu membunuh sel kanker yang telah berkembang di dalam jaringan mammae (Fujita et al., 2003). Hal ini dikarenakan bahwa senyawa-senyawa aktif dari bahan alam hasil isolasi bukanlah suatu langkah akhir dalam penemuan obat baru (Sager and Lengauer, 2003). Dalam tahapan penemuan obat baru (*New Drug Discovery*), penemuan senyawa aktif dari bahan alam (*lead compound*) merupakan langkah keempat dari sepuluh langkah menuju obat baru yang dapat diproduksi secara komersil (Graham, 2005, Ji et al., 2009). Langkah selanjutnya adalah memprediksikan aktivitas dan afinitas ikatan dengan reseptor senyawa aktif tersebut dengan menggunakan Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas (HKSA). Prediksi aktivitas dan afinitas ikatan dengan reseptor menggunakan *KiBank* sebagai respon dalam persamaan HKSA akhir-akhir ini sedang ramai dibicarakan. Konstanta inhibisi (*Ki*) merupakan nilai *binding affinity* antara struktur 3D molekul obat dengan reseptor. Konsep ini dikembangkan dari database reseptor (RDB) (Zhang et al., 2004). Nilai *Ki* setiap reseptor sangat tergantung pada kondisi rinci eksperimen, seperti jaringan targetnya, substrat, pH dan buffer eksperimen basah penentuan afinitas ikatan obat-reseptor (Aizawa et al., 2004). Pada penelitian ini, dilakukan prediksi nilai *Ki* senyawa fevicordin terhadap sel kanker payudara melalui HKSA berbantuan komputasi menggunakan Hyperchem 7[®] 3D dan PCMODEL[®].

Fevicordin (*lead compound*) merupakan senyawa aktif bahan alam dari biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) memiliki potensi besar dalam mencegah dan membunuh sel kanker payudara, jika senyawa ini dioptimasi menjadi senyawa aktif obat. Senyawa yang berkerangka inti estradiol ini memiliki toksisitas terhadap sel kanker. Selain senyawa tersebut sangat toksik terhadap sel kanker. Dari hasil

percobaan, nilai IC_{50} fevicordin terhadap sel Hela adah 1,25 $\mu\text{g/mL}$, terhadap sel CASKI 12 $\mu\text{g/mL}$, dan terhadap sel TE-2 adalah 40 $\mu\text{g/mL}$ (Diantini et al., 2007a, Diantini et al., 2007b).



Gambar 1. Struktur estradiol (a) dan fevicordin dari biji mahkota dewa (b)

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam kajian HKSA berupa data struktural dan aktivitas biologis diambil dari literatur. Penelitian ini menggunakan metode kimia komputasi untuk mengeksplorasi semua data prediktor. Uji toksisitas digunakan dengan metode MTT.

BAHAN

Alat : Kimia Komputasi : Perangkat keras satu set computer digunakan dalam penelitian ini dalam melakukan perhitungan kimia komputasi. Perangkat lunak paket program Hyperchem™ 7.0 for Windows (Hyperchem, Inc) untuk melakukan perhitungan molekular mekanik (MM+) dan mengeksplorasi sifat fisikokimia. Perangkat lunak PC Model v6.0 for Windows (v 6.0; Serena Ltd), dan Statistica (v6.0; Statsoft, Inc.) untuk melakukan analisis statistik.

Bioassay : ELISA (Bohreinger), Spektrometer (Schimadzu), mikroplat 96-well plate dilengkapi *microplate reader*, mikropipet, sentrifugasi, dan inkubator.

CS Chem3D Ultra Molecular Modelling and Analysis Program (v8.0; CambridgeSoft Corporation), PC Model, AutoGrid (v3.05; The Scripps Research Institute), Autodock (v3.0.5) dan Autodock Tools (v1.4.4; The Scripps Research Institute, Molecular Graphic Laboratory), Swiss-PdbViewer (v3.7)

Bahan

HKSA : 37 senyawa derivat estrogen (Nakata, 2007) yang bersifat agonis terhadap reseptor estrogen α pada manusia, masing-masing dengan nilai konstanta inhibisi (K_i) diperoleh dari bank data (Nakata, 2007). Nilai konstanta ini merupakan hasil pengujian in vitro dengan metoda kompetisi radioligand binding assay (RBA) melalui penggunaan 2 jenis estradiol bertanda dengan buffer yang berbeda, masing-masing yaitu [^3H]17beta-estradiol (buffer:tris 2.0nM; fosfat 2.0nM) (disebut sebagai **senyawa uji 1**) dan [^{125}I]17beta estradiol (buffer:hepas 150nM) (**senyawa uji 2**) (Nakata, 2007). Dalam skala ini, estradiol dinyatakan memiliki % afinitas ikatan terhadap reseptor estrogen α sebesar 100%. Tabel 1 dan 2 memperlihatkan jenis turunan atau derivat estradiol beserta nilai konstanta inhibisinya (K_i).

METODE

Pemodelan HKSA : Masing-masing senyawa kemudian dibuat model dengan menggunakan program HyperchemTM 7.0 sehingga diperoleh model molekul tiga dimensi. Kemudian dilakukan minimisasi energi agar diperoleh model molekul dengan energi molekul yang paling kecil dengan menggunakan MM2. Setiap pengukuran deskriptor dilakukan minimisasi energi agar perhitungan deskriptor yang diperoleh akurat sesuai dengan sifat molekul yang dimodelkan. **Pemilihan deskriptor** : dilakukan dengan

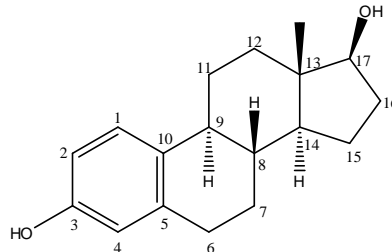
mempertimbangkan hubungan struktur senyawa terhadap aktivitas farmakologi, sehingga deskriptor yang dipilih berkaitan dengan kerangka dari senyawa literatur. Deskriptor yang digunakan dihitung menggunakan program HyperchemTM 7.0 dan software PCMODEL. Deskriptor yang digunakan adalah Dipole (DPL), *Dipole Length (DPLL)*, *The Highest Occupied Molecular Orbital (Homo)*, *The Lowest Unoccupied Molecular Orbital (Lumo)*, *Dipole-Dipole Energy (Ed)*, *Torsion Energy (Et)*, *Partition Coefficient (Octanol/Water)*, *Total Area*, *Polar Area*. **Pengolahan Data** : Analisis komponen utama (Statistica v.6.0) dilakukan untuk mereduksi variabel independen (deskriptor) agar diperoleh variabel independen yang memiliki nilai variansi yang tinggi sehingga dapat menjelaskan variansi yang terjadi pada variabel dependen (aktivitas). Analisis regresi linear berganda (Statistica v.6.0) digunakan untuk meramalkan variabel dependen berdasarkan beberapa variabel independen dalam suatu persamaan linear. Analisis regresi dengan kuadrat terkecil sebagian digunakan untuk mengatasi masalah yang terjadi dalam analisis regresi linear berganda. Metode ini dapat mereduksi terjadinya kolinearitas dan autokorelasi.

Prediksi aktivitas Fevicordin : Struktur 3 dimensi senyawa fevicordin dimodelkan dengan menggunakan perangkat lunak program HyperchemTM 7.0, kemudian ditentukan deskriptor senyawa fevicordin yang telah terdefiniskan oleh model persamaan regresi HKSA turunan estradiol. Deskriptor yang tidak bisa ditentukan oleh perangkat lunak program HyperchemTM 7.0 ditentukan dengan menggunakan perangkat lunak PCModel Ver.6. Semua deskriptor tersebut kemudian dimasukkan kedalam persamaan model regresi HKSA turunan estradiol, sehingga nilai tetapan inhibisi fevicordin dapat diprediksi melalui model.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA) Derivat Estrogen

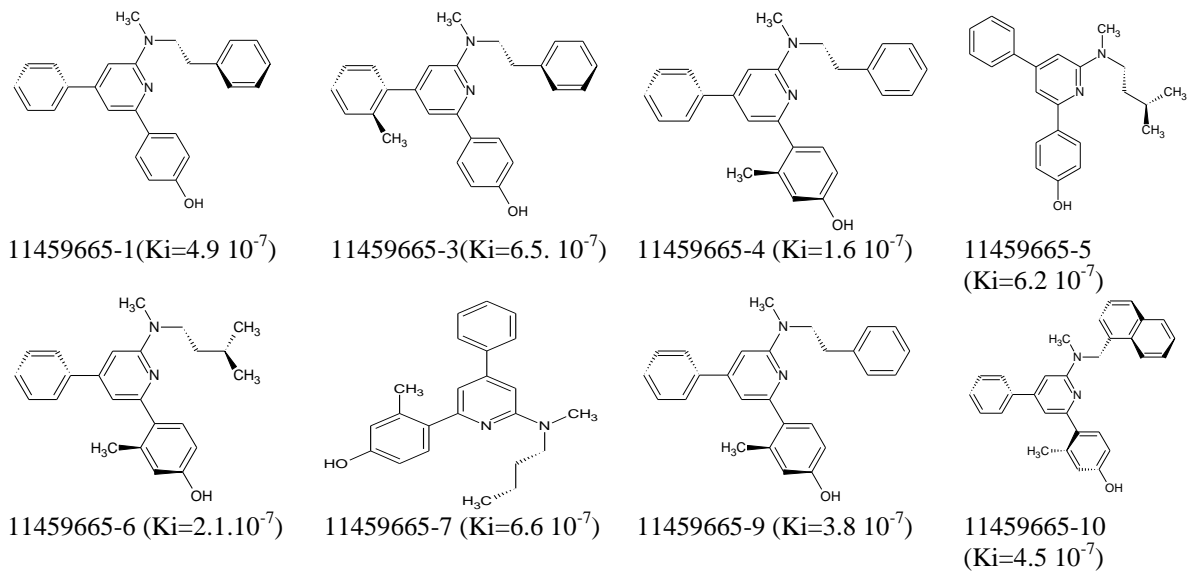
Senyawa Penuntun yang digunakan adalah senyawa estradiol 17- β dengan struktur sebagai berikut :

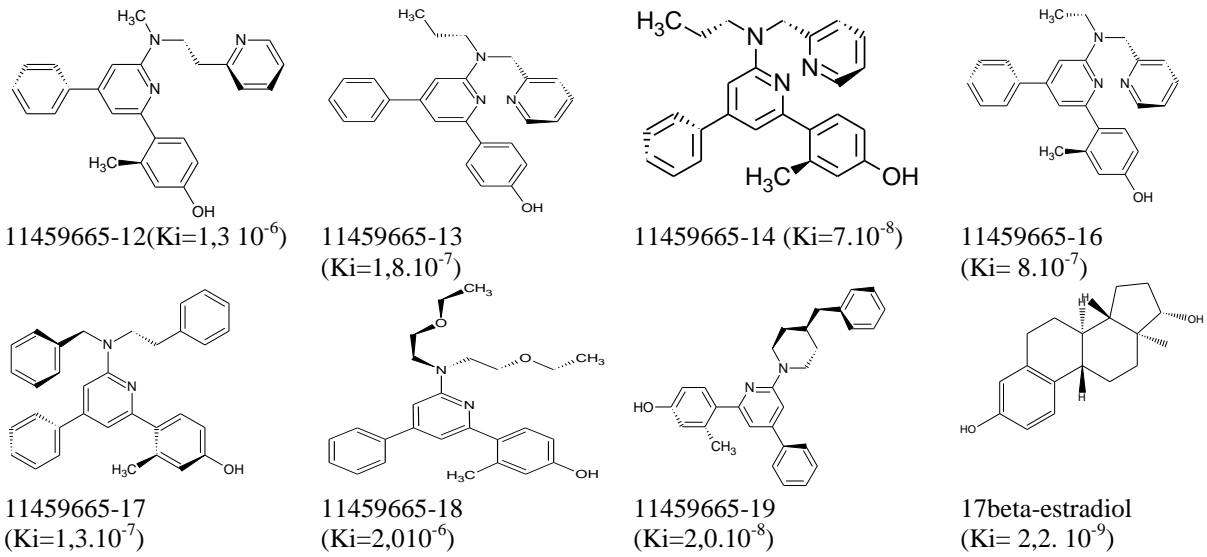


Gambar 2. Senyawa Penuntun Derivat Estrogen

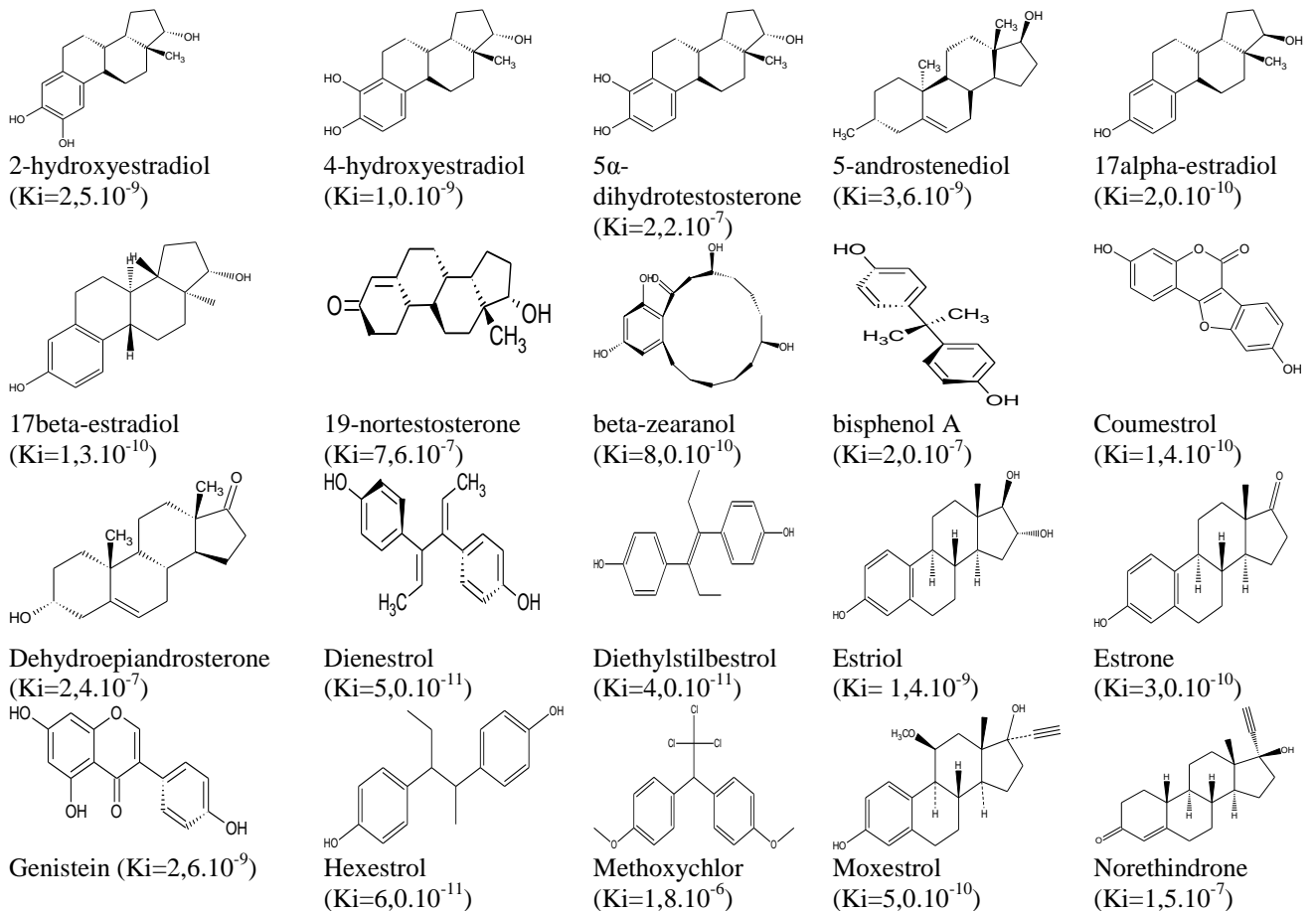
Data aktivitas senyawa derivat estrogen diperoleh dari bank data K_i (Nakata *et al.*, 2007). Nilai konstanta K_i senyawa derivat diperoleh dari hasil pengujian *in vitro* dengan membandingkan senyawa menggunakan 2 senyawa bertanda, [^3H]17beta-estradiol (buffer:tris 2,0nM; fosfat 2,0nM) (senyawa uji 1) dan [^{125}I]17beta estradiol (buffer:hapes 150nM) (senyawa uji 2) pada reseptor estrogen alpha ($\text{RE}\alpha$) pada manusia.

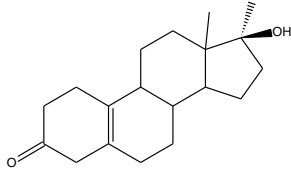
Pada Gambar 3 (senyawa uji 1) dan Gambar 4 (senyawa uji 2), dapat dilihat data nilai aktivitas K_i dari derivat estrogen terhadap $\text{RE}\alpha$ manusia.





Gambar 3. Struktur dan aktivitas Senyawa Uji 1 dibandingkan terhadap [^3H]17 beta-estradiol





Norethynodrel
($K_i=1,4 \cdot 10^8$)

Gambar 4. Struktur dan aktivitas Senyawa Uji 2 dibandingkan terhadap [125 I]17 beta-estradiol

Pada data Gambar 3 dan 4 diatas, terdapat perbedaan nilai K_i untuk senyawa yang sama, hal ini dikarenakan adanya perbedaan kondisi percobaan, yaitu adanya perbedaan senyawa *tracer* (pembanding) dan larutan penyangga yang digunakan. Perbedaan kondisi percobaan ini sangat mempengaruhi nilai K_i pada setiap senyawa uji, sehingga akan mempengaruhi berapa persen reseptor yang diduduki senyawa uji dibandingkan dengan *tracer*. Senyawa yang digunakan bersifat agonis terhadap RE α .

Nilai K_i berbanding lurus dengan nilai IC_{50} senyawa. Jadi, nilai K_i yang kecil memiliki aktivitas yang baik.

Penentuan dan Penghitungan Deskriptor

Dari analisis komponen utama ini dihasilkan beberapa deskriptor yang memiliki nilai variansi yang besar, yaitu ovalitas, volume molar, energi dipol, panjang dipol, energi torsi, dan total area untuk senyawa uji 1; homo, polar area, dipole, dan total area untuk senyawa uji 2. Jumlah deskriptor yang digunakan dalam penghitungan maksimal berjumlah $n-1$ dari jumlah sampel yang digunakan dalam percobaan. Pengurangan jumlah deskriptor yang digunakan agar diperoleh perhitungan persamaan regresi yang baik dilakukan melalui bantuan PC Model v.6.

Data hasil analisis regresi linier berganda untuk [3 H]17beta-estradiol

Dari enam belas senyawa uji (Gambar 3), menghasilkan suatu hubungan korelasi bermakna. Deskriptor yang berpengaruh dalam hubungan korelasi ini adalah ovalitas, volume molar, energi dipol, panjang dipol, energi torsi, dan total area.

Tabel 1 Korelasi HKSA Senyawa Uji 1

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(9)	p-level
Intercept			-16.5348	2.441036	-6.77366	0.000081
Ovality	1.05877	0.285339	9.4000	2.533295	3.71058	0.004841
Molar Vol	-2.07151	0.499833	-0.0472	0.011392	-4.14441	0.002505
Ed	-0.91454	0.187790	-1.3985	0.287174	-4.86999	0.000884
DPLL	0.37241	0.119347	0.4891	0.156740	3.12038	0.012311
Et	0.22320	0.114594	0.0000	0.000002	1.94775	0.083268
Total Area	0.91792	0.538005	0.0113	0.006636	1.70615	0.122166

Model HKSA :

$$\text{Log Ki} = -16.5348 + 9.4000 \text{ Ovalitas} - 0.0472 \text{ Volume Molar} - 1.3985 \text{ Energi Dipol} + 0.4891 \text{ Panjang Dipol} + 0.0000 \text{ Energi Torsi} + 0.0113 \text{ Total Area}$$

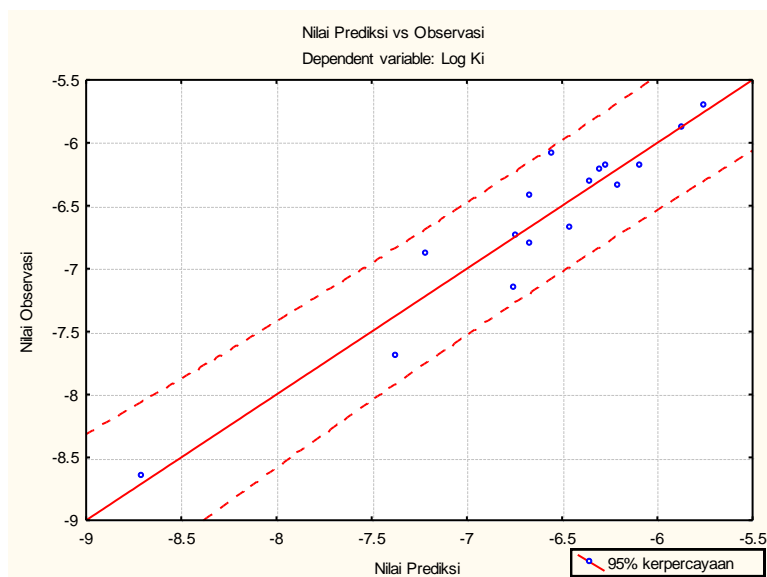
$$R = 0,95106569 \quad R^2 = 0,90452595$$

$$F(6,9) = 14,211 \quad p < 0,00039 \quad \text{Estimasi Std.Kesalahan: } 0,29425$$

Dari hasil regresi diatas, dapat disimpulkan bahwa nilai Ki dipengaruhi oleh ovalitas, volume molar, energi dipol, panjang dipol, energi torsi, dan total area. Nilai R^2 ($R^2 \geq 0,90$) menunjukkan adanya hubungan bersifat linier yang bermakna antara aktivitas nilai Ki dengan deskriptor dan model dapat menjelaskan 90.4% variabel tak bebas (konstanta inhibisi). Nilai F dapat dibandingkan dengan nilai F tabel untuk menentukan nilai keberartian model regresi. Diperoleh hasil pengujian model regresi F 14,211. Nilai F tabel adalah 3,37 ($\alpha = 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa model regresi linier berganda sesuai untuk menjelaskan hubungan antara deskriptor dengan konstanta inhibisi. Nilai p (signifikansi) regresi adalah 0,00039. Nilai signifikansi ini menjelaskan nilai residual dari analisis model regresi yang dilakukan. Nilai signifikansi model lebih kecil dari nilai α (0,05), sehingga dapat disimpulkan bahwa model regresi linier berganda

sesuai untuk menjelaskan hubungan antara deskriptor dengan konstanta inhibis (Saxena and Prathipati, 2003).

Dilihat dari nilai residu yang diperoleh dari selisih hasil prediksi dari model HKSA dengan nilai observasi, yang merupakan nilai hasil uji percobaan, menunjukkan nilai residu yang sangat kecil. Dari grafik Gambar 5, ditunjukkan bahwa nilai prediksi senyawa mendekati garis linier.



Grafik 5 Nilai Prediksi dan Observasi Senyawa Uji 1

Data hasil analisis regresi linier berganda untuk Senyawa Uji 2

Dari dua puluh satu senyawa uji (Gambar 4), menghasilkan suatu hubungan korelasi bermakna. Deskriptor yang berpengaruh dalam hubungan korelasi ini adalah Homo, Polar Area, Dipole, dan Total Area dari senyawa derivat estrogen.

Tabel 2. Korelasi HKSA Senyawa Uji 2

	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(16)	p-level
Intercept			-16,8273	5,882427	-2,86060	0,011330
Homo	-0,494006	0,173704	-1,4970	0,526379	-2,84395	0,011727
Polar Area	-0,435691	0,183997	-0,0214	0,009032	-2,36793	0,030822
Dipole	0,336313	0,171747	0,4940	0,252260	1,95819	0,067880
Total Area	-0,245825	0,166157	-0,0131	0,008866	-1,47947	0,158434

Model HKSA :

$$\text{Log Ki} = -16.8273 - 1.4970 \text{ Homo} - 0.0214 \text{ Area Polar} + 0.4940 \text{ Dipol} - 0.0131 \text{ Total Area}$$

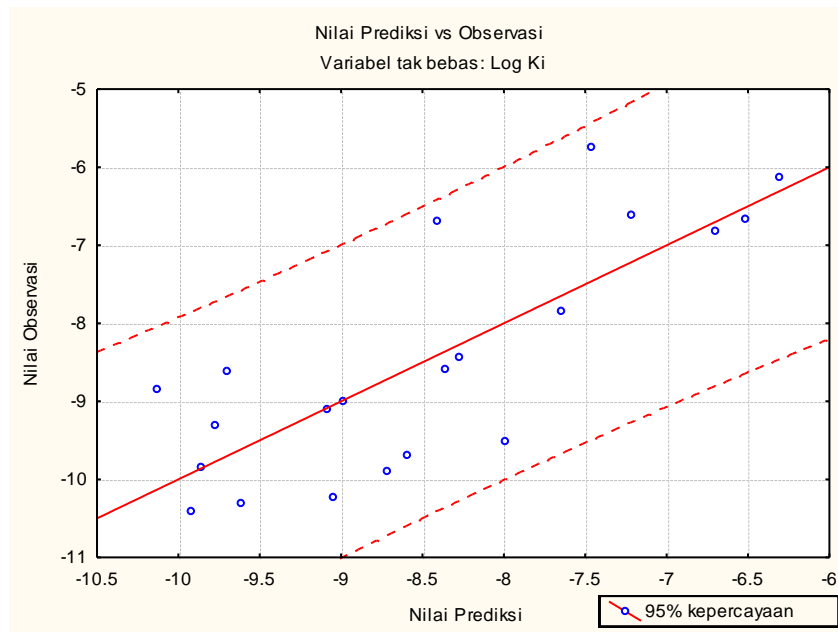
$$R = 0,79089460 \quad R^2 = 0,62551427$$

$$F(4,16) = 6,6813 \quad p < 0,00232 \quad \text{Estimasi Std.Kesalahan: } 1,0160$$

Dari hasil regresi diatas, dapat disimpulkan bahwa nilai Ki dipengaruhi oleh Homo, area polar, dipol dan total area. Nilai R^2 ($R^2 \leq 0,90$) menunjukkan adanya hubungan bersifat parabolik yang bermakna antara aktivitas nilai Ki dengan deskriptor dan model dapat menjelaskan 62,25% variabel tak bebas (konstanta inhibisi). Nilai F dapat dibandingkan dengan nilai F tabel untuk menentukan nilai keberartian model regresi. Diperoleh hasil pengujian model regresi F 6,6813. Nilai F tabel adalah 3,01 ($\alpha = 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa model regresi linier berganda sesuai untuk menjelaskan hubungan antara deskriptor dengan konstanta inhibisi.

Nilai p (signifikansi) regresi adalah 0,00232. Nilai signifikansi ini menjelaskan nilai residual dari analisis model regresi yang dilakukan. Nilai signifikansi model lebih kecil dari nilai α (0,05), sehingga dapat disimpulkan bahwa model regresi linier berganda sesuai untuk menjelaskan hubungan antara deskriptor dengan konstanta inhibisi.

Dilihat dari nilai residu yang diperoleh dari selisih hasil prediksi dari model HKSA dengan nilai observasi, yang merupakan nilai hasil uji percobaan, menunjukkan nilai residu yang memenuhi syarat (standar kesalahan 1%). Kepercayaan ini ditingkatkan dengan grafik yang ditunjukkan di Gambar 6, bahwa nilai prediksi senyawa mendekati garis linier dan berada dalam rentang kebenaran.



Gambar 6 Nilai Prediksi dan Observasi Senyawa Uji 2

Prediksi Konstanta Inhibisi Senyawa Fevicordin

Nilai prediksi ditentukan setelah memasukkan data fisikokimia fevicordin seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3 ke dalam persamaan di atas. Nilai K_i dari senyawa fevicordin pada $RE\alpha$ bervariasi seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4. Nilai K_i fevicordin sangat kecil, kecuali kelompok Senyawa Uji 1, berarti fevicordin berpotensi sebagai senyawa anti kanker payudara. Data kelompok Senyawa Uji 2 yang berbeda jauh dikarenakan jumlah senyawa uji yang sedikit, sehingga tidak bisa mewakili sifat dari derivat lain. Data ini bisa dibandingkan dengan data skoring dari docking fevicordin. Tetapi dengan model ini kita tidak bisa mengetahui bagaimana kekuatan ikatannya dengan reseptor (Salum Lde et al., 2007). Oleh karena itu dilakukan docking untuk mengetahui nilai K_i berdasarkan hasil docking dan energi ikatannya dengan $RE\alpha$ manusia (Morris et al., 2008).

Tabel 3. Data deskriptor senyawa fevicordin

Deskriptor	Satuan	Nilai
Ovality		1,50262
PC (O/W)		3,8226
Ed	Kcal/mol	2,61312
Et	Kcal/mol	13,0796
Dipole	Debye	4,8473
DPLL	eV	4,8473
Homo	eV	-8,436
Lumo	eV	-0,355
Total Area		638,762
Polar Area		159,494
Molar Vol		375

Tabel 4. Nilai Ki senyawa fevicordin

Tracer	Nilai Ki
[3H]17beta-estradiolFosfat	$7,38.10^{-15}$
[125I]estradiol Hepes	$2,6.10^{-14}$

Kesimpulan

Prediksi nilai Ki fevicordin terhadap reseptor estrogen berbantuan, yaitu sebesar prediksi Ki $7,38.10^{-15}$ M pada HKSA kelompok Senyawa Uji 1; dan $2,60.10^{-14}$ M pada HKSA kelompok Senyawa Uji 2. Nilai Ki Fevicordin ini menunjukkan bahwa fevicordin memiliki potensi sebagai senyawa antikanker payudara.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih pada Rektor dan Ketua Lemlit Universitas Padjadjaran yang telah mendanai seluruh penelitian ini lewat Hibah Penelitian Andalan UNPAD 2007.

Daftar Pustaka

AIZAWA, M., ONODERA, K., ZHANG, J., AMARI, S., IWASAWA, Y., NAKANO, T. & NAKATA, K. 2004. [KiBank: a database for computer-aided drug design based on protein-chemical interaction analysis]. *Yakugaku Zasshi*, 124, 613-9.

- DE LEMOS, M. L. 2001. Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. *Ann Pharmacother*, 35, 1118-21.
- DIANTINI, A., KURNIA, D., FARIED, A., FARIED, L. S., SUBARNAS, A., ACHMAD, T. H., HAYASHI, H. & SUPRIYATNA. 2007. Antiproliferative activity on hela and CASKI cells of fevicordin A isolated from the seeds of *Phaleria macrocarpa*. *In: Conference On Traditional Medicine And Medicinal Plant*, 8-9 September 2007a Surabaya. Unair.
- DIANTINI, A., KURNIA, D., FARIED, A., FARIED, L. S., SUBARNAS, A., ACHMAD, T. H., HAYASHI, H. & SUPRIYATNA. 2007. Antiproliferative activity on TE-2 cells of fevicordin A isolated from the seeds of *Phaleria macrocarpa*. *In: Seminar Kebudayaan Indonesia Malaysia X*, 29-31 September 2007b Kuala Lumpur.
- FUJITA, T., KOBAYASHI, Y., WADA, O., TATEISHI, Y., KITADA, L., YAMAMOTO, Y., TAKASHIMA, H., MURAYAMA, A., YANO, T., BABA, T., KATO, S., KAWABE, Y. & YANAGISAWA, J. 2003. Full activation of estrogen receptor alpha activation function-1 induces proliferation of breast cancer cells. *J Biol Chem*, 278, 26704-14.
- GRAHAM, P. L. (ed.) 2005. *Introductory to Medicinal Chemistry*, New York: Oxford University Press.
- JI, H. F., LI, X. J. & ZHANG, H. Y. 2009. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Rep*, 10, 194-200.
- MORRIS, G. M., HUEY, R. & OLSON, A. J. 2008. Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 8, Unit 8 14.
- NAKATA, K. 2007. *Revolutionary simulation software, quantum molecular interaction analysis, BioStation KiBank* [Online]. Available: <http://kibank.iis.u-tokyo.ac.jp/> [Accessed 28 Agustus 2007].
- SAGER, J. A. & LENGAUER, C. 2003. New paradigms for cancer drug discovery. *Cancer Biol Ther*, 2, 452-5.
- SALUM LDE, B., POLIKARPOV, I. & ANDRICOPULO, A. D. 2007. Structural and chemical basis for enhanced affinity and potency for a large series of estrogen receptor ligands: 2D and 3D QSAR studies. *J Mol Graph Model*, 26, 434-42.
- SAXENA, A. K. & PRATHIPATI, P. 2003. Comparison of MLR, PLS and GA-MLR in QSAR analysis. *SAR QSAR Environ Res*, 14, 433-45.
- TAMIR, S., EIZENBERG, M., SOMJEN, D., STERN, N., SHELACH, R., KAYE, A. & VAYA, J. 2000. Estrogenic and antiproliferative properties of glabridin from licorice in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 60, 5704-9.
- ZHANG, J., AIZAWA, M., AMARI, S., IWASAWA, Y., NAKANO, T. & NAKATA, K. 2004. Development of KiBank, a database supporting structure-based drug design. *Comput Biol Chem*, 28, 401-7.