

FFAR4/GPR120 SEBAGAI TARGET DESAIN DAN PENGEMBANGAN OBAT DIABETES MELITUS TIPE 2 *IN SILICO*: SUATU TINJAUAN DAN PERSPEKTIF

FREDY Z. SAUDALE*, MERVINA B. TOKAN, STEVEN Y. LEO, SERLY P. ATI.

Program Studi Kimia FST Undana, Jl. Adi Sucipto Penfui Kupang Indonesia

Article Received: 28 Mei 2020

Article Accepted: 25 June 2020

Abstract

FFAR4/GPR120 is an attractive membrane protein for diabetic drug design. Crystal structure of GPCR membrane proteins is difficult to obtain. Most of GPCR proteins lack experimental 3D structures. Therefore, computational method (*in silico*) using comparative homology modelling has been widely applied to solve it. To develop FFAR4/GPR120 selective compounds with high specificity, homology modelling of FFAR4/GPR120 can be constructed by utilizing other known GPCR crystal structures. This review article surveys the recent developments in the application of computational approaches in searching for selective agonist ligands and provides a perspective on computational approaches to the development of new drugs targeting FFAR4/GPR120.

Keywords: *FFAR4/GPR120, diabetes type 2, agonist, modelling*

Abstrak

FFAR4/GPR120 adalah protein membran integral yang sangat atraktif sebagai target untuk pengembangan obat diabetes. Struktur kristal protein membran GPCR sulit diperoleh. Akibatnya sebagian besar dari protein GPCR tidak memiliki struktur 3 dimensi yang didapatkan melalui eksperimen. Penerapan metode komputasional yakni pemodelan homologi komparatif adalah titik awal yang baik untuk digunakan. Dalam pengembangan senyawa agonis selektif FFAR4/GPR120 dengan spesifisitas tinggi, pemodelan homologi FFAR4/GPR120 dapat dibangun dengan memanfaatkan struktur kristal GPCR lain yang tersedia. Artikel review ini mensurvey perkembangan terkini pendekatan komputasional dalam mendesain ligan agonis selektif dan memberikan perspektif tentang tren pendekatan komputasional terhadap pengembangan obat yang menargetkan FFAR4/GPR120.

Kata kunci: *FFAR4/GPR120, diabetes tipe 2, agonis, pemodelan*

Pendahuluan

Indonesia sedang mengalami darurat obesitas (kegemukan berlebihan dengan indeks massa tubuh $\geq 30 \text{ kg/m}^2$)^{1,2}. Obesitas menyebabkan tingginya faktor resiko terhadap penyakit tidak menular seperti jantung, kanker, hipertensi, ginjal dan diabetes mellitus (DM)³⁻⁵.

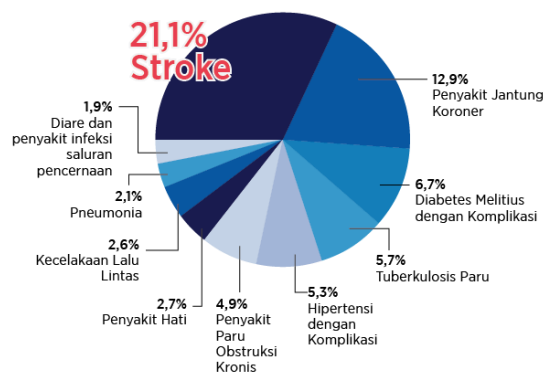
**Corresponding Author: Jl. Adisucipto-Penfui Kupang 85110 telp.(+62380)8037977,
e-mail: fredy_saudale@staf.undana.ac.id*

Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) pada tahun 2014, DM mempengaruhi sekitar 422 juta orang di seluruh dunia dimana sekitar 90 persen kasus adalah DM tipe 2 (DMT2)⁶. Angka ini diprediksi terus meningkat dua kali lipat selama 20 tahun. Obesitas akibat pola makan tinggi kalori (gula dan lemak) dan gaya hidup sedentari (kurang aktifitas dan olahraga) telah menyebabkan kondisi kronik inflamasi yang meningkatkan resistansi insulin pemicu penyakit diabetes melitus tipe 2 (DMT2). DMT2 adalah kondisi gangguan metabolik progresif yang diindikasikan dengan tingginya kadar glukosa darah (hiperglikemia), insulin (hyperinsulinemia) dan meningkatnya lipolisis⁷. Kondisi ini disebabkan oleh ketidakmampuan sel-sel metabolik adiposa, liver dan otot skeletal dalam meresponi stimulasi hormon insulin untuk menarik glukosa dari darah. Akibatnya penumpukan glukosa darah yang tinggi membawa efek toksik bagi tubuh seperti organ ginjal, mata dan sistem saraf. Selain itu, resistansi insulin dalam jangka panjang akan meningkatkan komplikasi makro dan mikrovaskular yang memicu penyakit jantung, meningkatkan morbiditas dan mortalitas.

Diabetes Melitus Tipe 2

Indonesia dinilai sebagai salah satu dari sepuluh negara teratas secara global dengan jumlah individu pengidap diabetes yang tinggi pada tahun 2013⁸. Dengan prevalensi diabetes saat ini sebesar 7%, Indonesia memiliki jumlah penderita diabetes terbesar keenam di dunia (> 10 juta). Sekitar 97,5% dari penderita diabetes di Indonesia memiliki diabetes tipe 2 dengan usia rata-rata diagnosis $49,7 \pm 6,8$ tahun⁹. Diperkirakan bahwa pola yang sama akan berlanjut⁸ kecuali intervensi untuk mencegah dan mengelola diabetes diterapkan. Berdasarkan data Kementerian Kesehatan tahun 2014, DM adalah pembunuh ketiga terbanyak di Indonesia yang menyumbang sebesar 6,7 persen kematian setelah jantung koroner dan stroke (Gambar 1).

**10 Penyebab Kematian Utama (Semua Umur)
Sample Registration System (SRS) Indonesia (2014)**



Sumber: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia

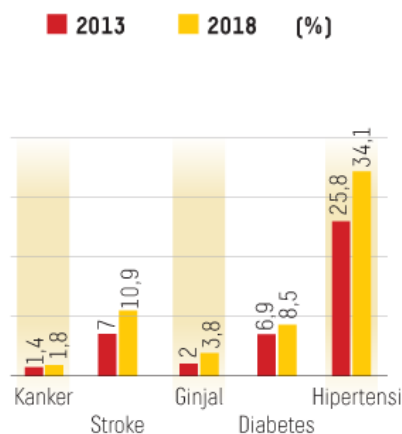
INFOGRAFI:ADINDA

Gambar 1. Penyebab Kematian Utama di Indonesia (2014).
Sumber: KOMPAS cetak, 3 Agustus 2018

Beberapa terapi seperti insulin, dan obat-obatan telah diberikan. Namun demikian beberapa efek samping telah dilaporkan seperti peningkatan berat badan, efek terhadap jantung, kerusakan fungsi liver, infeksi saluran kencing, keluhan gastrointestinal dan hipoglikemia¹⁰⁻¹⁴. Oleh sebab itu, pengembangan obat baru DMT2 dengan durabilitas dan *safety* yang lebih baik sudah merupakan suatu urgensi. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) oleh Kementerian Kesehatan RI menunjukkan tingkat prevalensi DMT2 sebagai salah satu penyakit menular disamping stroke, kanker, hipertensi dan ginjal kronis yang terus meningkat dari 6,9 persen pada tahun 2013 menjadi 8,5 persen di tahun 2018 (Gambar 2). DMT2 telah lama dianggap sebagai kondisi seumur hidup yang memburuk dari waktu ke waktu. DMT2 disebut juga penyakit gaya hidup karena selain faktor keturunan, penyebab utamanya adalah gaya hidup tidak sehat seperti merokok, konsumsi minuman beralkohol, kurang aktivitas fisik serta konsumsi buah dan sayur.

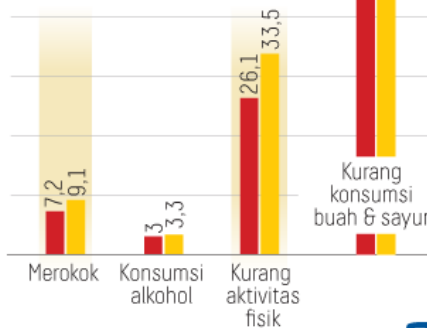
Penyakit Tidak Menular

Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018 menunjukkan prevalensi penyakit tidak menular meningkat jika dibandingkan dengan Riskesdas 2013, antara lain kanker, stroke, penyakit ginjal kronis, diabetes melitus, dan hipertensi.



Sumber: Riset Kesehatan Dasar 2018 Kementerian Kesehatan

Kenaikan prevalensi penyakit tidak menular ini berhubungan dengan pola hidup, antara lain merokok, konsumsi minuman beralkohol, kurang aktivitas fisik, serta konsumsi buah dan sayur.



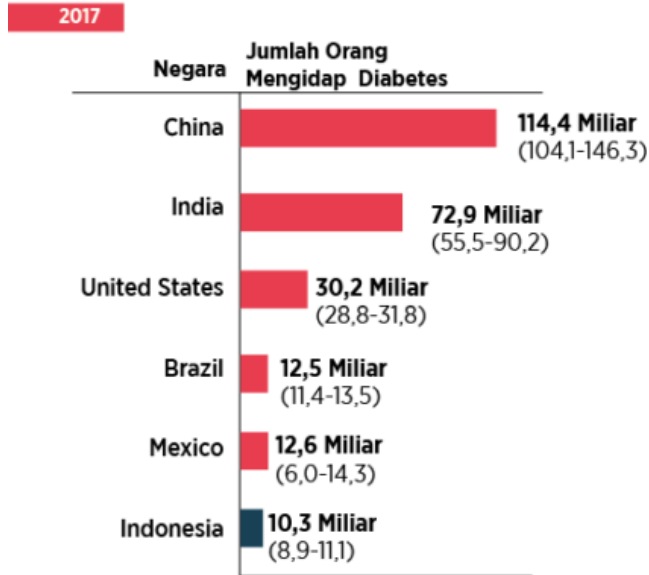
INFOGRAFIK: ARJENDRO

Gambar 2. Prevalensi Penyakit Tidak Menular di Indonesia pada tahun 2018 dibandingkan tahun 2013 berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Sumber: KOMPAS cetak, 3 November 2018

Keadaan ini telah menempatkan Indonesia masuk ke dalam kelompok 6 negara teratas didunia dengan penderita DM terbesar dengan usia 20-79 tahun pada tahun 2017 (Gambar 3). Jika kondisi ini tidak ditanggulangi segera maka akan berdampak pada peningkatan beban biaya kesehatan yang ditanggung negara.

Jumlah Orang Mengidap Diabetes (Prevalence and undiagnosed)

6 Negara Teratas dengan Jumlah Orang
(20-79 Tahun) Mengidap Diabetes Terbanyak



Gambar 3. Negara-negara dengan jumlah pengidap diabetes terbanyak.
Sumber: KOMPAS cetak, 29 November 2017

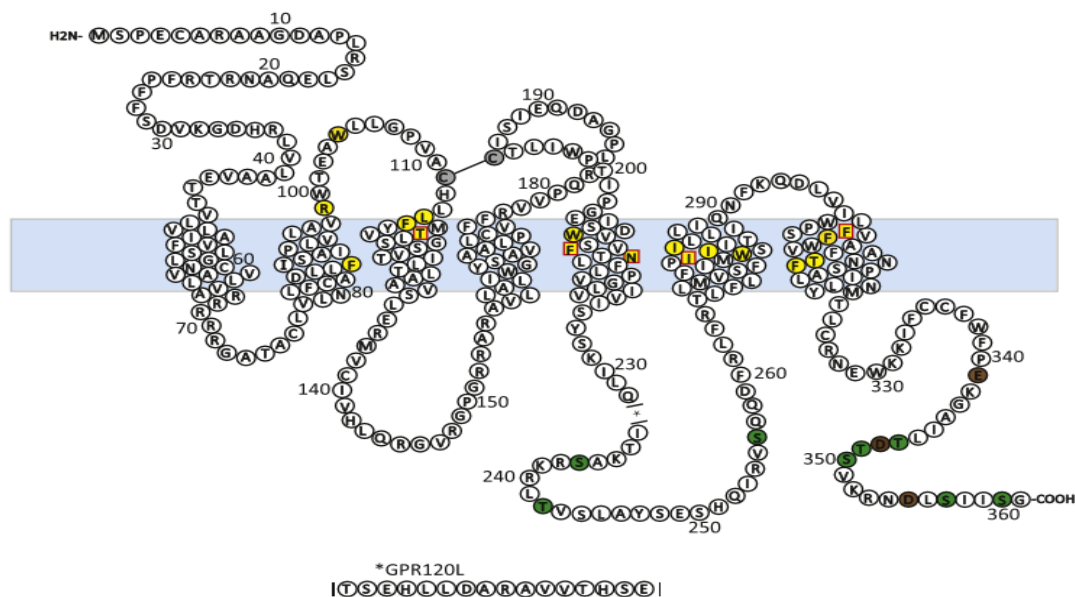
Terapi komprehensif untuk penderita DM secara umum membutuhkan evaluasi awal dari faktor-faktor risiko yang didapati, keberadaan atau tidak adanya komplikasi diabetes, dan sejarah medis sebelumnya. Ini akan memungkinkan penyedia layanan kesehatan untuk mengelola pasien dengan kategori pradiabetes atau diabetes secara optimal. Landasan manajemen terapi penyakit DM adalah dengan perbaikan gaya hidup yang di padu dengan pemantauan glukosa darah secara rutin dan pemberian terapi obat-obatan farmakologis¹⁵. Kelas utama obat antidiabetik oral yang telah digunakan secara klinis sejauh ini diantaranya adalah metformin, thiazolidinedione (TZD), inhibitor dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4), dan inhibitor sodium-glukosa co-transporter 2 (SGLT2)¹⁶. Metformin mampu memblokir progress DMT2, mengurangi risiko komplikasi, dan mengurangi angka kematian pada pasien dengan menurunkan sintesis glukosa hati (glukoneogenesis) dan meningkatkan sensitivitas jaringan perifer terhadap rangsangan insulin¹⁷. Metformin memberikan kontraindikasi pada pasien dengan komplikasi ginjal tahap awal¹⁸. Selain itu metformin dapat menyebabkan gangguan pencernaan termasuk diare, mual, dan dispepsia pada hampir 30% subjek setelah inisiasi¹². Metformin juga bisa memicu defisiensi vitamin B12 dan asam folat¹⁹. TZD memfasilitasi peningkatan penyerapan glukosa di banyak jaringan termasuk adiposa, otot, dan hati melalui pengurangan akumulasi asam lemak bebas, pengurangan protein sitokin proinflamasi,

peningkatan kadar adiponektin, dan menjaga integritas dan fungsi sel β pankreas²⁰. Namun, terapi TZD dengan insulin mengakibatkan gagal jantung menyebabkan TZD terbatas untuk digunakan sebagai terapi lini pertama atau bahkan lanjutan²¹. Inhibitor DPP-4 meningkatkan kontrol glikemik dengan secara bersamaan mengurangi berat badan dan tekanan darah sistolik pada pasien dengan DM T2¹³. Tiga efek samping dari inhibitor DPP-4 telah dilaporkan pada uji klinis yaitu nasofaringitis, infeksi saluran pernafasan atas, dan sakit kepala²². Inhibitor SGLT2 mampu menurunkan glukosa tanpa bantuan hormone insulin dengan menghalangi reabsorpsi glukosa dalam tubulus ginjal proksimal¹⁴. Inhibitor SGLT2 diprediksi efektif diberikan pada stadium lanjut DM T2 ketika cadangan sel β pankreas hilang secara permanen. Infeksi saluran kemih yang menyebabkan urosepsis dan pielonefritis, ketoasidosis, serta mikosis genital merupakan efek samping yang diberikan inhibitor SGLT2¹⁴. Oleh sebab itu, durabilitas dan *safety* yang lebih baik telah menjadi perhatian utama dalam upaya riset pengembangan obat baru DM T2.

FFAR4 /GPR120

Reseptor asam lemak 4 (*Free Fatty Acid Receptor 4/FFAR4*) merupakan protein yang terletak di membran sel dan bagian dari keluarga besar (*superfamily*) reseptor membran dalam genom manusia yang terkopling dengan protein G (*G Protein-Coupled Receptor/GPCR*)²³. Reseptor ini memiliki konfigurasi penggabungan ekstraseluler N-terminal dan interseluler C-terminal yang dihubungkan oleh tujuh transmembran (7TM) α -heliks yang terintegrasi pada bagian hidrofobik dari membran lipid bilayer (Gambar 4)^{24,25}. FFAR4/GPR120 telah diidentifikasi sebagai anggota keluarga reseptor asam lemak bebas termasuk GPR40 (juga dikenal sebagai FFA1), GPR41 (FFA3) dan GPR43 (FFA2)^{26,27}. FFAR4/GPR120 pertama kali diidentifikasi berdasarkan kemiripan dengan GPCR Rhodopsin yang telah diidentifikasi sebelumnya namun demikian belum diketahui ligannya (*orphan GPCR*) yang terdapat pada kromosom 10q23,33²⁸. Terdapat dua varian atau isoform dari FFAR4/GPR120 manusia yaitu varian yang berukuran pendek (361 asam amino; nomor akses RNA - GenBank ID: BC101175 dan Protein - GenBank ID: AAI01176.1) dan yang panjang (377 asam amino; nomor Referensi NCBI: NM_181745 dan Protein - Nomor Urutan Referensi NCBI: NP_859529.2)²⁵. Berat molekul isoform panjang yang diprediksi adalah 42 kDa. Yang menarik, isoform FFAR4/GPR120 yang panjang tampaknya spesifik hanya terdapat pada manusia. GPR120 mencit tampaknya berkorelasi secara lebih dekat dengan isoform pendek yang ada pada manusia yang memiliki residu asam amino sebanyak 361. Untuk reseptor FFAR4/GPR120 manusia, dua sekuens (Q5NUL3 dan Q5NUL3-2 dari database Uniprot) telah dijelaskan. Perbedaan struktural utama antara GPR120S (Q5NUL3-2, isoform pendek yang mengandung 361 residu) dan GPR120L (Q5NUL3, isoform panjang yang

mengandung 377 residu) adalah bahwa GPR120L memiliki 16 asam amino tambahan dalam loop intraseluler ketiga antara posisi 231 dan 247, yang mungkin menyebabkan karakter persinyalan yang berbeda (Gambar 5).



Gambar 4. Diagram Skematik Reseptor FFAR4/GPR120²⁵.

Substrat Alami

Asam lemak bebas sebagai ligan endogen berperan untuk memodulasi ekspresi gen dan protein yang mengatur beragam rentang protein yang berfungsi secara fisiologis dan patofisiologis termasuk yang terkait dengan homeostasis energi^{29,30}. Substrat alami dari FFAR4/GPR120 adalah asam lemak tidak jenuh berantai panjang (*Polyunsaturated Fatty Acids/PUFA*) seperti Asam Dokosaheksaenoat (DHA), Asam Eikosapentaenoat (EPA) atau lazimnya disebut omega-3/ ω -3 dan Asam α -Linoleat (ALA) atau omega-6/ ω -6 yang didapat dari nutrisi minyak atau lemak dari ikan dan tanaman^{31,32}. ALA dan DHA tampak menunjukkan interaksi paling kuat dengan FFAR4/GPR120. Namun demikian, selektivitasnya terbatas karena mereka juga berinteraksi dengan GPR40. GPR41 dan GPR43 umumnya diaktifkan terutama oleh asam lemak rantai pendek, sedangkan GPR40 dan FFAR4/GPR120 diaktifkan oleh asam lemak rantai panjang³³. Anion karboksilat dari asam lemak sangat diperlukan untuk aktivitasnya di situs aktif FFAR4/GPR120. Ikatan hidrogen antara residu asam karboksilat ligan dan gugus guanidin dari residu Arginin 99 (R99) dalam FFAR4/GPR120 telah ditemukan penting untuk aktivitas ligan. Asam lemak bebas yang dilepaskan hasil dari lipolisis ke dalam plasma kemudian beredar dan tidak hanya menyediakan substrat untuk produksi energi, tetapi yang penting juga bertindak sebagai ligan endogen²⁷.



Gambar 5. Penjajaran sekuen asam amino GPR120S (Q5NLU3–2) manusia, GPR120L (Q5NLU3) manusia, GPR120 (C9YUV0) *Macaca fascicularis*, GPR120 (Q7TMA4) mencit dan GPR120 (Q2AC31) tikus³³.

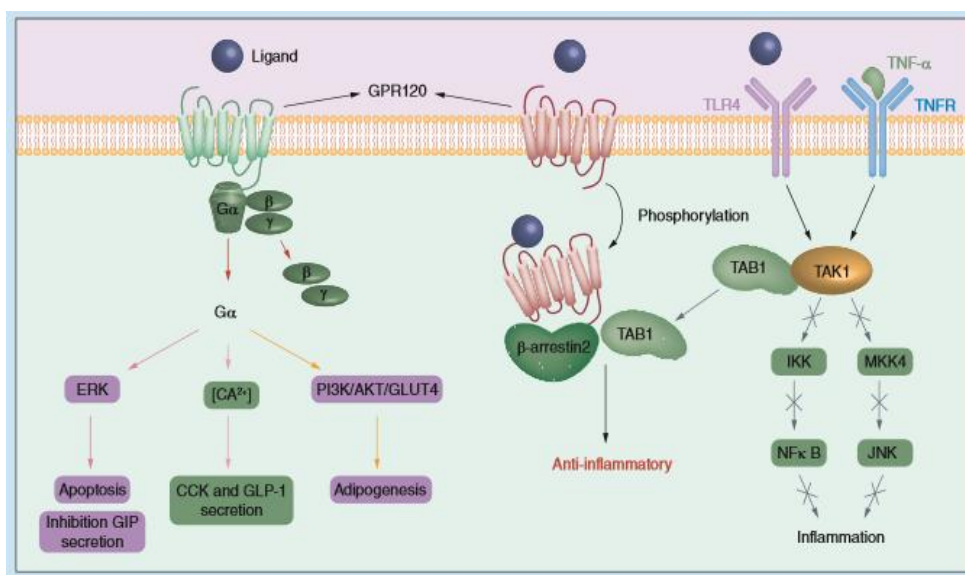
Jalur Persinyalan Intraselular

Reseptor FFAR4/GPR120 terlibat dalam sejumlah proses termasuk pelepasan peptida gastrointestinal, inflamasi, adipogenesis, lipogenesis, intoleransi glukosa dan sensitivitas insulin³³. Aktivitas FFAR4/GPR120 oleh substrat PUFA mengaktifkan jalur metabolisme *Phosphatidy Inositol-3 Kinase* (PI3K), *Protein Kinase B* atau AKT, *Glucose Transporter Type 4* (GLUT4) yang meningkatkan transportasi glukosa dan disimpan sebagai lemak (adipogenesis) serta menekan peradangan (inflamasi) jaringan yang terinduksi oleh markofag dengan menghambat *Mitogen-Activated Protein Kinase 7* (MAP3K7) atau TAK1 (diaktifkan TNF- α), melalui β -Arrestin 2 (ARRB2) atau TAB1 untuk menghalangi sinyal hilir ke jalur inflamasi MKK4/JNK dan IKK/NF κ B (Hirasawa *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2015) (Gambar 6).

Agonis Sintetik

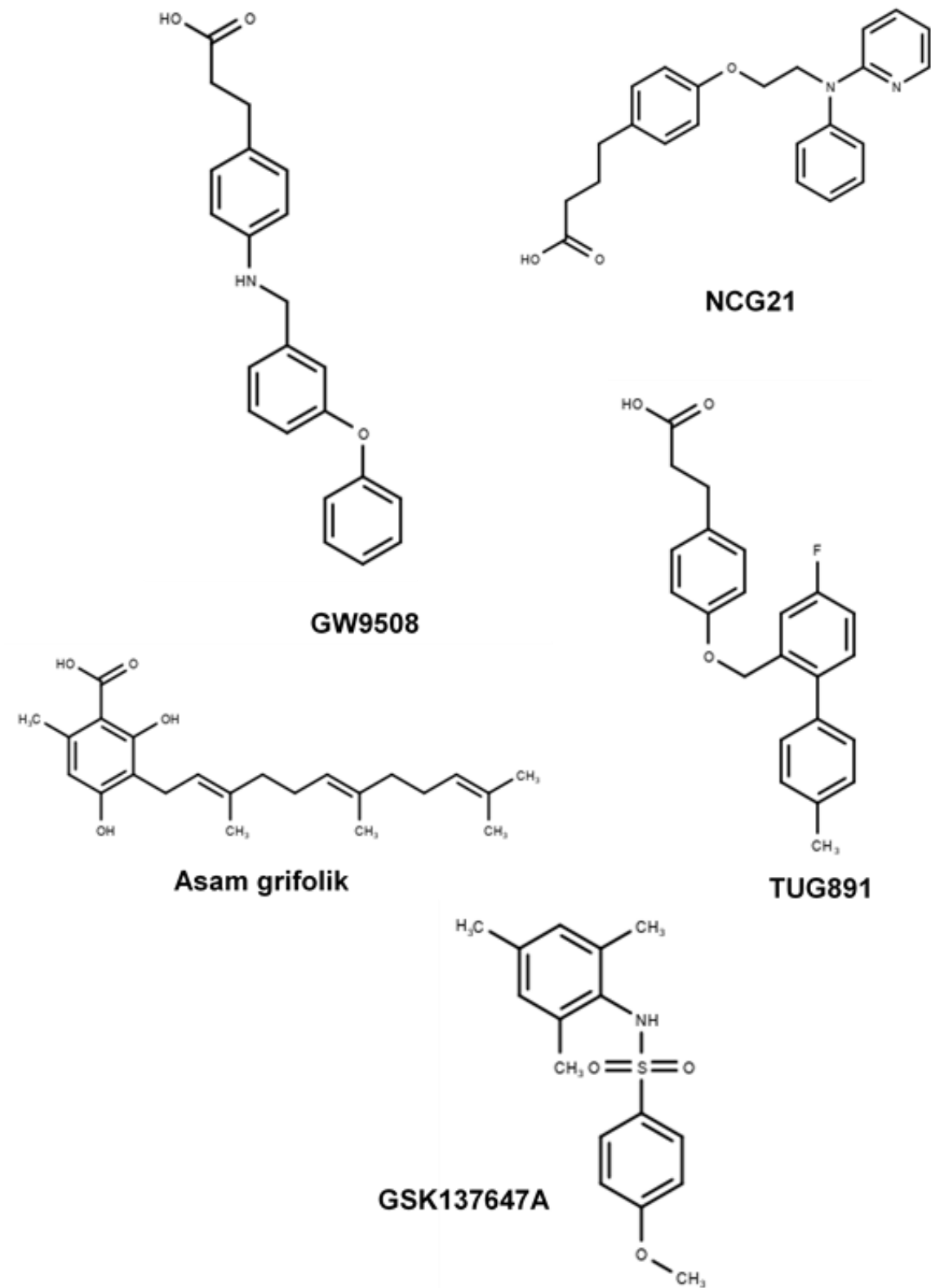
Aktivasi FFAR4/GPR120 oleh asam lemak tidak jenuh rantai panjang omega-3 telah dilaporkan meningkatkan pengambilan glukosa dari darah, menghambat sinyal proinflamasi dan

meningkatkan sensitivitas sel terhadap hormon insulin *in vitro* dan *in vivo*³². Berdasarkan pengetahuan tersebut, FFAR4/GPR120 telah dijadikan sebagai target molekuler baru dalam pengembangan dan optimalisasi senyawa-senyawa kimia baru dengan efek dan mekanisme yang menyerupai substrat alami asam lemak omega-3 untuk meningkatkan sensitivitas terhadap insulin atau dikenal dengan senyawa agonis²⁵. Dibandingkan dengan ligan sintesis, substrat asam lemak bebas memiliki kelemahan lain. Karena kelarutannya yang buruk dalam air, asam lemak bebas terikat pada pembawa (yaitu, albumin serum sapi bebas asam lemak [BSA]). Di sisi lain, BSA menumpulkan potensi asam lemak bebas dalam mengaktifkan GPCR sehingga mempengaruhi interaksi antara asam lemak bebas dan GPCR.



Gambar 6. Jalur Sinyal Biologis FFAR4/GPR120³³

Dalam hal aplikasi farmasi, akan diinginkan untuk menemukan ligan dengan pengikatan selektif hanya terhadap FFAR4/GPR120 saja. Upaya untuk memahami fungsi eksplisit dari reseptor ini telah dikaburkan oleh interaksi ligan endogen dan maupun ligan sintetik nonspesifik yang juga mampu berinteraksi tidak hanya dengan FFAR4/GPR120 tapi juga dengan GPR40. Penelitian yang sedang berlangsung telah mampu mengembangkan senyawa kimia aktivator (agonis) yang lebih selektif terhadap reseptor FFAR4/GPR120 dan yang juga telah meningkatkan pengetahuan terhadap fungsinya. Namun demikian karena kemiripan susunan asam amino dari kelas reseptor ini dan juga sifat non selektifitas dari beberapa ligan agonis tersebut menyebabkan perlunya kehati-hatian dalam mempelajari interaksi dan perubahan fungsi yang teramati. Berikut adalah beberapa senyawa agonis sintetik FFAR4/GPR120 yang telah ditemukan dan dikembangkan (Gambar 7).



Gambar 7. Agonis sintetik FFAR4/GPR120

GW9508

Dalam mencari agonis molekul kecil untuk FFAR4/GPR120, awal penelitian telah mampu mengidentifikasi turunan dari peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) yaitu GW9508, sebagai senyawa pengaktivasi³⁴. Namun demikian kekurangan dari GW9508 adalah spesifisitasnya yang mampu berinteraksi baik dengan GPR40 maupun FFAR4/GPR120 yang menyebabkan bias dalam interpretasi hasil dalam penelitian.

Asam Grifolik

Turunan grifolin (yaitu, asam grifolat dan asam grifolat metil eter) mampu mengaktifkan FFAR4/GPR120 secara selektif, tetapi mereka kurang efektif dibandingkan ALA dan dapat menghambat respons konsentrasi ion Ca²⁺ intraseluler³⁵. Dengan demikian, mereka diklasifikasikan sebagai agonis FFAR4/GPR120 parsial dengan selektivitas tinggi. Mirip dengan situasi dengan ligan FFAR4/GPR120 alami lainnya, 11 gugus karboksil dalam turunan grifolin diperlukan untuk menstimulasi FFAR4/GPR120.

NCG21

Penelitian lebih lanjut mengidentifikasi beberapa agonis potensial lain yang selektif terhadap FFAR4/GPR120 yaitu NCG21³⁶. NCG21, turunan agonis PPAR γ menunjukkan selektivitas yang lebih tinggi terhadap FFAR4/GPR120 dibandingkan GPR40³⁷.

TUG891

TUG891 dilaporkan berinteraksi secara kuat dan selektif dengan GPR120 serta menunjukkan selektivitas dan potensi yang lebih besar terhadap FFAR4/GPR120 dibandingkan dengan GPR40^{38,39}. TUG891 merupakan agonis yang lebih selektif dan kuat untuk FFAR4/GPR120 manusia dibandingkan ALA, GW9508, atau NCG21. Namun demikian, selektivitas TUG-891 GPR120 menciit masih terbatas, dan potensi dan selektivitas TUG-891 untuk tikus GPR120 tidak diketahui. Oleh karena itu, kegunaan potensial TUG-891 dalam studi menggunakan hewan pemodelan sangat terbatas. Karena pengembangan agonis FFAR4/GPR120 kuat dan selektif sangat diperlukan dalam pengembangan FFAR4/GPR120 sebagai reseptor yang dapat menjadi target obat (*druggable receptor*), ketersediaan TUG891 adalah langkah maju yang menjanjikan dalam menyelidiki fungsi FFAR4/GPR120 secara khusus. Namun demikian penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengoptimalkan dan mengkarakterisasi sepenuhnya efek fungsional TUG891 dan senyawa agonis potensial lainnya di FFAR4/GPR120. Baru-baru ini, TUG891 telah dibuat dan tersedia secara komersial sebagai agonis GPR120 oleh perusahaan Tocris Bioscience dan R&D Systems.

GSK137647A

Studi *Structure Activity Relationship* (SAR) dari serangkaian senyawa agonis diaril sulfonamida terhadap FFA4/GPR120 mampu mengidentifikasi senyawa agonis selektif yakni GSK137647A⁴⁰. GSK137647A mampu meningkatkan sekresi insulin yang distimulasi kondisi glukosa tinggi (25 mM)⁴⁰. Besarnya kemampuan GSK137647A dalam meningkatkan sekresi insulin dalam kondisi glukosa tinggi sangat penting untuk dicatat karena mirip dengan stimulasi yang ditunjukkan oleh glibenclamide, asam linoleat, dan agonis FFA1 sebagai kontrol positif⁴⁰.

FFAR4/GPR120 adalah protein membran integral yang sangat atraktif sebagai target untuk pengembangan obat. Studi interaksi antara ligan dengan GPCR sering dimulai dari ketersediaan struktur kristal 3D dari reseptor. Namun demikian struktur kristal protein membran GPCR sulit diperoleh. Kristalisasi GPCR tetap merupakan proses yang menantang dan panjang, dan akan membutuhkan waktu bertahun-tahun untuk mendapatkan struktur reseptor asam lemak bebas lainnya. Memecahkan struktur GPCR dalam kompleks dengan berbagai ligan juga membutuhkan banyak tenaga dan waktu. Ketidakterediaan struktur kristal GPCR telah membatasi penyelidikan struktural dan perancangan obat diabetes baru berbasis struktur. Akibatnya sebagian besar dari GPCR tidak memiliki struktur 3 dimensi yang didapatkan melalui eksperimental. Sehingga penerapan metode komputasional (*in silico*) yakni pemodelan homologi komparatif adalah titik awal yang baik untuk digunakan. Untuk mengembangkan agonis selektif FFAR4/GPR120 dengan potensi tinggi, model homologi FFAR4/GPR120 dapat dibangun dengan memanfaatkan struktur kristal GPCR lainnya.

Metode Komputasional *in Silico*

A. Structure-based drug design (SBDD)

A.1. Pemodelan homologi

Pemodelan homologi komparatif adalah metode yang banyak digunakan untuk menghasilkan model protein dengan struktur yang tidak diketahui menggunakan protein lain yang telah didapatkan melalui eksperimen yang mempunyai kemiripan susunan asam amino⁴¹. Pemodelan homologi komparatif didasarkan atas pemahaman bahwa protein dengan susunan asam amino yang mirip akan mempunyai struktur 3D yang mirip pula⁴². Secara tradisional, pemilihan cetakan (*template*) untuk pemodelan komparatif didasarkan pada tingkat kemiripan asam amino dan juga fungsi yang sama-sama dimiliki. Kemajuan besar dalam biologi struktural untuk GPCR telah memberikan wawasan yang sangat berharga dalam interaksinya dengan ligan dan efek sinyal biologis yang dihasilkan. Akses kepada struktur protein kristal beresolusi tinggi yang tersimpan di Protein Data Bank (PDB) memungkinkan desain ligan aktif secara lebih rasional.

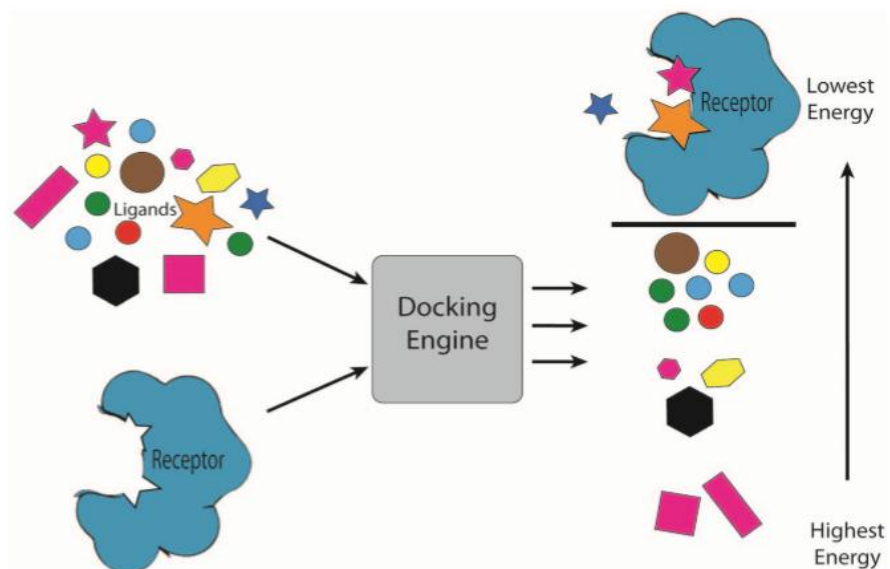
Sehingga metode komputasional (*in silico*) memainkan peran yang semakin penting dalam pengembangan obat di masa depan⁴³.

Desain pengembangan obat dengan bantuan teknologi komputasional *in silico* atau yang dikenal dengan istilah *Computer-Aided Drug Design* (CADD) telah banyak diterapkan secara luas dalam industri farmasi⁴⁴. Salah satu strategi CADD dilakukan berdasarkan ketersediaan struktur 3D protein target (*structure-based drug design* atau *SBDD*) yang didapatkan secara eksperimental dengan kristalografi X-ray, maupun NMR²⁴. Namun demikian, teknik elusidasi struktur 3D protein menggunakan kristalografi X-ray dan NMR tidaklah mudah, membutuhkan kerja berat (*laborious*) dan juga keberuntungan (*luck*) yang terkadang memakan waktu sangat lama⁴⁵. Akibatnya, pemodelan molekuler secara homologi komparatif telah banyak diadopsi untuk memprediksi dengan presisi tinggi dan lebih cepat dari struktur 3D protein target menggunakan struktur 3D dari protein target yang sama namun dari organisme berbeda yang telah dielusidasi melalui eksperimen baik dengan X-Ray Kristalografi maupun NMR untuk dijadikan sebagai cetakan (*template*) dengan *cut-off* urutan asam-asam amino identik diatas 30%. Pemodelan molekuler ini bertujuan untuk memprediksi struktur 3D target protein dan situs pengikatan dengan substrat, protein juga senyawa kimia menggunakan program, server atau *software* yang dapat diakses bebas oleh publik seperti MODELLER⁴⁶, SWISS-MODEL⁴⁷, PHYRE2⁴⁸ dan I-TASSER⁴⁹. Setelah model struktur 3D protein target di dapat dan telah divalidasi, langkah berikutnya adalah melakukan *virtual screening* untuk mengidentifikasi dan menganalisis pola interaksi protein target dengan senyawa-senyawa kimia atau obat yang terdapat di database publik seperti ZINC dan PubChem menggunakan teknik penambatan molekuler (*molecular docking*)⁵⁰. Senyawa-senyawa kimia yang menunjukkan interaksi yang kuat dengan energi bebas ikatan yang rendah (*hits*) diseleksi sebagai *input* bagi proses selanjutnya yaitu optimalisasi ligan.

A.2. Docking dan Virtual Screening

Virtual screening merupakan metode komputasional yang sangat *powerful* untuk mengidentifikasi secara sinkron ratusan hingga jutaan senyawa-senyawa baru dengan aktivitas biologis yang dikehendaki dari sekumpulan database senyawa-senyawa kimia (*chemical library*)⁵¹. *Virtual screening* memanfaatkan struktur 3D dari target biologis, didapat dari X-ray, NMR, atau pemodelan molekuler (I-TASSER) untuk menambatkan (*docking*) senyawa-senyawa ligan dalam *Chemical Library* ke situs pengikatan protein target dan diberikan peringkat berdasarkan prediksi nilai ikatan dan energi afinitas (kkal/mol). Bagian penting dari *Virtual screening* adalah *Molecular docking*, yang mengandung dua algoritma yaitu algoritma pencarian (*Searching*) dan fungsi penilaian (*Scoring Function*) untuk meningkatkan senyawa-senyawa kimia yang membentuk

interaksi dengan protein target. Algoritma pencarian mencakup proses penjelajahan ruang konformasi yang memungkinkan terjadinya interaksi antara senyawa kimia (ligan) dan protein target (Algoritma Genetika/Monte Carlo). Proses ini dikenal dengan istilah penambatan sampel (*Docking Sampling*) yang memerlukan daya dan kecepatan komputasi yang tinggi. Sedangkan, fungsi penilaian berdasarkan fungsi empiris berbasis pengetahuan data-data interaksi kompleks protein-senyawa kimia yang terdapat di dalam database (*Knowledge-based scoring function*) dan yang lainnya didasarkan atas pengaruh medan gaya (*Force Field-Based Scoring Function*).



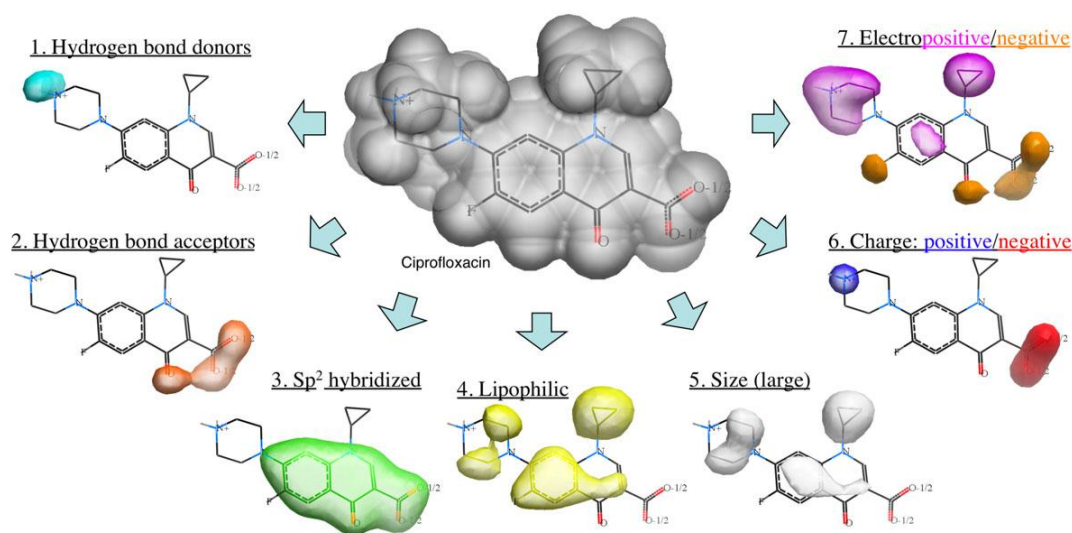
Gambar 8. Deskripsi workflow proses virtual screening senyawa kimia/ligan terhadap protein target⁵².

Alur kerja *virtual screening* dimulai dengan persiapan struktur protein reseptor dan penyediaan sekumpulan senyawa-senyawa kimia dalam jumlah besar (*Chemical Library*) yang kemudian dilanjutkan proses *Molecular Docking* (Gambar 8). Setiap senyawa yang berinteraksi dengan protein target akan memperoleh skor *docking* yang menunjukkan potensi keaktifannya. Senyawa-senyawa kimia yang berinteraksi kemudian diurutkan berdasarkan peringkat besarnya energi afinitas (kcal/mol), kesesuaian konformasi, orientasi (*pose*) dengan protein target dan interaksi hidrogen serta hidrofobik yang terbentuk. Dengan pengurutan maka, hanya akan tersisa set senyawa atau ligan dengan skor baik yang bertahan, untuk digunakan pada tahap selanjutnya yaitu tahap optimalisasi dan eksperimental. *Chemical Library* berisi database sekumpulan senyawa-senyawa kimia (ligan) dalam jumlah banyak (ratusan hingga puluhan juta) yang akan didocking dan diskining. Beberapa database senyawa-senyawa kimia pabrik dan komersil telah digunakan dalam prosedur *virtual screening* seperti PubChem, ChEMBL⁵³, ZINC⁵⁴, PharmaGist⁵⁵ dan ChemBridge. Akses database ini telah mengurangi kendala bagi riset dan pengembangan

obat secara khusus pada lingkungan akademis, laboratorium maupun pusat riset skala kecil. Telah dikembangkan juga beberapa program docking yang bersifat komersil dan publik seperti; DOCK, AutoDock, AutoDock Vina, Glide dan GOLD. Beberapa program baru telah dikembangkan dengan memadukan secara sinkron *virtual screening* dan *Docking* seperti; Dock Blaster⁵⁶, MTI OpenScreen/AutoDock Vina⁵⁷, PharmaGist⁵⁵, Pharmit⁵⁸ dan ZINC Pharmer⁵⁹.

B. Ligand-based drug design (LBDD)

LBDD dimulai dari tersedianya informasi senyawa-senyawa kimia aktif atau ligan yang telah diketahui secara eksperimen berikatan dengan protein target. LBD menggunakan pendekatan statistik dan pemodelan matematika dalam mempelajari korelasi struktur dan aktivitas biologisnya terhadap protein target menggunakan teknik 3D-QSAR (*Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship*)⁶⁰. CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*) dan CoMSIA (*Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*) adalah dua metodologi 3D-QSAR yang sangat umum digunakan⁶¹. CoMFA didasarkan atas konsep bahwa aktivitas biologis dari senyawa kimia bergantung pada medan molekular yang mengelilinginya seperti efek sterik dan elektrostatik. Sementara CoMSIA adalah pengembangan lebih lanjut dari CoMFA dimana selain efek sterik dan elektrostatik, efek hidrofobik, efek donor ikatan hidrogen dan akseptor ikatan hidrogen juga mempengaruhi aktivitas biologis suatu molekul (Gambar 9). Hasil analisis 3D-QSAR dapat digunakan untuk memprediksi senyawa-senyawa kimia baru turunan yang mempunyai kemiripan struktur dan sifat fisika kimianya menggunakan teknik *2D-similarity searching* dan *pharmacophore modeling* untuk mengoptimalkan aktivitas biologisnya^{62,63}.



Gambar 9. Fitur-fitur yang digunakan dalam analisis QSAR dengan CoMFA dan CoMSIA.

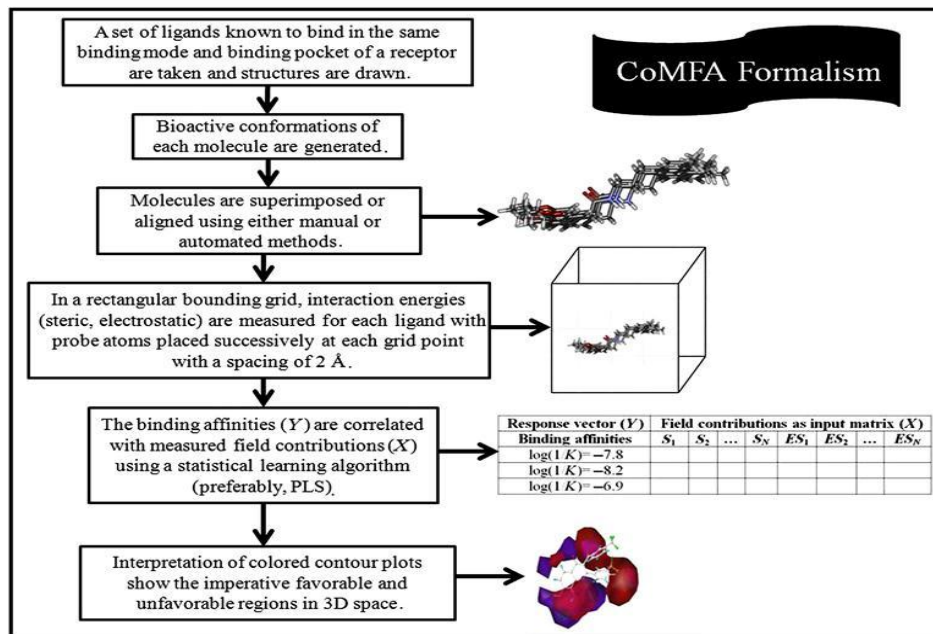
Sumber: <http://www.molsoft.com/vls.html>

B.1. CoMSIA

CoMSIA (*Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*) adalah salah satu metode 3D-QSAR yang baru-baru ini dikembangkan. CoMSIA dikembangkan di BASF Ludwigsafen, Jerman oleh Klebe dkk. Teknik ini paling sering digunakan untuk menemukan parameter-parameter umum yang penting dari senyawa kimia aktif dalam pengikatannya dengan reseptor biologis yang menjadi targetnya. Dalam CoMSIA, parameter seperti efek sterik maupun elektronik, ikatan donor hidrogen, ikatan akseptor hidrogen dan parameter hidrofobik menjadi parameter utama yang dianalisis korelasinya dengan aktivitas biologis senyawa aktif terhadap protein target.

B.2. CoMFA

CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*) atau perbandingan medan molekuler adalah metode 3D-QSAR lain yang lebih dahulu muncul sebelum CoMSIA⁶⁴. CoMFA menggunakan teknik hubungan kuantitatif antara aktifitas biologis dari sekelompok senyawa deret homolog dalam struktur 3D nya yang berkorelasi dengan sifat-sifat elektronik dan sterik yang ditimbulkan yang kemungkinan mempengaruhi aktivitasnya. Struktur elektronik dari suatu molekul dapat memberi gambaran dari sifat molekul tersebut. Ini mengingat elektron pada atom dalam suatu molekul berpengaruh terhadap interaksi antara obat dengan reseptor. Dalam metode CoMFA, efek sterik, elektrostatik, luas permukaan, hidrofobitas dan ikatan hidrogen dari molekul kimia dipelajari korelasinya dengan aktivitas biologisnya. Dalam CoMFA, tahapan awal biasanya dilakukan dengan mengumpulkan informasi senyawa-senyawa kimia yang telah terbukti secara eksperimental berinteraksi dan dan/atau memodulasi protein target. Hal ini umumnya didapatkan dengan cara mengunduh file-file data struktur ligan dari database seperti ChEMBL maupun PubChem Langkah berikutnya, dilakukan analisis penjajaran atau superimposisi untuk mengetahui fitur-fitur yang umum yang dimiliki semua senyawa aktif tersebut yang kemungkinan berperan dalam menstabilkan interaksinya dengan protein target. Kemudian, sekumpulan senyawa kimia atau ligan yang telah disejajarkan tersebut ditempatkan dalam kotak 3D virtual yang berisi kisi-kisi kotak kecil yang berisikan atom probe bermuatan +1 yang digunakan untuk mengukur besarnya energi struktural akibat dari efek sterik dan elektrostatik yang ada dari berbagai *grid points* dihitung. Besarnya energi sterik dan hidrofobik (X) ini kemudian akan dianalisis korelasinya terhadap parameter aktivitas biologis senyawa kimia (Y) seperti IC50, EC50 menggunakan metode PLS (*Partial Least Squares*). Hasil analisis korelasi dengan PLS ini kemudian divisualisasikan dalam bentuk peta kontur yang menunjukkan area-area yang memberikan efek sterik maupun hidrofobik yang berguna menjadi petunjuk untuk mencari senyawa-senyawa kimia baru yang mempunyai aktivitas yang sama. Alur metode CoMFA dapat di lihat pada Gambar 10 dibawah ini.



Gambar 10. Metodologi 3D-QSAR menggunakan pendekatan CoMFA⁶⁵

Penerapan CADD Dalam Riset FFAR4/GPR120

Sebanyak lima G protein-coupled receptor (GPCRs) telah diidentifikasi dan diketahui diaktifkan oleh asam lemak bebas (FFA)⁶⁶. Di antara mereka, FFA1 (GPR40) dan FFA4 (GPR120) mengikat asam lemak rantai panjang, FFA2 (GPR43) dan FFA3 (GPR41) mengikat asam lemak rantai pendek dan GPR84 mengikat asam lemak rantai sedang. Reseptor asam lemak bebas kini telah muncul sebagai target potensial untuk pengobatan diabetes, obesitas dan penyakit kekebalan tubuh. Kemajuan terbaru dalam kristalografi GPCR saat ini telah memungkinkan penjelasan struktur FFA1 dan menyediakan templat yang dapat digunakan untuk pemodelan homologi reseptor FFA lainnya. Oleh karena itu, teknik komputasi seperti pemodelan homologi dan ligan docking akan memainkan peran penting dalam memetakan kontak reseptor ligan dan memberikan hipotesis kerja untuk mutagenesis reseptor yang terarah. Pemodelan homologi dalam kombinasi dengan data mutagenesis memungkinkan informasi struktural secara tidak langsung dan telah terbukti memberikan ide dalam pemahaman interaksi ligan-protein dalam banyak GPCR. Dalam pemodelan homologi, struktur protein dibangun dari urutan asam amino dan struktur eksperimental dari protein homolog terkait. Struktur kristal serta model homologi GPCR berfungsi sebagai dasar untuk mengeksplorasi ikatan ligan melalui berbagai strategi *molekuler docking*. Ligan docking memberikan solusi cepat tentang bagaimana dan di mana ligan berikatan dengan reseptor dan memprediksi interaksi kunci yang penting untuk pengenalan ligan. Selain fungsi penilaian, pose docking ligan yang diperoleh dievaluasi berdasarkan kesesuaiannya dengan

data mutagenesis dan hubungan struktur-aktivitas ligan.

Sampai saat ini, struktur 3D FFAR4/GPR120 belum teridentifikasi⁶⁷. Untuk mengembangkan agonis FFAR4/GPR120 selektif, para peneliti telah membangun model homologi FFAR4/GPR120 dengan memanfaatkan struktur kristal GPCR lain, seperti β 2-adrenoceptor dan bovine rhodopsin^{35,67,68}. Ikatan hidrogen antara residu asam karboksilat ligan dan guanidin dari Arg99 pada FFAR4/GPR120 telah ditemukan penting untuk aktivitas ligan di FFAR4/GPR120^{35,67,68}. Berdasarkan pada struktur agonis TZD PPAR γ , senyawa yang mengandung asam karboksilat telah dikembangkan sebagai agonis selektif menggunakan model homologi FFAR4/GPR120⁶⁸.

Karena struktur tiga dimensi FFAR4/GPR120 belum bisa didapatkan melalui eksperimen kristalografi sinar-X, studi hubungan struktur-aktivitas juga telah dilakukan dengan menggabungkan data-data mutagenesis dan pemodelan homologi yang difokuskan pada situs aktif pengikatan⁶⁷. Hasil mutagenesis pada situs aktif pengikatan menunjukkan bahwa residu arginine 99 (R99) berperan secara signifikan untuk pengikatan ligan dengan FFAR4/GPR120, dan sekuens asam amino di sekitar R99 lestari dari berbagai organisme⁶⁷. Studi mutasi langsung telah menunjukkan bahwa Arg178 bukan bagian dari ikat pengikat ortosterik, tetapi mutasi Arg99 menghilangkan fungsi ligan termasuk substrat asam lemak, GW9508⁶⁹ dan TUG-891³⁵.

Sun et al., 2010 juga menghitung besarnya energi ikatan hidrogen antara agonis NCG21 dengan model homologi FFAR4/GPR120 yang berasal dari struktur kristal bovine rhodopsin⁶⁷. Diketahui bahwa senyawa NCG-21 tidak hanya menunjukkan afinitas tertinggi, tetapi juga mengaktifasi protein ERK paling kuat, meningkatkan respons kalsium intraseluler dan sekresi GLP-1 dalam sel STC-1. Selain itu, NCG-21 juga diperiksa *in vivo*, yang secara langsung meningkatkan level GLP-1 plasma pada tikus setelah pemberian⁶⁷.

Baru-baru ini, Shimpukade et al., 2012 telah melaporkan interaksi antara derivatif TUG dengan FFAR4/GPR120. Mereka pertama kali memeriksa situs pengikatan FFAR4/GPR120 secara rinci dengan pemodelan homologi⁷⁰. Upaya mereka membuka lebih lanjut jalan penemuan obat FFAR4/GPR120 secara *in silico*. Kemudian, menggunakan pendekatan mutagenesis dan pemodelan homologi, penelitian terbaru menunjukkan bahwa R99 dan W104 dalam loop ekstraseluler pertama membentuk *cap* yang mendukung interaksi spesifik dengan agonis karboksilat dengan reseptor FFA4 (asam α -linolenat, aLA, GW9508, TUG-891 dan TUG -670)^{38,71}. Kedua residu ini lestari (*conserved*) dalam reseptor FFA4 tetapi tidak pada GPCR asam lemak lainnya, seperti reseptor FFA1 (GPR40). Tambahan pula, setidaknya tiga residu lain di daerah transmembran dari reseptor FFA4, diantaranya T119, N215 dan I280, diusulkan untuk secara khusus berinteraksi dengan fragmen ortho-biphenyl dari TUG-891 berdasarkan pemodelan struktural homologi dan mutagenesis⁷⁰.

Perhitungan simulasi docking dan model homologi dari FFAR4/GPR120 mengungkapkan korelasi yang signifikan antara nilai yang dihitung dari energi ikatan hidrogen dan aktivitas yang diinduksi ligan dalam banyak senyawa, yang dapat memandu dalam memprediksi aktivitas senyawa baru⁷². Simulasi docking FFAR4/GPR120 dan ligannya menggunakan model homologi berdasarkan pada struktur kristal bovine rhodopsin menunjukkan bahwa ikatan hidrogen tampaknya terbentuk antara oksigen karboksilat dari ligan (asam lemak) dan guanidin dari Arg99 di GPR120, menunjukkan bahwa penting bagi ligan untuk memiliki gugus karboksil untuk mengikat GPR120⁷². Untuk mengidentifikasi ligan alami lain dari FFAR4, beberapa senyawa agonis parsial selektif berhasil diidentifikasi dari tubuh buah *Albatrellus ovinus*⁷¹. Karena tidak ada struktur kristal FFA4 yang telah dipublikasikan hingga saat ini, model homologi dibangun menggunakan struktur kristal aktif yang distabilkan dengan nanobody-stable keadaan β 2-adrenoceptor (PDB kode 3P0G) sebagai templat dengan urutan isoform pendek FFA4 manusia⁷³. Model ini digunakan dalam kombinasi dengan data mutagenesis dan studi struktur aktivitas ligan untuk menyelidiki mode pengikatan ligan. Studi dilakukan dengan menggunakan ALA, agonis FFA1/FFA4 yang banyak dilaporkan, serta agonis FFA4 yang baik dan selektif serta analognya.

Kesimpulan

Dalam ulasan ini, kami telah mensurvey *state-of-the-art* dari pendekatan komputasional di bidang penelitian FFAR4/GPR120 dalam kaitannya dengan desain dan pengembangan obat DMT2. Sejumlah besar hasil penelitian yang telah dilaporkan secara studi *in silico* menunjukkan peran penting teknik pemodelan molekuler dalam menciptakan gambaran komprehensif karakteristik struktural dan fungsional dari FFAR4/GPR120. Dengan mencermati hasil studi-studi tersebut, ini menunjukkan bahwa metode komputasi sendiri mungkin berkontribusi sebagian kecil saja dari keseluruhan pemahaman terhadap fungsi dan aktivitas FFAR4/GPR120. Namun demikian pendekatan komputasional *in silico* tetapi menjadi instrumen penelitian yang sangat berharga dalam menyelidiki protein yang sangat kompleks ini. Wawasan dan pengetahuan yang lebih dalam dari fungsi protein FFAR4/GPR120 dan perannya dalam pencarian ligan agonis selektif hanya dapat dicapai dengan kolaborasi antar disiplin ilmu kelompok penelitian eksperimental dan teoritis. Pendekatan komputasional *in silico* merupakan teknik yang berharga dan efisien yang bisa melengkapi pendekatan eksperimental dan menghasilkan hipotesis dan ide-ide berguna sebelum dilakukan validasi secara eksperimental. Model komputasi pada dasarnya didasarkan pada data eksperimen yang berasal dari bidang biologi, kimia, farmakologi atau biofisika. Karena kenyataan bahwa kualitas model sangat tergantung pada data yang tersedia secara eksperimental seperti kristalografi sinar-X dan NMR, jelas bahwa pengembangan lebih lanjut dari metode eksperimental akan mengarah pada model yang lebih baik dengan

validitas yang lebih tinggi. Di sisi lain, model komputasi menyediakan sumber pengetahuan yang luas dan dapat membimbing para ilmuwan yang bekerja secara eksperimental dari bidang yang berbeda melalui studi mereka. Sebagian besar protein reseptor GPCR belum dapat dikristalisasi, tetapi informasi struktural dapat tersedia melalui penerapan pemodelan homologi komparatif. Penapisan virtual berfungsi sebagai sumber yang kaya dalam mengidentifikasi senyawa-senyawa kimia aktif yang baru untuk desain dan pengembangan obat. Interaksi antara reseptor dan ligan di situs pengikatan dapat diamati secara *in silico* dan rasional. FFAR4/GPR120 merupakan target yang sangat atraktif dalam pengembangan obat DMT2. Saat ini, sebagian besar studi komputasi untuk pengikatan ligan berfokus pada situs pengikatan yang terletak di daerah transmembran atau di domain ekstraseluler lokasi di mana FFAR4/GPR120 terletak. Beberapa ligan agonis yang telah ditemukan yang mengaktifkan sinyal FFAR4/GPR120 menjadi panduan yang sangat berguna dalam pencarian dan pengembangan ligan-ligan lain yang lebih selektif dan spesifik serta sangat penting untuk terus dipelajari secara ekstensif di masa depan melalui kolaborasi eksperimental dan komputasional.

Daftar Pustaka

1. Roemling, C.; Qaim, M. Obesity Trends and Determinants in Indonesia. *Appetite* **2012**, *58* (3), 1005–1013.
2. Usfar, A. A.; Lebenthal, E.; Achadi, E.; Hadi, H. Obesity as a Poverty-Related Emerging Nutrition Problems: The Case of Indonesia. *Obes. Rev.* **2010**, *11* (12), 924–928.
3. Al-Goblan, A. S.; Al-Alfi, M. A.; Khan, M. Z. Mechanism Linking Diabetes Mellitus and Obesity. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **2014**, *7*, 587–591. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S67400>.
4. Dandona, P.; Aljada, A.; Chaudhuri, A.; Mohanty, P.; Garg, R. Metabolic Syndrome: A Comprehensive Perspective Based on Interactions between Obesity, Diabetes, and Inflammation. *Circulation* **2005**, *111* (11), 1448–1454.
5. Golay, A.; Ybarra, J. Link between Obesity and Type 2 Diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *19* (4), 649–663.
6. Roglic, G. WHO Global Report on Diabetes: A Summary. *Int. J. Noncommunicable Dis.* **2016**, *1* (1), 3.
7. Czech, M. P. Insulin Action and Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. *Nat. Med.* **2017**, *23* (7), 804–814.
8. Guariguata, L.; Whiting, D. R.; Hambleton, I.; Beagley, J.; Linnenkamp, U.; Shaw, J. E. Global Estimates of Diabetes Prevalence for 2013 and Projections for 2035. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2014**, *103* (2), 137–149.
9. Soewondo, P.; Soegondo, S.; Suastika, K.; Pranoto, A.; Soeatmadji, D. W.; Tjokroprawiro, A. The DiabCare Asia 2008 Study—Outcomes on Control and Complications of Type 2 Diabetic Patients in Indonesia. *Med. J. Indones.* **2010**, *19* (4), 235–44.
10. Azimova, K.; San Juan, Z.; Mukherjee, D. Cardiovascular Safety Profile of Currently Available Diabetic Drugs. *Ochsner J.* **2014**, *14* (4), 616–632.
11. Scheen, A. Thiazolidinediones and Liver Toxicity. *Diabetes Metab.* **2001**, *27* (3), 305–13.
12. Bouchoucha, M.; Uzzan, B.; Cohen, R. Metformin and Digestive Disorders. *Diabetes Metab.* **2011**, *37* (2), 90–96.
13. Richter, B.; Bandeira-Echtler, E.; Bergerhoff, K.; Lerch, C. Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4)

- Inhibitors for Type 2 Diabetes Mellitus. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2008**, No. 2.
14. Rosenstock, J.; Ferrannini, E. Euglycemic Diabetic Ketoacidosis: A Predictable, Detectable, and Preventable Safety Concern with SGLT2 Inhibitors. *Diabetes Care* **2015**, *38* (9), 1638–1642.
 15. Association, A. D. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **2013**, *36* (Supplement 1), S67–S74.
 16. Stein, S. A.; Lamos, E. M.; Davis, S. N. A Review of the Efficacy and Safety of Oral Antidiabetic Drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2013**, *12* (2), 153–175.
 17. Goodarzi, M. O.; Bryer-Ash, M. Metformin Revisited: Re-Evaluation of Its Properties and Role in the Pharmacopoeia of Modern Antidiabetic Agents. *Diabetes Obes. Metab.* **2005**, *7* (6), 654–665.
 18. Amini, F. G.; Rafieian-Kopaei, M.; Nematbakhsh, M.; Baradaran, A.; Nasri, H. Ameliorative Effects of Metformin on Renal Histologic and Biochemical Alterations of Gentamicin-Induced Renal Toxicity in Wistar Rats. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* **2012**, *17* (7), 621.
 19. Liu, K. W.; Dai, L. K.; Jean, W. Metformin-Related Vitamin B12 Deficiency. *Age Ageing* **2006**, *35* (2), 200–201.
 20. Natali, A.; Ferrannini, E. Effects of Metformin and Thiazolidinediones on Suppression of Hepatic Glucose Production and Stimulation of Glucose Uptake in Type 2 Diabetes: A Systematic Review. *Diabetologia* **2006**, *49* (3), 434–441.
 21. Lago, R. M.; Singh, P. P.; Nesto, R. W. Congestive Heart Failure and Cardiovascular Death in Patients with Prediabetes and Type 2 Diabetes given Thiazolidinediones: A Meta-Analysis of Randomised Clinical Trials. *The Lancet* **2007**, *370* (9593), 1129–1136.
 22. Karagiannis, T.; Paschos, P.; Paletas, K.; Matthews, D. R.; Tsapas, A. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors for Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus in the Clinical Setting: Systematic Review and Meta-Analysis. *Bmj* **2012**, *344*, e1369.
 23. Hauser, A. S.; Attwood, M. M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H. B.; Gloriam, D. E. Trends in GPCR Drug Discovery: New Agents, Targets and Indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (12), 829.
 24. Andrews, S. P.; Brown, G. A.; Christopher, J. A. Structure-Based and Fragment-Based GPCR Drug Discovery. *ChemMedChem* **2014**, *9* (2), 256–275.
 25. Liu, H.-D.; Wang, W.; Xu, Z.; Liu, C.; He, D.; Du, L.-P.; Li, M.-Y.; Yu, X.; Sun, J. FFA4 Receptor (GPR120): A Hot Target for the Development of Anti-Diabetic Therapies. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *763*, 160–168.
 26. Brown, A. J.; Jupe, S.; Briscoe, C. P. A Family of Fatty Acid Binding Receptors. *DNA Cell Biol.* **2005**, *24* (1), 54–61.
 27. Hara, T.; Kashihara, D.; Ichimura, A.; Kimura, I.; Tsujimoto, G.; Hirasawa, A. Role of Free Fatty Acid Receptors in the Regulation of Energy Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (9), 1292–1300.
 28. Fredriksson, R.; Höglund, P. J.; Gloriam, D. E.; Lagerström, M. C.; Schiöth, H. B. Seven Evolutionarily Conserved Human Rhodopsin G Protein-Coupled Receptors Lacking Close Relatives. *FEBS Lett.* **2003**, *554* (3), 381–388.
 29. Ichimura, A.; Hirasawa, A.; Hara, T.; Tsujimoto, G. Free Fatty Acid Receptors Act as Nutrient Sensors to Regulate Energy Homeostasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2009**, *89* (3–4), 82–88.
 30. Miyamoto, J.; Hasegawa, S.; Kasubuchi, M.; Ichimura, A.; Nakajima, A.; Kimura, I. Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (4), 450.
 31. Olefsky, J. M. Omega 3 Fatty Acids and GPR120. *Cell Metab.* **2012**, *15* (5), 564–565.
 32. Talukdar, S.; Bae, E. J.; Imamura, T.; Morinaga, H.; Fan, W.; Li, P.; Lu, W. J.; Watkins, S. M.; Olefsky, J. M. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell* **2010**, *142* (5), 687–698.
 33. Li, A.; Li, Y.; Du, L. Biological Characteristics and Agonists of GPR120 (FFAR4) Receptor:

- The Present Status of Research. *Future Med. Chem.* **2015**, 7 (11), 1457–1468.
34. Briscoe, C. P.; Peat, A. J.; McKeown, S. C.; Corbett, D. F.; Goetz, A. S.; Littleton, T. R.; McCoy, D. C.; Kenakin, T. P.; Andrews, J. L.; Ammala, C. Pharmacological Regulation of Insulin Secretion in MIN6 Cells through the Fatty Acid Receptor GPR40: Identification of Agonist and Antagonist Small Molecules. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 148 (5), 619–628.
 35. Shimpukade, B.; Hudson, B. D.; Hovgaard, C. K.; Milligan, G.; Ulven, T. Discovery of a Potent and Selective GPR120 Agonist. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (9), 4511–4515.
 36. Halder, S.; Kumar, S.; Sharma, R. The Therapeutic Potential of GPR120: A Patent Review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, 23 (12), 1581–1590.
 37. Zhang, D.; Leung, P. S. Potential Roles of GPR120 and Its Agonists in the Management of Diabetes. *Drug Des. Devel. Ther.* **2014**, 8, 1013.
 38. Hudson, B. D.; Shimpukade, B.; Mackenzie, A. E.; Butcher, A. J.; Pediani, J. D.; Christiansen, E.; Heathcote, H.; Tobin, A. B.; Ulven, T.; Milligan, G. The Pharmacology of TUG-891, a Potent and Selective Agonist of the Free Fatty Acid Receptor 4 (FFA4/GPR120), Demonstrates Both Potential Opportunity and Possible Challenges to Therapeutic Agonism. *Mol. Pharmacol.* **2013**, 84 (5), 710–725.
 39. Schilperoort, M.; van Dam, A. D.; Hoeke, G.; Shabalina, I. G.; Okolo, A.; Hanyaloglu, A. C.; Dib, L. H.; Mol, I. M.; Caengprasath, N.; Chan, Y.-W. The GPR120 Agonist TUG-891 Promotes Metabolic Health by Stimulating Mitochondrial Respiration in Brown Fat. *EMBO Mol. Med.* **2018**, 10 (3).
 40. Sparks, S. M.; Chen, G.; Collins, J. L.; Danger, D.; Dock, S. T.; Jayawickreme, C.; Jenkinson, S.; Laudeman, C.; Leesnitzer, M. A.; Liang, X. Identification of Diarylsulfonamides as Agonists of the Free Fatty Acid Receptor 4 (FFA4/GPR120). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24 (14), 3100–3103.
 41. Bruno, A.; Aiello, F.; Costantino, G.; Radi, M. Homology Modeling, Validation and Dynamics of the G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER-1). *Mol. Inform.* **2016**, 35 (8–9), 333–339.
 42. França, T. C. C. Homology Modeling: An Important Tool for the Drug Discovery. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2015**, 33 (8), 1780–1793.
 43. Nero, T. L.; Parker, M. W.; Morton, C. J. Protein Structure and Computational Drug Discovery. *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, 46 (5), 1367–1379. <https://doi.org/10.1042/BST20180202>.
 44. Macalino, S. J. Y.; Gosu, V.; Hong, S.; Choi, S. Role of Computer-Aided Drug Design in Modern Drug Discovery. *Arch. Pharm. Res.* **2015**, 38 (9), 1686–1701.
 45. Davis, A. M.; Teague, S. J.; Kleywegt, G. J. Application and Limitations of X-Ray Crystallographic Data in Structure-Based Ligand and Drug Design. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42 (24), 2718–2736.
 46. Webb, B.; Sali, A. Protein Structure Modeling with MODELLER. In *Functional Genomics*; Springer, 2017; pp 39–54.
 47. Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. C. SWISS-MODEL: An Automated Protein Homology-Modeling Server. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31 (13), 3381–3385.
 48. Kelley, L. A.; Mezulis, S.; Yates, C. M.; Wass, M. N.; Sternberg, M. J. E. The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis. *Nat. Protoc.* **2015**, 10 (6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
 49. Yang, J.; Zhang, Y. I-TASSER Server: New Development for Protein Structure and Function Predictions. *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43 (W1), W174–W181.
 50. Lybrand, T. P. Ligand–Protein Docking and Rational Drug Design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5 (2), 224–228.
 51. Khan, S. U.; Ahemad, N.; Chuah, L.-H.; Naidu, R.; Htar, T. T. Sequential Ligand-and Structure-Based Virtual Screening Approach for the Identification of Potential G Protein-Coupled Estrogen Receptor-1 (GPER-1) Modulators. *RSC Adv.* **2019**, 9 (5), 2525–2538.
 52. Jacob, R. B.; Andersen, T.; McDougal, O. M. Accessible High-Throughput Virtual Screening

- Molecular Docking Software for Students and Educators. *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8* (5), e1002499.
53. Gaulton, A.; Bellis, L. J.; Bento, A. P.; Chambers, J.; Davies, M.; Hersey, A.; Light, Y.; McGlinchey, S.; Michalovich, D.; Al-Lazikani, B. ChEMBL: A Large-Scale Bioactivity Database for Drug Discovery. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *40* (D1), D1100–D1107.
 54. Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. ZINC- a Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45* (1), 177–182.
 55. Schneidman-Duhovny, D.; Dror, O.; Inbar, Y.; Nussinov, R.; Wolfson, H. J. PharmaGist: A Webserver for Ligand-Based Pharmacophore Detection. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (suppl_2), W223–W228.
 56. Irwin, J. J.; Shoichet, B. K.; Mysinger, M. M.; Huang, N.; Colizzi, F.; Wassam, P.; Cao, Y. Automated Docking Screens: A Feasibility Study. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (18), 5712–5720.
 57. Labbé, C. M.; Rey, J.; Lagorce, D.; Vavruša, M.; Becot, J.; Sperandio, O.; Villoutreix, B. O.; Tufféry, P.; Miteva, M. A. MTiOpenScreen: A Web Server for Structure-Based Virtual Screening. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (W1), W448–W454.
 58. Sunseri, J.; Koes, D. R. Pharmit: Interactive Exploration of Chemical Space. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (W1), W442–W448.
 59. Koes, D. R.; Camacho, C. J. ZINCPharmer: Pharmacophore Search of the ZINC Database. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (W1), W409–W414.
 60. Verma, J.; Khedkar, V. M.; Coutinho, E. C. 3D-QSAR in Drug Design-a Review. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (1), 95–115.
 61. Bordás, B.; KHomíves, T.; Lopata, A. Ligand-Based Computer-Aided Pesticide Design. A Review of Applications of the CoMFA and CoMSIA Methodologies. *Pest Manag. Sci. Former. Pestic. Sci.* **2003**, *59* (4), 393–400.
 62. Koes, D. R. Pharmacophore Modeling: Methods and Applications. In *Computer-Aided Drug Discovery*; Zhang, W., Ed.; Methods in Pharmacology and Toxicology; Springer New York: New York, NY, 2016; pp 167–188.
 63. Sheridan, R. P.; Kearsley, S. K. Why Do We Need so Many Chemical Similarity Search Methods? *Drug Discov. Today* **2002**, *7* (17), 903–911.
 64. Zhang, L.; Tsai, K.-C.; Du, L.; Fang, H.; Li, M.; Xu, W. How to Generate Reliable and Predictive CoMFA Models. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (6), 923–930.
 65. Roy, K.; Kar, S.; Das, R. N. *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*; Academic press, 2015.
 66. Tikhonova, I. G. Application of GPCR Structures for Modelling of Free Fatty Acid Receptors. In *Free Fatty Acid Receptors*; Springer, 2016; pp 57–77.
 67. Sun, Q.; Hirasawa, A.; Hara, T.; Kimura, I.; Adachi, T.; Awaji, T.; Ishiguro, M.; Suzuki, T.; Miyata, N.; Tsujimoto, G. Structure-Activity Relationships of GPR120 Agonists Based on a Docking Simulation. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78* (5), 804–810.
 68. Suzuki, T.; Igari, S.; Hirasawa, A.; Hata, M.; Ishiguro, M.; Fujieda, H.; Itoh, Y.; Hirano, T.; Nakagawa, H.; Ogura, M. Identification of G Protein-Coupled Receptor 120-Selective Agonists Derived from PPAR γ Agonists. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (23), 7640–7644.
 69. Watson, S.-J.; Brown, A. J.; Holliday, N. D. Differential Signaling by Splice Variants of the Human Free Fatty Acid Receptor GPR120. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *81* (5), 631–642.
 70. Hudson, B. D.; Shimpukade, B.; Milligan, G.; Ulven, T. The Molecular Basis of Ligand Interaction at Free Fatty Acid Receptor 4 (FFA4/GPR120). *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (29), 20345–20358.
 71. Hara, T.; Hirasawa, A.; Sun, Q.; Sadakane, K.; Itsubo, C.; Iga, T.; Adachi, T.; Koshimizu, T.; Hashimoto, T.; Asakawa, Y. Novel Selective Ligands for Free Fatty Acid Receptors GPR120 and GPR40. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2009**, *380* (3), 247–255.
 72. Takeuchi, M.; Hirasawa, A.; Hara, T.; Kimura, I.; Hirano, T.; Suzuki, T.; Miyata, N.; Awaji, T.; Ishiguro, M.; Tsujimoto, G. FFA1-Selective Agonistic Activity Based on Docking

- Simulation Using FFA1 and GPR120 Homology Models. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, 168 (7), 1570–1583.
73. Rasmussen, S. G.; Choi, H.-J.; Fung, J. J.; Pardon, E.; Casarosa, P.; Chae, P. S.; DeVree, B. T.; Rosenbaum, D. M.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S. Structure of a Nanobody-Stabilized Active State of the β 2 Adrenoceptor. *Nature* **2011**, 469 (7329), 175.