



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**YENİ NİKOTİNAMİT FOSFORİBOZİLTRANSFERAZ (NAMPT)
İNHİBİTÖRÜ/SİRTUİN-1 (SIRT-1) AKTİVATÖRÜ HİBRİT
BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

FİKRİYE ÖZGENCİL

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

EKİM 2025



**YENİ NİKOTİNAMİT FOSFORİBOZİLTRANSFERAZ (NAMPT) İNHİBİTÖRÜ/SİRTUİN-1
(SIRT-1) AKTİVATÖRÜ HİBRİT BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Fikriye ÖZGENCİL

DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ekim 2025

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Fikriye ÖZGENCİL

16.10.2025

YENİ NİKOTİNAMİT FOSFORİBOZİLTRANSFERAZ (NAMPT) İNHİBİTÖRÜ/SİRTUİN-1 (SIRT-1)
AKTİVATÖRÜ HİBRİT BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ
(Doktora Tezi)

Fikriye ÖZGENCİL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2025

ÖZET

Kanser hücrelerinde artan metabolizma, büyüme ve NAD⁺ tüketen enzim aktivitesi, NAD⁺'ın normal hücrelere kıyasla daha hızlı tükenmesine ve bu hücrelerin NAD⁺ eksikliğine karşı daha hassas hale gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, ana NAD⁺ sentez yolağında hız limitleyici bir enzim olarak görev alan NAMPT, kanser tedavisi açısından önemli bir hedef haline gelmektedir. SIRT1 ise, NAD⁺'ı kofaktör olarak kullanarak DNA tamiri, gen ekspresyonu ve hücre ölümü gibi birçok hücresel faaliyette görev almaktadır. Tez çalışmamızda, NAMPT inhibisyonu ve SIRT1 aktivasyonunun aynı anda sağlanması ile hücresel NAD⁺ düzeylerinin daha etkili biçimde azaltılarak, NAD⁺ eksikliğine duyarlı kanser hücrelerinde daha güçlü bir antiproliferatif etki hedeflenmiştir. Bu amaçla, hem NAMPT inhibisyonu hem de SIRT1 aktivasyonu sağlayan hibrit bileşiklere ulaşmak için her iki hedefe yönelik oluşturulan farmakofor modeller ile sıralı sanal tarama çalışması gerçekleştirilmiştir. Tarama sonucunda her iki hedef için istenilen özellikleri karşılayan dokuz bileşik (**F1-F9**) satın alınarak *in vitro* NAMPT ve SIRT1 aktiviteleri belirlenmiş; **F1**, **F2**, **F3** ve **F5**'in hem NAMPT inhibitörü hem de SIRT1 aktivatörü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Aralarından **F1** güçlü NAMPT inhibitörü (IC₅₀=0,89 µM) ve seçici SIRT1 aktivatörü (EC_{1,5}=16,45 µM) olması nedeniyle öncü bileşik olarak seçilmiş, optimizasyon çalışmaları ile 3-[N-(arilmetil)sülfamoil]-N-(aril)benzamid türevi on iki adet bileşik (**STF1-STF12**) tasarlanmıştır. Bu bileşiklerden **STF2** (NAMPT IC₅₀=11,24 µM; SIRT1 EC_{1,5}=16,98) ve **STF6** (NAMPT IC₅₀=19,15 µM; SIRT1 EC_{1,5}=0,59 µM) kodlu bileşikler, dual NAMPT inhibitörü ve SIRT1 aktivatörü olarak belirlenmiştir. Dual etkili olarak tanımlanan **F1**, **F2**, **STF2** ve **STF6** kodlu bileşiklerin insan Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücreleri ile insan HEK293T embriyonik böbrek hücreleri (kanser olmayan) üzerindeki etkileri incelenmiş, elde edilen bulgular, bu bileşiklerin NAMPT ve SIRT1 üzerindeki etkileri ile ilişkilendirilmiştir.

Bilim Kodu : 1019
Anahtar Kelimeler : NAMPT, SIRT-1, Hibrit molekül tasarımı
Sayfa Adedi : 207
Danışman : Prof. Dr. Gökçen EREN

DESIGN, SYNTHESIS, AND EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF NOVEL
NICOTINAMIDE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (NAMPT) INHIBITOR/SIRTUIN-1 (SIRT-1)
ACTIVATOR HYBRID MOLECULES
(Ph. D. Thesis)

Fikriye ÖZGENÇİL

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

October 2025

ABSTRACT

In cancer cells, enhanced metabolism, growth, and activity of NAD⁺-consuming enzymes lead to a more rapid depletion of NAD⁺ compared to normal cells, resulting in cancer cells being more sensitive to NAD⁺ deficiency. Therefore, NAMPT, the rate-limiting enzyme in the main NAD⁺ biosynthesis pathway, has emerged as a significant target in cancer therapy. SIRT1, on the other hand, uses NAD⁺ as a cofactor to regulate various cellular processes, including DNA repair, gene expression, and cell death. In our research, we aimed to achieve a stronger antiproliferative effect in cancer cells sensitive to NAD⁺ depletion by simultaneously inhibiting NAMPT and activating SIRT1, thereby more effectively reducing cellular NAD⁺ levels. For this purpose, a sequential virtual screening study was carried out using pharmacophore models designed for both targets to identify hybrid compounds that could both inhibit NAMPT and activate SIRT1. As a result of the screening, nine compounds (**F1-F9**) that met the desired criteria for both targets were purchased and evaluated for their *in vitro* NAMPT and SIRT1 activities. Compounds **F1**, **F2**, **F3**, and **F5** were found to possess both NAMPT inhibitory and SIRT1 activating effects. Among these, **F1** was selected as the lead compound due to its potent NAMPT inhibition (IC₅₀=0,89 µM) and selective SIRT1 activation (EC_{1,5}=16,45 µM). Subsequently, twelve 3-[N-(arylmethyl)sulfamoyl]-N-(aryl)benzamide derivatives (**STF1-STF12**) were designed through an optimization study. Among these, **STF2** (NAMPT IC₅₀=11,24 µM; SIRT1 EC_{1,5}=16,98 µM) and **STF6** (NAMPT IC₅₀=19,15 µM; SIRT1 EC_{1,5}=0,59 µM) were identified as dual NAMPT inhibitors and SIRT1 activators. The effects of the dual-acting compounds **F1**, **F2**, **STF2**, and **STF6** were investigated on human Caki-1 renal, HCT116 colorectal, and Hep3B liver cancer cell lines, as well as on non-cancerous human HEK293T embryonic kidney cells, and the findings were correlated with their effects on NAMPT and SIRT1.

Science Code : 1019

Key Words : NAMPT, SIRT-1, Designing hybride molecule

Page Number : 207

Supervisor : Prof. Dr. Gökçen EREN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, akademik ve manevi desteğini daima hissettiren, güler yüzü ve samimiyetiyle motivasyon sağlayan danışmanım Prof. Dr. Gökçen EREN'e,

Hücre kültürü çalışmalarını gerçekleştiren Gebze Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ÇİMEN'e ve öğrencileri Başak Nur ULUOCAK'a, Müzeyyen ÇOBAN'a, Sümeyye ONAT'a,

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bana her anlamda destek olan SIRTeam çalışma grubumuzun değerli üyeleri Dr. Öğr. Üyesi Mahmut GÖZELLE'ye, Arş. Gör. Dr. Selen Gözde KAYA'ya, Arş. Gör. Habibe Beyza GÜNİNDİ'ye ve Arş. Gör. Dr. Ahmet Buğra AKSEL'e,

Bu süreçte desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Özge KUYRUKÇU ÖZTÜRK'e ve Damla AVCI'ya,

Her zaman ilgi ve desteklerini gördüğüm Anabilim Dalımız değerli öğretim üyeleri ve yardımcılara,

Yoğun çalışmalarım sırasında sabır, anlayış ve sevgisiyle her zaman yanımda olan sevgili eşim İbrahim Kaan ÖZGENCİL'e,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktoram süresince bana destek olan, beni ben yapan canım annem, babam ve kardeşlerime,

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde verdiği desteklerden ötürü Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na (TÜSEB Proje No: 16839) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK Proje No: 124S441 ve 224S108) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. NAD ⁺ Metabolizması ve Kanser	7
2.2. Nikotinamit Fosforiboziltransferaz (NAMPT)	10
2.3. Tek Hedefli NAMPT İnhibitörleri	14
2.4. Çok hedefli NAMPT İnhibitörleri.....	24
2.5. Sirtuinler ve SIRT1	49
2.6. SIRT1 Aktivatörleri.....	60
3. GEREÇ VE YÖNTEM	69
3.1. Moleküler Modelleme Çalışmaları	69
3.1.1. Farmakofor modelleme	69
3.1.2. Sanal tarama	71
3.1.3. Moleküler Docking	72
3.2. Kimyasal Çalışmalar	73
3.2.1. Materyal.....	73

	Sayfa
3.2.2. Genel sentez yöntemleri	73
3.3. Analitik Çalışmalar	74
3.3.1. Erime noktası tayini.....	74
3.3.2. İnce tabaka kromatografisi	74
3.3.3. Kolon kromatografisi.....	75
3.3.4. ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları	75
3.3.5. HRMS spektrumları	75
3.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	76
3.4.1. NAMPT aktivitelerinin belirlenmesi	76
3.4.2. SIRT1, SIRT2 ve SIRT3 aktivitelerinin belirlenmesi	76
3.4.3. Antiproliferatif etkinin belirlenmesi.....	77
4. BULGULAR.....	79
4.1. Moleküler Modelleme Bulguları.....	79
4.1.1. Farmakofoor Modelleme	79
4.1.2. Sanal tarama	92
4.1.3. Moleküler Docking	94
4.2. Kimyasal Bulgular	100
4.3. Biyolojik Bulgular.....	130
4.3.1. NAMPT ve SIRT1-SIRT3 enzim aktivitesi.....	130
4.3.2. Antiproliferatif etki.....	136
5. TARTIŞMA.....	143
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	165
KAYNAKLAR	167
ÖZGEÇMİŞ.....	205

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Veri setinde yer alan biyoaktif konformasyonu bilinen NAMPT inhibitörleri	79
Çizelge 4.2. Veri setinde yer alan ve biyoaktif konformasyonu bilinmeyen NAMPT inhibitörleri	81
Çizelge 4.3. Veri setinde yer alan SIRT1 aktivatörleri	82
Çizelge 4.4. Farmakofor model belirlemede kullanılan skorlar	84
Çizelge 4.5. NAMPT doğrulama setinde yer alan aktif bileşikler	85
Çizelge 4.6. SIRT1 doğrulama setinde yer alan aktif bileşikler	87
Çizelge 4.7. Farmakofor model performansını belirleyen parametreler	90
Çizelge 4.8. Elde edilen farmakofor modeller.....	91
Çizelge 4.9. Satın alınan final sanal tarama çıktısı bileşikler	93
Çizelge 4.10. Bileşiklerin NAMPT ve SIRT1 aktif bölgelerindeki etkileşimleri	99
Çizelge 4.11. Sanal tarama çıktısı bileşiklerin NAMPT ve SIRT1-SIRT3 enzimlerine karşı etkileri	132
Çizelge 4.12. STF1-STF9 kodlu bileşiklerin NAMPT ve SIRT1-SIRT3 enzimlerine karşı etkileri.....	133
Çizelge 4.13. Bileşiklerin NAMPT IC ₅₀ değerleri	134
Çizelge 4.14. Bileşiklerin SIRT1 EC _{1,5} değerleri.....	135
Çizelge 4.15. Bileşiklerin 24 saat sonunda test edilen hücreler üzerindeki etkileri	136
Çizelge 4.16. Bileşiklerin 10 µM konsantrasyonda 48 saat sonunda insan HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücreleri üzerindeki etkileri.....	141
Çizelge 5.1. Doğrulama yapılamayan ortak farmakofor modelin parametreleri	145

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Tez çalışmamız kapsamında hedeflenen dual etki yaklaşımı.....	4
Şekil 1.2. Farmakofor temelli sıralı sanal tarama çalışması	5
Şekil 1.3. F1 öncü bileşiğinden hareketle yeni türevlerin (STF1-STF12) tasarımı.....	6
Şekil 2.1. NAD ⁺ /NADH ve NADP ⁺ /NADPH dönüşüm reaksiyonları.....	8
Şekil 2.2. NAD ⁺ biyosentez yolları	9
Şekil 2.3. NAMPT-NAD ⁺ -SIRT1 kaskadı.....	10
Şekil 2.4. İnsan NAMPT aktif bölgesi (PDB: 2GVG). A zinciri yeşil, B zinciri turkuaz ve NMN sarı renk ile gösterilmiştir.....	13
Şekil 2.5. NAMPT kataliziyle NAM'dan NMN oluşumu	13
Şekil 2.6. (A) NMN'nin insan NAMPT aktif bölgesinde (PDB: 2GVG) yerleştiği bölge; (B) NAMPT-NMN etkileşimleri. A zinciri yeşil, B zinciri turkuaz ve NMN sarı renk ile, hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.....	14
Şekil 2.7. Klinik denemelere giren birinci nesil NAMPT inhibitörleri	16
Şekil 2.8. (A) FK866'nın insan NAMPT aktif bölgesindeki (PDB: 2GVJ) biyoaktif konformasyonu; (B) NAMPT inhibitörlerinin farmakoforik özelliklerinin FK866'nın biyoaktif konformasyonu üzerinde gösterimi. A zinciri yeşil, B zinciri turkuaz ve FK866 yeşil renk ile, hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.....	17
Şekil 2.9. TRON-8 (4), GPP78 (5), Bileşik 6 ve 7'nin kimyasal yapıları	18
Şekil 2.10. Bileşik 8, MS0 (9), Bileşik 10, 11 ve A-1293201'nin (12) kimyasal yapıları ...	19
Şekil 2.11. Bileşik 13, GNE-617 (14), Bileşik 15, GNE-618 (16) ve LSN3154567'nin (17) kimyasal yapıları.....	21
Şekil 2.12. Bileşik 18, AS1604498 (19), Bileşik 20, F671-0003 (21) ve Bileşik 22'nin kimyasal yapıları	21
Şekil 2.13. Bileşik 23-26'nin kimyasal yapıları.....	22
Şekil 2.14. Bileşik 27, GF4 (28), GF8 (29) ve OT-82'nin (30) kimyasal yapıları	24

Şekil	Sayfa
Şekil 2.15. Çok hedefli NAMPT inhibitörleri.....	25
Şekil 2.16. STF-31'in (31) kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2.17. (A) FK866 ve KPT-9274'ün ortak farmakoforik özellikleri; (B) NAMPT aktif bölgesinde FK866 (PDB: 2GVJ) ve KPT-9274 (PDB: 5NSD) biyoaktif konformasyonları.....	27
Şekil 2.18. Vorinostat (SAHA) (33) ve tucidinostadın (34) kimyasal yapıları.....	28
Şekil 2.19. Bileşik 35 ve 37'nin tasarım stratejisi	29
Şekil 2.20 Bileşik 39, 41 ve 42'nin tasarım stratejileri	30
Şekil 2.21. Bileşik 43-46'nın kimyasal yapıları.....	30
Şekil 2.22. Bileşik 48 ve 49'un tasarım stratejisi	32
Şekil 2.23. Bileşik 51'in tasarım stratejisi.....	34
Şekil 2.24. Bileşik 53'ün tasarım stratejisi.....	35
Şekil 2.25. Bileşik 55'in tasarım stratejisi.....	36
Şekil 2.26. NAMPT inhibitörleri ve NQO1 substratlarının sinerjistik antitümör etkisi ...	37
Şekil 2.27. Bileşik 57'nin tasarım stratejisi.....	38
Şekil 2.28. Bileşik 59'un tasarım stratejisi.....	39
Şekil 2.29. Bileşik 62 ve 63'ün tasarım stratejisi	41
Şekil 2.30. Bileşik 65 ve 66'nın tasarım stratejisi	42
Şekil 2.31. Bileşik 68 ve 69'un tasarım stratejisi	43
Şekil 2.32. Bileşik 71'in tasarım stratejisi.....	45
Şekil 2.33. DDY01 (73) ve DDY02'nin (74) tasarım stratejisi	46
Şekil 2.34. Bileşik 76'nın tasarım stratejisi.....	47
Şekil 2.35. Bileşik 78'in tasarım stratejisi.....	48
Şekil 2.36. Bileşik 80'in tasarım stratejisi.....	49
Şekil 2.37. SIRT1-SIRT7 genel yapısını oluşturan bölgeler	53

Şekil	Sayfa
Şekil 2.38. Sirtuinlerin deasetilasyon mekanizması	54
Şekil 2.39. İnsan SIRT1 enzim bölgeleri ile bu bölgelerin açık ve kapalı konformasyonları.....	57
Şekil 2.40. EX-527 (75), EX-527 analogu (76) ve STAC-11'nin (77) kimyasal yapıları	58
Şekil 2.41. İnsan SIRT1 X-ışını kristal yapılarının (PDB: 4ZZJ (sarı) ve 4I5I (mavi)) üst üste çakıştırılmış hali ile SIRT1 aktivatörü STAC-11 (77) ve SIRT1 inhibitörü EX-527 analogunun (76) biyoaktif konformasyonları. Hidrojen bağı, π - π ve hidrofobik etkileşimler sırasıyla sarı, mavi ve yeşil renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.	60
Şekil 2.42. Piceannatol (78), kersetin (79), resveratrol (80) ve Bileşik 81'in kimyasal yapıları	61
Şekil 2.43. Bileşik 82-84'ün kimyasal yapıları.....	62
Şekil 2.44. SRT1460 (85), SRT2183 (86) ve SRT1720'nin (87) kimyasal yapıları.....	63
Şekil 2.45. SRT2104 (88) ve SRT3025'in (89) kimyasal yapıları	64
Şekil 2.46. Bileşik 90-93'ün kimyasal yapıları.....	65
Şekil 2.47. Bileşik 94 ve 95'in kimyasal yapıları	65
Şekil 2.48. Bileşik 96, E1231 (97) ve MHY2233'ün (98) kimyasal yapıları.....	66
Şekil 2.49. Mulberrin (99), gartarin (100), kinidin (101) ve kininin (102) kimyasal yapıları	67
Şekil 2.50. SCIC2 (103) ve SCIC2.1'in (104) kimyasal yapıları.....	67
Şekil 2.51. M1 (105), Bileşik 106 ve 107'nin kimyasal yapıları.....	68
Şekil 4.1. NAMPT veri setinin (A) N3 ve (B) N6 bileşiklerinin referansıyl; (C) SIRT1 veri setinin S1 (STAC-11) bileşiğinin referansıyl hizalanması	82
Şekil 4.2. Model NAMPT ve Model SIRT1 için oluşturulan ROC grafikleri (A ve C) ve % tarama grafikleri (B ve D)	91
Şekil 4.3. Sanal tarama basamakları	93
Şekil 4.4. (A) İnsan NAMPT:N7 kompleksi (PDB: 4M6P); (B) İnsan SIRT1:STAC-11 kompleksi (PDB: 4ZZJ). Hidrojen bağları, π - π etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler sırasıyla sarı, turkuaz ve yeşil renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.....	95

Şekil	Sayfa
Şekil 4.5. İnsan NAMPT aktif bölgesinde (PDB: 4M6P) (A) F1; (B) F2; (C) F3; (D) F5 kodlu bileşiklerin olası bağlantı modları. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.	96
Şekil 4.6. İnsan NAMPT aktif bölgesinde (PDB: 4M6P) (A) STF2; (B) STF6 kodlu bileşiklerin olası bağlantı modları. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.....	97
Şekil 4.7. İnsan SIRT1 enzim allosterik bölgesinde (PDB: 4ZZJ) (A) F1; (B) F2; (C) F3; (D) F5 kodlu bileşiklerin olası bağlantı modları. Hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler sırasıyla sarı ve yeşil renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.	98
Şekil 4.8. İnsan SIRT1 enzim allosterik bölgesinde (PDB: 4ZZJ) (A) STF2; (B) STF6 kodlu bileşiklerin olası bağlantı modları. Hidrojen bağları ve hidrofobik sırasıyla sarı ve yeşil renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.....	99
Şekil 4.9. Bileşik STF1'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	107
Şekil 4.10. Bileşik STF2'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	109
Şekil 4.11. Bileşik STF3'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	111
Şekil 4.12. Bileşik STF4'ün ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	113
Şekil 4.13. Bileşik STF5'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	115
Şekil 4.14. Bileşik STF6'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	117
Şekil 4.15. Bileşik STF7'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	119
Şekil 4.16. Bileşik STF8'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	121
Şekil 4.17. Bileşik STF9'un ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	123
Şekil 4.18. Bileşik STF10'un ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	125
Şekil 4.19. Bileşik STF11'in ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	127
Şekil 4.20. Bileşik STF12'nin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları.....	129
Şekil 4.21. İnsan HEK293T embriyonik böbrek (kansere olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında 24 saat bileşiklerle muamele sonucu belirlenen % hücre canlılığı (değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir). Her deney üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı farklılıklar * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$ olarak sunulmuştur.....	137

Şekil	Sayfa
Şekil 4.22. F1 kodlu bileşiğin 24 saat sonunda insan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında oluşturduğu etkileri gösteren mikrograflar.....	139
Şekil 4.23. F2 kodlu bileşiğin 24 saat sonunda insan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında oluşturduğu etkileri gösteren mikrograflar.....	139
Şekil 4.24. STF2 kodlu bileşiğin 24 saat sonunda insan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında oluşturduğu etkileri gösteren mikrograflar	140
Şekil 4.25. STF6 kodlu bileşiğin 24 saat sonunda insan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında oluşturduğu etkileri gösteren mikrograflar	140
Şekil 5.1. Çok hedefli ilaç tasarım stratejileri.....	143
Şekil 5.2. Uygulanan sanal tarama prosedürlerine ait iş akış şemaları. (A) Ortak farmakofor model kullanılarak yapılması planlanan sanal tarama prosedürü; (B) Sıralı tarama yöntemi ile yapılan sanal tarama prosedürü...	146
Şekil 5.3. Sanal tarama çıktısı bileşiklerin in vitro NAMPT ve SIRT1 enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri	147
Şekil 5.4. İnsan NAMPT aktif bölgesinde (PDB: 4M6P) bileşiklerin oluşturduğu hidrofobik etkileşimler	148
Şekil 5.5. İnsan SIRT1 aktif bölgesinde (PDB: 4ZZJ) bileşiklerin oluşturduğu hidrojen bağları (sarı) ve hidrofobik etkileşimler (yeşil).....	149
Şekil 5.6. Öncü bileşik F1'den hareketle STF1-STF12 kodlu bileşiklerin tasarımı.....	150
Şekil 5.7. İzlenen sentez yöntemi: (i) Klorosülfonik asit, 80 °C (ii) TEA, diklorometan, oda sıcaklığı; (iii) (1) POCl ₃ , 80 °C, 30 dakika-1 saat, (2) H ₂ O, reflaks, 2 saat; (iv) HATU, HOBt, DIPEA, tetrahidrofuran, oda sıcaklığı, 24-48 saat.....	151
Şekil 5.8. Hedef bileşiklerin ¹ H-NMR spektrumlarında gözlenen kimyasal kayma değerleri	154
Şekil 5.9. Hedef bileşiklerin ¹³ C-NMR spektrumlarında gözlenen kimyasal kayma değerleri	155
Şekil 5.10. STF1-STF12 kodlu bileşiklerin NAMPT ve SIRT1 enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri.....	156

Şekil	Sayfa
Şekil 5.11. İnsan NAMPT aktif bölgesinde (PDB: 4M6P) STF10 ve STF12 kodlu bileşiklerin F1 ile karşılaştırmalı bağlantı modları. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimler sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.	158
Şekil 5.12. İnsan SIRT1 aktif bölgesinde (PDB: 4ZZJ) SFT bileşiklerinin oluşturduğu hidrojen bağları (sarı) ve hidrofobik etkileşimler (yeşil)	159
Şekil 5.13. İnsan SIRT1 aktif bölgesinde (PDB: 4ZZJ) SFT10-SFT12 kodlu bileşiklerinin oluşturduğu hidrojen bağları (sarı) ve hidrofobik etkileşimler (yeşil)	159
Şekil 5.14. İnsan Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında referans bileşikler için belirlenen % hücre canlılığı (değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir). Her deney üç kez tekrarlanmıştır. İstatiksel olarak anlamlı farklılıklar * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$ olarak sunulmuştur.	161
Şekil 5.15. İnsan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında F1 ve F2 için 24 saat sonunda belirlenen % hücre canlılığı (değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir). Her deney üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı farklılıklar * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$ olarak sunulmuştur.	162
Şekil 5.16. İnsan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında STF2 ve STF6 için 24 saat sonunda belirlenen % hücre canlılığı (değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir). Her deney üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı farklılıklar * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$ olarak sunulmuştur.	163
Şekil 5.17. İnsan HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında, 10 μ M konsantrasyonda F1, F2, STF2 ve STF6 bileşikleri için 24 ve 48 saat sonunda belirlenen % hücre canlılıkları (değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir). Her deney üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı farklılıklar * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$ olarak sunulmuştur.	164

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
α	Alfa
Å	Angstrom
β	Beta
δ	Delta, Kimyasal kayma
ϵ	Epsilon
Hz	Hertz
J	Etkileşim sabiti
κ	Kappa
π	Pi
MHz	Megahertz
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
mg	Miligram
mm	Milimetre
mmol	Milimol
ml	Mililitre
nM	Nanomolar
nm	Nanometre
ns	Nanosaniye
ppm	Milyonda bir
rpm	Bir dakikada gerçekleştirilen dönüş veya devir sayısı
kcal	Kilokalori
K_d	Ayrışma Sabiti

Kısaltmalar	Açıklamalar
ADP	Adenozin difosfat
AMC	7-Amino-4-metilkumarin
APE1	Apürinik/Apirimidinik endonükleaz 1
ART	ADP-riboziltransferaz
ATG	Otofajiyle ilgili gen
ATP	Adenozin trifosfat
BRCA	Meme kanseri geni
c-Myc	Hüresel miyelositomatoz onkogen
cADPRS	Siklik ADP-riboz sentetaz
CCR5	C-C kemokin reseptör tipi 5
CTR	C-Terminal regülatör segmenti
CYP	Sitokrom P450
D-2HG	D-2-hidroksiglutarat
DIPEA	<i>N,N</i> -Diizopropiletilamin
DMEM	Dulbecco'nun değiştirilmiş özgül minimum besiyeri
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
E2F1	E2 promotör bağlayıcı faktör 1
EC_{1,5}	Enzim aktivitesini %50 arttırabilen konsantrasyon
EC₅₀	Enzim aktivitesini % maksimum aktivitesinin yarısı kadarını sağlayabilen konsantrasyon
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ErbB	Eritroblastik lösemi virüsüne ait onkogen homologu
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
FOXO	Forkhead box transkripsiyon faktörü
GDH	Glutamat dehidrogenaz
GI₅₀	Hücre büyümesini %50 oranında inhibe eden konsantrasyon
GLUT1	Glukoz taşıyıcısı 1

Kısaltmalar	Açıklamalar
GTPaz	Güanozin trifosfataz
HATU	Hekzaflorofostat azabenzotriazol tetrametil uronyum
HDAC	Histon deasetilaz
HER	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
hERG	Ether-à-go-go ilişkili geni
HIC1	Kanserde aşırı metillenmiş gen 1
HIF-1α	Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa
HOBt	Hidroksibenzotriazol
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektrumu
HSF1	Isı şoku faktörü 1
HTS	Yüksek çıktılı tarama
IC₅₀	Enzim aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyon
IDH	İzositrat dehidrogenaz
IDO	İndoleamin-2,3-dioksijenaz
IL-1	İnterlökin-1
KG	Ketoglutarat
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
KRAS	Kirsten sıçan sarkoma viral onkojen homologu
Ku70	Ku otoantijeni 70
LCAD	Uzun zincirli açıl-KoA dehidrogenaz
LDHA	Laktat dehidrogenaz A
LKB1	Karaciğer kinazı B1
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MD-2	Miyeloid farklılaşma faktörü 2
MyoD	Miyojenik farklılaşma 1
NA	Nikotinik asit
NAAD	Nikotinik asit adenin dinükleotit
NAD⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADS	Nikotinamid adenin dinükleotit sentaz
NAM	Nikotinamid

Kısaltmalar	Açıklamalar
NAMN	Nikotinik asit mononükleotit
NAMPT	Nikotinamit fosforiboziltransferaz
NAPRT	Nikotinik asit fosforiboziltransferaz
NMN	Nikotinamit mononükleotit
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NMNAT	Nikotinik asit/nikotinamit mononükleotit adeniltransferaz
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NQO1	NAD(P)H:Kinon Oksidoredüktaz 1
NR	Nikotinamit ribozit
NRK	Nikotinamit ribozit kinaz
p300	Tümör protein 300
p53	Tümör protein 53
PAK	P21-aktive kinaz
PARP	Poli(ADP-Riboz) polimeraz
PBEF	Pre-B-hücre koloni artırıcı faktör
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDB	Protein veri bankası
PDEδ	Fosfodiesteraz delta
PFK1	Fosfofruktokinaz 1
PGC-1α	Peroksisom proliferatör aktive edilmiş reseptör gama aktivatör 1 alfa
PI3K	Fosfatidilinozitol-3-kinaz
pIC₅₀	Enzim aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonun negatif logaritması
PLC	Fosfolipaz C
PPAR α/γ	Peroksisom proliferatör aktive edilmiş reseptör α/γ
PRPP	5-fosforibozil-1-pirofosfat
QAPRT	Kinolinik asit fosforiboziltransferaz
RAL-GEF	RAL guanin nükleotit değişim faktörleri

Kısaltmalar	Açıklamalar
RAS	Rat sarkomu
rDNA	Ribozomal DNA
RMSD	Kare ortalamalarının karekökündeki sapma
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
rRNA	Ribozomal RNA
SARM1	Steril alfa ve TIR motifi içeren 1
SIRT	Sirtuin
Si	Selektivite indeksi
Sir2	Sessiz enformasyon düzenleyici 2
SOD2	Süperoksit dismutaz 2
STAC	Sirtuin aktivatör bileşikleri
TCA	Trikarboksilik asit
TDO	Triptofan-2,3-dioksijenaz
TEA	Trietilamin
TIP60	Tat ile etkileşen protein 60
TLR4	Toll-benzeri Reseptör 4
TMS	Tetrametilsilan
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
TSA	Tanshinon IIA
VEGFR2	Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2
WRN	Werner sendromu benzeri recQ helikaz
XPA	Xerodermap pigmentosum A grubu proteini
XPC	Xerodermap pigmentosum C grubu proteini

1. GİRİŞ

Geleneksel ilaç tasarımı yaklaşımları, genellikle tek bir biyolojik hedefin yüksek seçicilikle hedeflenmesine dayanmakta ve bu sayede diğer hedeflerle etkileşim sonucu oluşabilecek istenmeyen yan etkilerin önlenmesi amaçlanmaktadır. Ancak, günümüzde kanser gibi karmaşık ve çok bileşenli patolojilerin etkin bir şekilde tedavi edilememesi ve buna bağlı olarak gelişen ilaç direnci nedeniyle, tek hedefe yönelik geliştirilen ilaçların terapötik açıdan yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle bu tür hastalıkların tedavisinde çok hedefli tedavi yaklaşımları sıklıkla kullanılmaktadır [1].

Çok hedefli tedavi stratejileri, çoklu ilaç kombinasyonları, çok bileşenli farmasötik formülasyonlar veya tek bir bileşik üzerinden birden fazla biyolojik hedefin etkilenmesiyle gerçekleştirilebilmektedir [2]. Kanser tedavisinde ise çoklu ilaç kombinasyonlarının, tek ilaçlı tedavilere olan üstünlüğü ilk kez 1960'lı yıllarda, akut lenfoblastik lösemi tanılı pediatrik hastaların metotreksat, 6-merkaptopürin, vinkristin ve prednizon kombinasyonu ile tedavi edilmesiyle keşfedilmiştir [3]. Bunu takiben, 1960-1970'li yıllarda, farklı etki mekanizmalarına sahip kemoterapötik ilaçların bir arada kullanıldığı çok sayıda yeni kombinasyon tedavi protokolü geliştirilmiştir. Kombinasyon tedavilerinin etkinliğine dair yapılan bu öncü çalışmalar, birçok kanser türünün tedavisinde uygulanabilecek tedavi rejimlerinin geliştirilmesinin önünü açmıştır. Her ne kadar birçok kanser türü için ilaç kombinasyonlarının kullanımı standart bir tedavi yöntemi olarak kabul edilse de protokollerde kullanılan ilaçların farmakokinetik özelliklerindeki farklılıklar, tümör bölgesinde uygun olmayan ve değişen ilaç konsantrasyonlarına neden olmakta, buna bağlı olarak da terapötik yanıt azalmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda kombinasyon tedavilerinin yerine farklı biyolojik yolları eş zamanlı olarak hedefleyebilen ve daha basit farmakokinetik profile sahip, çok hedefli ilaçların tasarımı ilgi görmeye başlamıştır. Çok hedefli ilaçlar, farmakokinetik açıdan avantajlarının yanı sıra, tedavi rejiminin sadeleşmesi ve sistemik toksisitenin azalmasını sağlaması nedeniyle de hasta uyuncunun artmasına katkı sağlamaktadır [4].

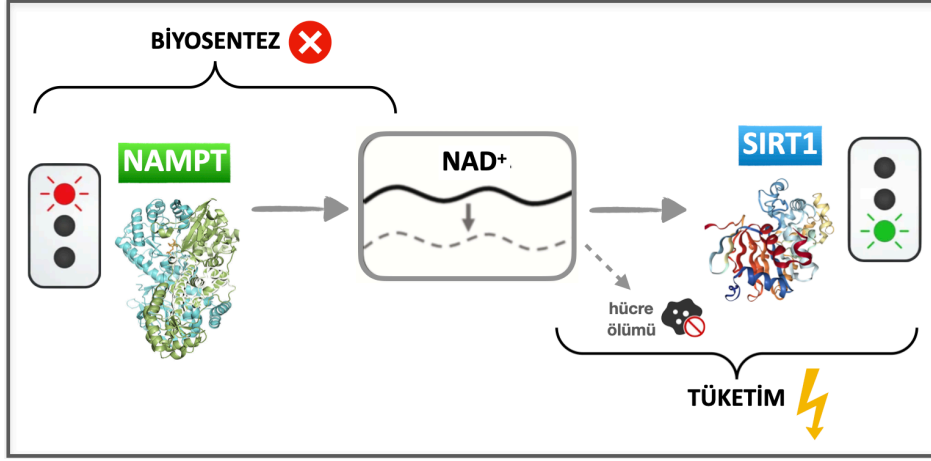
Kanser hastalığında özellikle tümör hücrelerinin büyümesi ve çoğalması için kritik öneme sahip yolların eş zamanlı hedeflenmesi, terapötik etkinliğin artırılması açısından önemli bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Bu yollar içerisinde enerji metabolizmasını düzenleyen nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+), hücre içinde gerçekleşen oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında önemli bir rol oynayan ve aynı zamanda enerji üretiminden sorumlu olan piridin nükleotit yapısında esansiyel bir koenzimdir [5]. Başta kanser olmak üzere pek çok hastalık durumunda düzenleyici olarak görev aldığı bilindiğinden, NAD^+ sentezini hedef alan stratejiler terapötik açıdan önem taşımaktadır [6]. NAD^+ , kanser hücrelerinde hızla çoğalmanın gerçekleşebilmesi için artan adenosin trifosfat (ATP) ihtiyacı ile NAD^+ -tüketen poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP), sirtuin (SIRT), CD38 gibi enzimlerin aktivitesinin artması sonucu hızlıca tüketilmektedir [6-9]. NAD^+ koenziminin hızlı tüketimi, kanser hücrelerini NAD^+ eksikliğine karşı normal hücrelere göre daha duyarlı hale getirmekte, bu durum NAD^+ seviyelerinin yeniden yükseltilmesini zorunlu kılmaktadır [7]. Hücresel NAD^+ sentezinin ana kaynağını, prekürsör olarak nikotinamidin (NAM) kullanıldığı yolak oluşturmakta olup; NAD^+ memeli hücrelerinde yalnızca bu yolakla değil, aynı zamanda triptofan amino asidinden *de novo* sentez yoluyla veya nikotinik asidin (NA) veya nikotinamid ribozidin (NR) gibi diğer prekürsörlerin kullanıldığı alternatif biyosentez yollarıyla da üretilmektedir [10].

NAD^+ sentez inhibitörleri aracılığıyla NAD^+ homeostazının bozulmasının, farklı mekanizmalar üzerinden antiproliferatif ve sitotoksik etkilere yol açtığı gösterilmiştir [11]. Kanser hücrelerinde NAD^+ yoksunluğunun etkileri, "NAMPT- NAD^+ -SIRT1 kaskadı" olarak da bilinen NAD^+ biyosentez ana yolağında hız sınırlayıcı enzim nikotinamid fosforiboziltransferazın (NAMPT) spesifik inhibitörleriyle, ayrıca bu inhibitörlerin antitümör etkilerini artıran kombinasyon stratejileri ile ortaya konmuştur [12-14]. İlk nesil tek hedefli NAMPT inhibitörleri olarak adlandırılan FK866, CHS-828 ve ön ilacı GMX-1777 insan klinik denemelere girmiş; ancak bu bileşiklerin neden olduğu trombositopeni gibi doz bağımlı toksisite ve çeşitli gastrointestinal yan etkiler sebebiyle klinik çalışmalarda ilerleme sağlanamamıştır [15-19]. Bu yan etkilerin yanı sıra NAMPT inhibitörlerinde gözlenen kardiyak ve retinal toksisite ile zayıf farmakokinetik profiller de daha güvenli ve etkili bileşiklere duyulan ihtiyacı artırmıştır. Bu doğrultuda geliştirilen yeni nesil NAMPT

inhibitörlerinden OT-82 ve KPT-9274, ikinci nesil bileşikler olarak insan klinik çalışmalarına dahil edilmiş olup, çalışmalar halen devam etmektedir [20-22].

Son yıllarda, keşfedilen NAMPT inhibitörlerinin, tek başlarına kanser hücrelerinde yeterli etkinlik gösterememesi, doz bağımlı toksisitesi ve olumsuz fizikokimyasal özellikleri; NAMPT enziminin yanı sıra başka hedeflere de etki edebilecek çok hedefli NAMPT inhibitörlerinin araştırılmasına yol açmıştır. Bildirilen çok hedefli NAMPT inhibisyonu stratejilerine ek olarak, NAMPT inhibitörü FK866 ile SIRT1 aktivatörü SRT3025'in kombine kullanımının insan IDH-mutant MGG123 glioma hücrelerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada, bileşiklerin birlikte uygulanmasının tek başına kullanıma kıyasla NAD^+ seviyelerini ve buna bağlı hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığı rapor edilmiştir [23]. Benzer şekilde, başka bir SIRT1 aktivatörünün (SRT1720) dual NAMPT/PAK4 inhibitörü KPT-9274 ile kombinasyonu kanser hücrelerinde sinerjik sitotoksik etki göstermiştir [24]. Bu nedenle, sadece NAMPT inhibisyonuna odaklanmak yerine, NAD^+ homeostazında rol oynayan veya antitümör etkiyi artırabilecek alternatif yolları da hedefleyen bileşiklerin tasarımı önem kazanmıştır [22, 25].

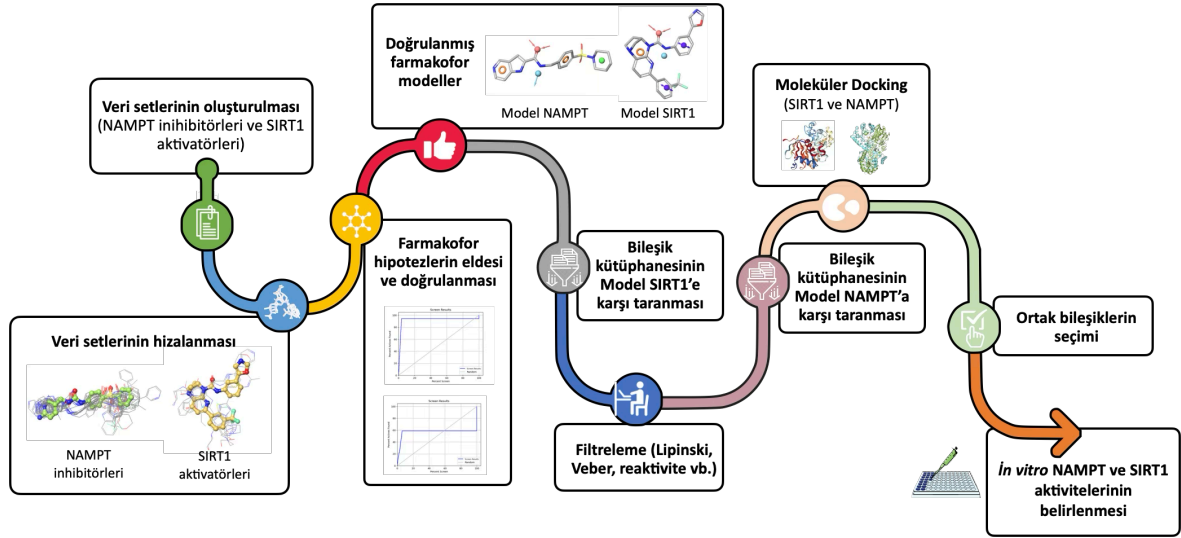
Bu bağlamda, tez çalışmamızda NAMPT- NAD^+ -SIRT1 kaskadı hedef alınarak, NAMPT enziminin yanı sıra bu kaskadın diğer bir ana bileşeni olan ve hücre ölümü, apoptoz, DNA onarımı gibi birçok hücresel faaliyetin düzenlenmesinde rol oynayan SIRT1 enzim [26, 27] aktivitesinin modüle edilmesine odaklanılmış; hücresel NAD^+ biyosentezi için kritik öneme sahip olan NAMPT enzimini inhibe ederken, enzim aktivitesini gerçekleştirmek için NAD^+ 'ı kosubstrat olarak kullanan SIRT1 enzimini aktive edebilecek dual etkili bileşiklerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu yaklaşım sayesinde, hücresel NAD^+ seviyelerinin daha etkin bir şekilde azaltılarak, NAD^+ eksikliğine duyarlı olan kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerinde daha güçlü bir etki sağlanabileceği öngörülmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Tez çalışmamız kapsamında hedeflenen dual etki yaklaşımı

Amaç ve hedeflerimiz doğrultusunda çalışmamızın ilk aşamasında, NAMPT inhibitörü ve SIRT1 aktivatörü olarak dual etki gösteren bileşiklere ulaşmak için bilinen inhibitör ve aktivatörlerden yola çıkarak oluşturulan farmakofor modeller ile aşağıda verilen iş akışına (Şekil 1.2) göre sıralı sanal tarama çalışması gerçekleştirilmiştir.

- Bilinen NAMPT inhibitör ve SIRT1 aktivatörlerin literatürden derlenerek veri setlerinin oluşturulması
- İnsan NAMPT ve SIRT1 X-ışını kristal yapılarında koligand olarak bulunan bileşiklere ait biyoaktif konformasyonlara göre veri setlerinin hizalanması
- Hizalı veri setleri ile her bir hedef için farmakofor hipotezlerin oluşturulması
- Hipotezlerin doğrulanması sonucu NAMPT ve SIRT1 için farmakofor modellerin elde edilmesi
- ZINC “drug-like” sanal kütüphanesinin SIRT1 farmakofor modeline karşı taranması ve filtrelenmesi
- Filtreleme basamağından geçen bileşiklerin NAMPT farmakofor modeline karşı taranması
- İkinci tarama sonucunda ulaşılan bileşiklerin SIRT1 ve NAMPT hedefleri kullanılarak moleküler docking çalışmalarının gerçekleştirilmesi ve her iki hedefle uygun şekilde etkileşen bileşiklerin belirlenerek satın alınması
- Satın alınan sanal tarama çıktısı bileşiklerin *in vitro* NAMPT ve SIRT1 enzim aktivitelerinin belirlenmesi

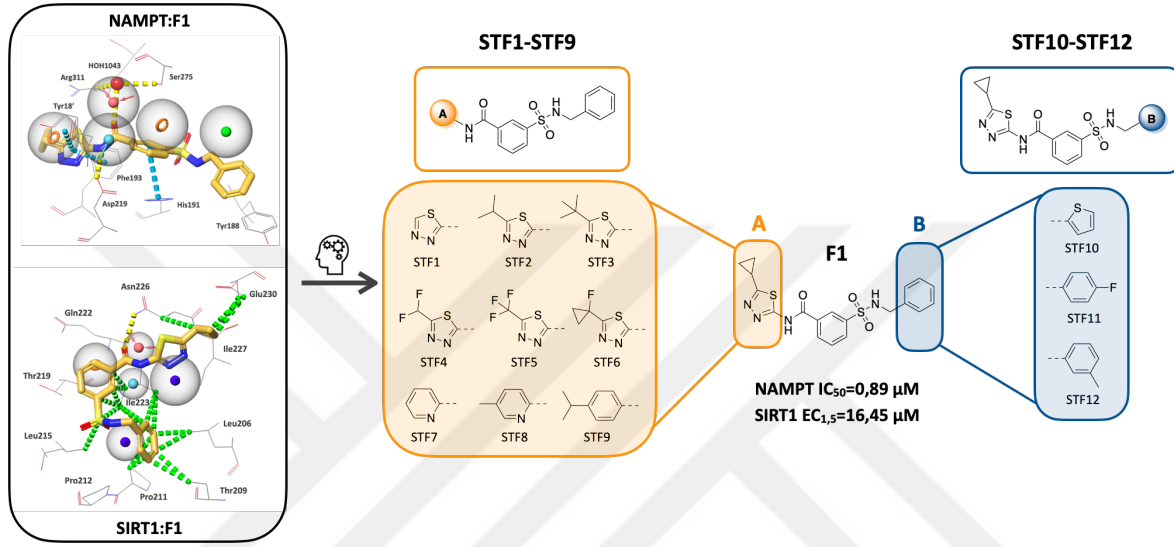


Şekil 1.2. Farmakofor temelli sıralı sanal tarama çalışması

Farmakofor temelli sıralı sanal tarama çalışması sonucu satın alınıp, *in vitro* NAMPT ve SIRT1 enzim aktiviteleri belirlenen dokuz bileşik (**F1-F9**) arasından **F1**, **F2**, **F3** ve **F5** kodlu bileşiklerin hem NAMPT inhibisyonu hem de SIRT1 aktivasyonu yaptığı tespit edilmiştir. Çalışmamızın ikinci aşamasında, güçlü NAMPT inhibisyonu ($IC_{50}=0,89 \mu M$) ve seçici SIRT1 aktivasyonu ($EC_{1,5}=16,45 \mu M$) sergilemesi nedeniyle **F1** kodlu bileşik optimizasyon çalışmaları için öncü bileşik olarak seçilmiş, daha etkili türevlere ulaşabilmek ve yapı-aktivite ilişkilerini oluşturmak amacıyla on iki adet 3-[*N*-(arilmetil)sülfamoil]-*N*-(aril)benzamid türevi bileşik (**STF1-STF12**) tasarlanmıştır (Şekil 1.3).

F1, **F2** ve **F5** kodlu bileşiklerde yer alan ve her iki hedef için de ortak farmakoforik özellikleri karşılayan 3-(*N*-metilsülfamoil)benzamid yapısı, tasarlanan bileşiklerde korunurken; Şekil 1.3'te A ve B olarak belirtilen yan gruplarda moleküler docking verilerine göre biyoizosterik değişikliklere gidilmiştir. **F1** öncü bileşiği, NAMPT aktivitesi için önemli olan NAMPT-Phe193 ve NAMPT-Tyr18' amino asitleriyle 1,3,4-tiyadiazol halkası üzerinden π - π etkileşimleri; bu halkaya bağlı siklopropil halkası üzerinden SIRT1 aktivasyonu için önemli olduğu bilinen SIRT1-Glu230 ile hidrofobik etkileşimleri meydana getirdiği gözlenmiştir. Burdan yola çıkarak; **F1** ile elde edilen π - π etkileşimlerin sürdürülebilmesi için **STF1-STF6** kodlu bileşiklerde; 1,3,4-tiyadiazol halkası korunurken, siklopropan halkası yerine farklı hidrofobik

gruplar getirilmiştir. **STF7-STF9** kodlu bileşiklerde ise; 1,3,4-tiyadiazol halkası, aynı π - π etkileşimleri sağlayabilecek fenil veya piridin halkalarıyla yer değiştirilmiştir. Öte yandan, **STF10-STF12** kodlu bileşiklerde **F1** yapısının sadece B bölgesinde değişikliklere gidilerek; fenil yerine tiyazol, *p*-florofenil ve *m*-metilfenil halkaları kullanılmış, böylece NAMPT-Tyr188 ile ek π - π etkileşimler hedeflenmiştir.



Şekil 1.3. F1 öncü bileşiğinden hareketle yeni türevlerin (STF1-STF12) tasarımı

Tasarlanan 3-[N-(arilmetil)sülfamoil]-N-(aril)benzamid türevi bileşiklerin (**STF1-STF12**) sentez ve yapı aydınlatma çalışmaları tamamlandıktan sonra, NAMPT ve SIRT1 enzimlerine karşı aktiviteleri *in vitro* olarak belirlenmiştir. Ardından, dual NAMPT inhibitörü ve SIRT1 aktivatörü olduğu tespit edilen **F1**, **F2**, **STF2** ve **STF6** kodlu bileşiklerin, insan Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanseri hücre hatlarında oluşturdukları antiproliferatif etkiler, insan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan) hücreleri ile karşılaştırmalı olarak incelenmiş; elde edilen bulgular, bu bileşiklerin hedef enzimler üzerindeki etkileri ile ilişkilendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

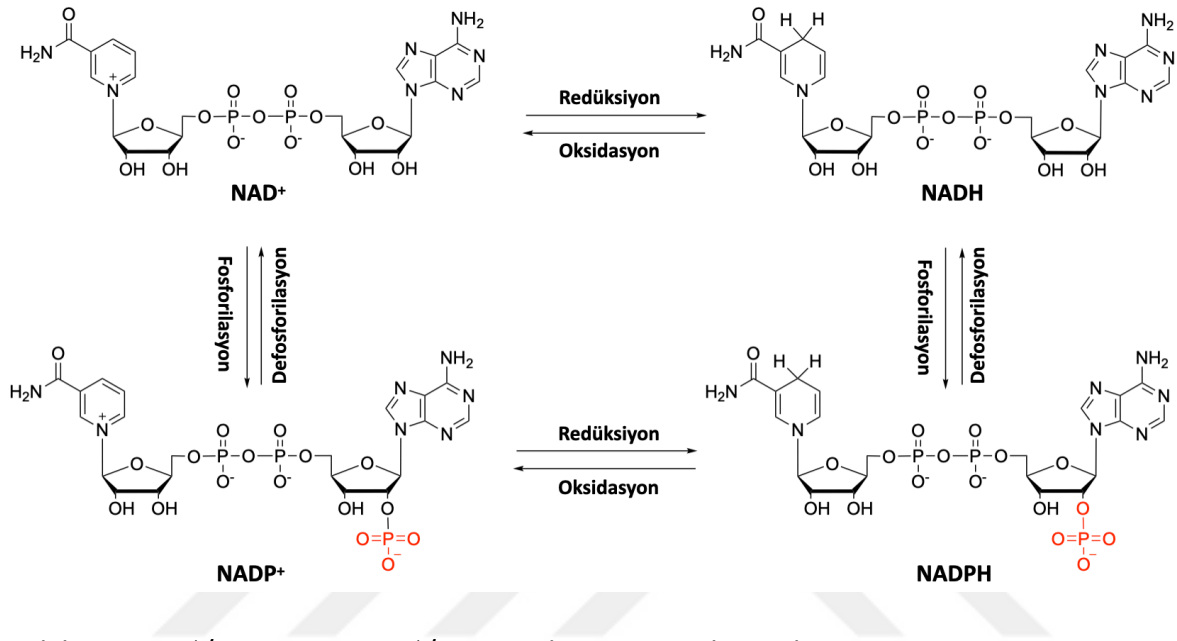
2.1. NAD⁺ Metabolizması ve Kanser

Kanser hücreleri, büyüme, hücre ölümü, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi hücrese faaliyetleri kontrol edebilmek için “kanserin ayırt edici özellikleri” olarak bilinen karakteristik özelliklere sahiptir [28]. Son on yılda, hücrese metabolik programlanma olarak adlandırılan kanser hücrelerinin büyümesi, hayatta kalması ve çoğalması için metabolik yolların yeniden düzenlenmesi yeni nesil bir özellik olarak tanımlanmıştır [29, 30]. Bu metabolik yollar içerisinde NAD⁺, glikoliz, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, oksidatif fosforilasyon, yağ asidi oksidasyonu ve serin biyosentezi gibi enerji üretimi ile ilgili birçok redoks reaksiyonunda önemli bir koenzim olarak görev almaktadır [5]. Bu reaksiyonlar sırasında hidrür anyonu alarak, indirgenmiş formu olan NADH’a dönüşmekte (Şekil 2.1); bu sayede mitokondriyal oksidatif fosforilasyon aracılığıyla ATP sentezi için hidrür donörü haline gelmektedir [31]. Ayrıca, NAD⁺/NADH redoks çifti, redoks dengesinde, yağ asidi ve nükleik asitlerin biyosentezinde görev alan fosforile NADP⁺/NADPH formlarına dönüşebilmektedir (Şekil 2.1) [32].

Enerji metabolizmasında önemli bir koenzim olan NAD⁺, aynı zamanda pek çok NAD⁺ bağımlı enzim için substrat görevi yaparak, özellikle SIRT, PARP, ADP-riboziltransferaz (ART), siklik ADP-riboz sentetaz (cADPRS), SARM1, CD38 ve CD157 gibi DNA tamiri, gen ekspresyonu, stres cevabı ve sinyal iletiminde rol oynayan enzimler için de gerekli olduğu bilinmektedir [33-38].

NAD⁺, enerji metabolizması, DNA tamiri, epigenetik modifikasyon, enflamasyon, sirkadiyen ritim ve stres direnci gibi birçok hücrese faaliyette yer almaktadır [31, 39, 40]. Bu nedenle, hücrese NAD⁺ seviyelerinde meydana gelen bozukluklar, kanser başta olmak üzere, metabolik hastalıklar, yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıkları içeren birçok patolojik durum ile ilişkilendirilmiştir [12, 32, 41, 42]. Kanser hücrelerinde artmış hücre metabolizması ve büyüme, transkripsiyon regülasyonu, sinyal iletimi, kromatin dinamiği,

DNA tamiri ve NAD^+ tüketen enzimlere ait aktivitenin artması, normal hücrelere nazaran NAD^+ 'ın hızlı bir şekilde tüketilmesine neden olmaktadır [43]. Kanser hücreleri bu ihtiyacı karşılamak amacıyla hücresel NAD^+ seviyelerini yeniden gerekli düzeye getirmesi gerekmektedir [4].

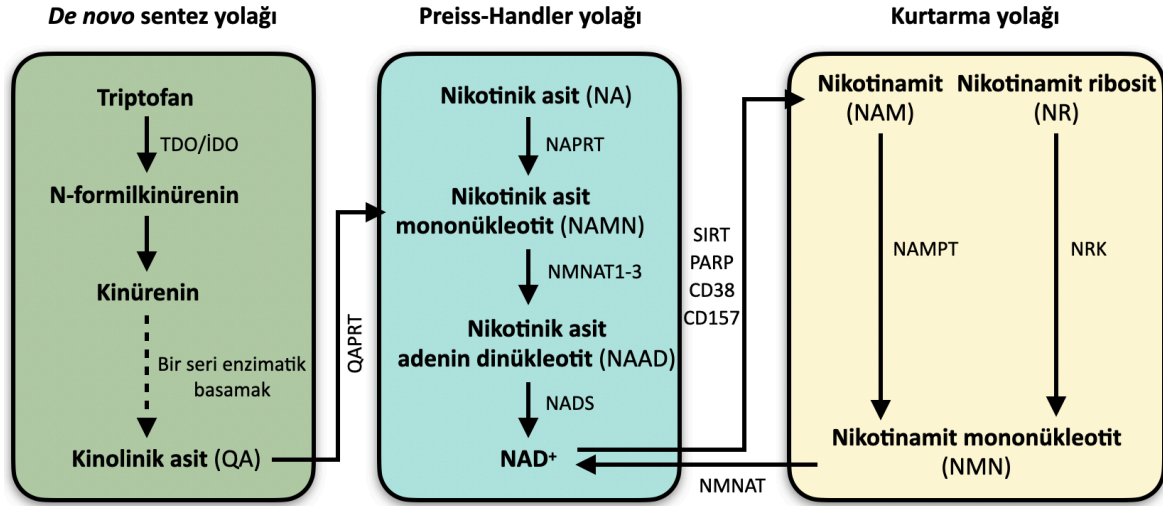


Şekil 2.1. NAD^+/NADH ve $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ dönüşüm reaksiyonları

Memeli hücrelerinde NAD^+ , *de novo* sentez yolağı, Preiss-Handler yolağı ve kurtarma yolağı olmak üzere üç ana biyosentetik yolak üzerinden sentezlenmektedir (Şekil 2.2) [44]. *De novo* sentez yolunun ilk aşamasında, diyet ile alınan triptofandan yola çıkılarak, triptofan-2,3-dioksijenaz (TDO) ve indolamin-2,3-dioksijenaz (IDO) enzimleri ile *N*-formilkinürenin sentezlenmektedir. Oluşan *N*-formilkinürenin, bir seri enzimatik reaksiyon ile kinolinik asite dönüşmekte ve bu ara üründen kinolinik asit fosforiboziltransferaz (QAPRT) enzimi ile nikotinik asit mononükleotit (NAMN) oluşturulmaktadır. Son aşamada, nikotinik asit/nikotinamid mononükleotit adeniltransferaz (NMNAT) ve nikotinamid adenin dinükleotit sentaz (NADS) enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonlar sonucu NAD^+ sentezi tamamlanmaktadır [31].

Preis-Handler yolağında, diyet ile alından nikotinik asit (NA), nikotinik asit fosforiboziltransferaz (NAPRT) enzimi tarafından 5-fosforibozil-1-pirofosfat (PRPP) aracılığıyla fosforibozilleştirilerek nikotinik asit mononükleotit (NAMN) sentezlenmektedir.

Ardından, NAMN, NMNAT tarafından adenillenerek nikotinik asit adenin dinükleotide (NAAD) dönüştürülmektedir. Son olarak, NAAD'ın NADS enziminin katalizlediği amidasyon reaksiyonu sonucu NAD^+ sentezi tamamlanmaktadır (Şekil 2.2) [31].

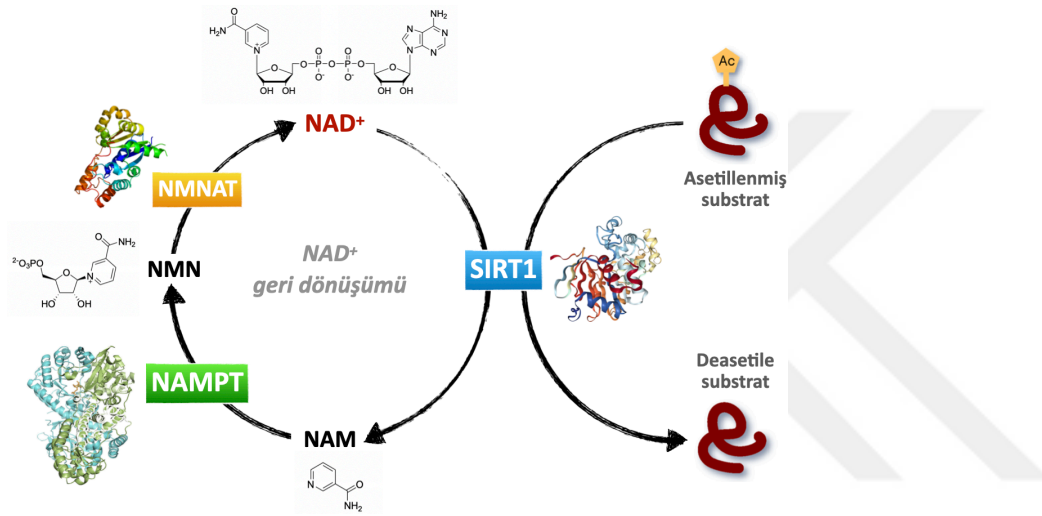


Şekil 2.2. NAD^+ biyosentez yolları

Nikotinamid ribozit (NR) ve nikotinamidin (NAM) prekürsör olarak kullanıldığı kurtarma yolağının ilk aşamasında, nikotinamid ribozit kinaz (NRK) veya nikotinamid fosforiboziltransferaz (NAMPT), PRPP'den NAM'a riboz grubunu transfer ederek nikotinamid mononükleotidi (NMN) oluşturmaktadır. Ardından NMN yapısı, NMNAT enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyon ile NAD^+ 'a dönüştürülmektedir [31]. Diğer yandan, SIRT1 gibi NAD^+ tüketen enzimlerin aktivitesi sonucunda NAM yeniden açığa çıkmakta ve böylece bu NAD^+ tüketen enzimler, NAD^+ biyosentezinin geri besleme fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3) [45].

Birçok kanser hücresi, triptofan- NAD^+ dönüşümünden sorumlu olan enzimlerin yetersiz ekspresyonu nedeniyle *de novo* sentez yolağını etkin şekilde kullanarak NAD^+ sentezleyememektedir [46]. Özellikle izositrat dehidrogenaz (IDH) mutasyonuna sahip glioma ve akut miyeloid lösemi gibi bazı kanser hücrelerinde, NAPRT ekspresyonunun eksikliği Preiss-Handler yolağının inaktif hale gelmesine yol açmaktadır [47, 48]. NAPRT ekspresyonu yeterli seviyede olan kanser hücrelerinde ise sistemik NA düzeyleri NAD^+

üretimi için yetersiz kaldığından, bu yol da etkin bir şekilde kullanılamamaktadır [49]. Dolayısıyla, bu tip kanser hücreleri, NAD^+ seviyelerini gerekli düzeyde tutabilmek için, NAMPT ve SIRT1 enzimlerinin yer aldığı ve “NAMPT- NAD^+ -SIRT1 kaskadı” olarak adlandırılan kurtarma yolağına bağımlı hale gelmektedir (Şekil 2.3) [46, 47]. Bu kaskadın hız sınırlayıcı basamağında görev alan NAMPT enzimi, NAM ile PRPP’nin kondenzasyonunu katalizleyerek NMN sentezini gerçekleştirirken; SIRT1 histon veya histon olmayan proteinlerin deasetilasyonu sırasında NAD^+ kullanarak NAM üretimini sağlamaktadır [50].



Şekil 2.3. NAMPT- NAD^+ -SIRT1 kaskadı

2.2. Nikotinamit Fosforiboziltransferaz (NAMPT)

İnsan NAMPT enzimi, tip II fosforiboziltransferaz sınıfına mensup, yaklaşık 55 kDa moleküler ağırlığında, 491 amino asit içeren dimerik yapıda bir enzimdir. NAMPT’nin enzimatik aktivitesi ilk defa 1957 yılında Preiss ve Handler tarafından bildirilmiştir [50]. Bakteriyel NAMPT’ı kodlayan *nadV* geni, ilk defa 2001 yılında *Haemophilus ducreyi*’den izole edilerek, bu gen ürününün, insan pre-B-hücre koloni artırıcı faktör (PBEF) ile homoloji gösterdiği belirlenmiştir [51]. Bu bulgulardan yola çıkılarak yapılan diğer çalışmalar, PBEF’in aslında NAMPT enzimi olduğu ortaya koymuştur [27].

2005 yılında yapılan tartışmalı bir çalışmada, NAMPT/PBEF, insan ve fare yağ dokusunda yüksek seviyede eksprese edilen bir adipokin olan visfatin olduğu öne sürülmüş; insülin

reseptörlerine bağlanarak insülin benzeri etkiler gösterdiği ve plazma glukoz seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir [52]. Bunun üzerine, NAMPT/PBEF/visfatinin obezite ve diyabet gibi birçok metabolik hastalıklardaki potansiyel rolleri araştırılmış; ancak elde edilen bulgular arasındaki tutarsızlıklar, bu ilişkinin yeniden değerlendirilmesi gerektiğini göstermiştir.

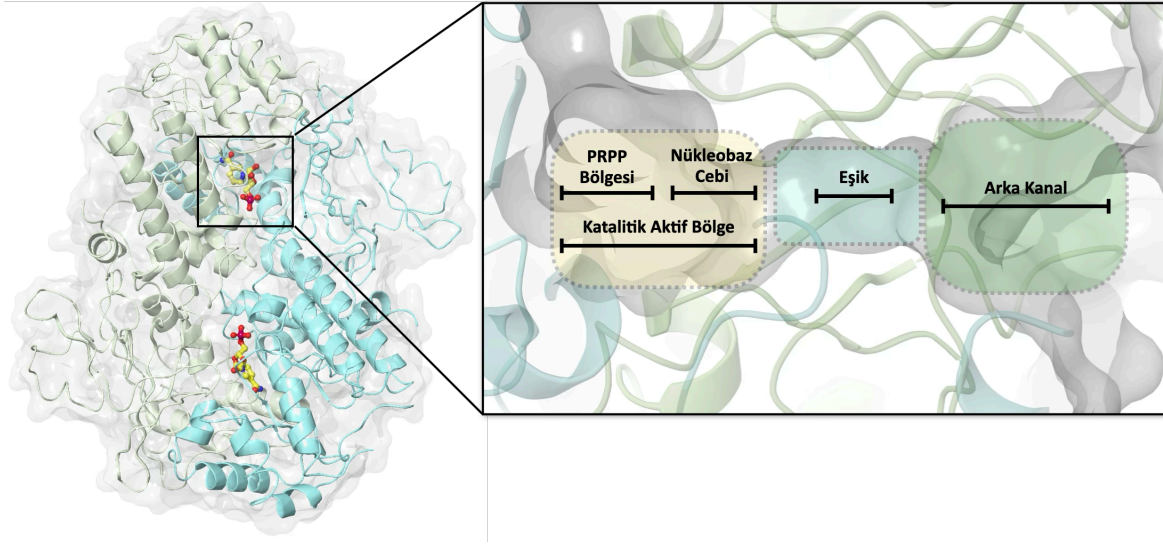
NAMPT'ın farklı patofizyolojik durumlarda çoklu fonksiyona sahip olması nedeniyle, PBEF ve visfatin olarak da adlandırılmıştır. Ancak, isimlendirme karmaşasını önlemek amacıyla, bu protein ve genin resmi adının NAMPT olmasına HUGO Gen Nomenklatür Komitesi (HGNC) ve Fare Genomik Nomenklatür Komitesi (MGNC) tarafından karar verilmiştir [53].

NAMPT, memelilerde intraselüler (iNAMPT) ve ekstraselüler (eNAMPT) olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. Hücre içinde sitoplazma, çekirdek ve mitokondride lokalize olan iNAMPT, başta kemik iliği, karaciğer ve kas dokuları olmak üzere tüm dokularda eksprese edilmekte ve NAD^+ biyosentezinde görev alarak hücrelerin enerji ihtiyacının karşılanmasına katkı sağlamaktadır [54, 55]. Ayrıca iNAMPT, kanser başta olmak üzere çeşitli immün, nörodejeneratif ve metabolik hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır [56, 57]. Plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunan eNAMPT ise, çoğunlukla adipositler, makrofajlar, lenfositler, endotelial hücreler ve çeşitli kanser hücreleri tarafından salınmakta olup, beyin ve kan gibi birçok dokuda dağılım göstermektedir [58]. Enflamasyon durumlarında artan ve immün sistemin düzenlenmesinde görev alan eNAMPT, diyabet, ateroskleroz, obezite gibi metabolik hastalıklar, karaciğer fibrozu ve kanser ile ilişkilendirilmiştir [53, 59, 60]. eNAMPT'ın bu hastalıklara aracılık eden etkilerinin enzimatik bir aktivite sonucunda mı yoksa bir reseptöre bağlanmasıyla mı meydana geldiği ise halen tartışmalıdır. Her ne kadar eNAMPT'ın enzimatik aktivitesine dair bazı bulgular mevcut olsa da, NMN plazma seviyesinin oldukça düşük olması, bu etkilerin büyük olasılıkla reseptör aracılı mekanizmalarla ortaya çıktığını düşündürmektedir [61]. Yapılan çalışmalarda, eNAMPT'ın C-C kemokin reseptör tipi 5 (CCR5) ve toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) olmak üzere iki farklı reseptöre bağlanabileceği bildirilmiştir. eNAMPT ile CCR5 arasında fiziksel bir etkileşim saptanmış ve CCR5 antagonisti maravirok gibi, makrofajlarda HIV enfeksiyonunu engellediği gösterilmiştir [62]. Bunu izleyen başka bir çalışmada ise,

eNAMPT'ın sinyal iletiminde görevli TLR4 reseptörüne bağlanarak onu aktive eden miyeloid farklılaşma faktörü 2 (MD-2) proteini taklit ettiği ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) aracılı akciğer enflamasyonuna yol açtığı bildirilmiştir [63]. Ancak, TLR4 veya CCR5 reseptörlerinin eNAMPT'ın etkilerine doğrudan aracılık ettiğini net bir şekilde söyleyebilmek için bu bulguların daha fazla sayıda farklı çalışmayla doğrulanması gerekmektedir.

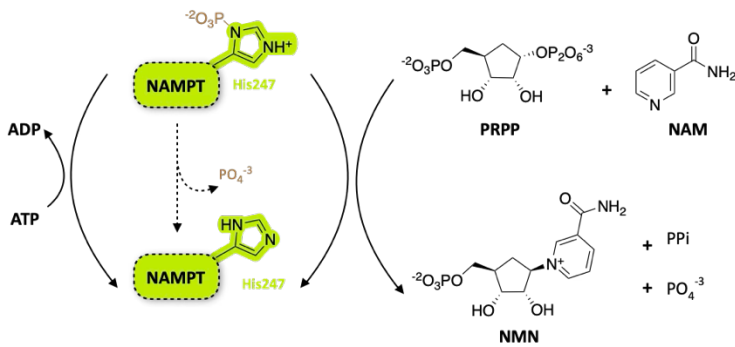
NAMPT enziminin birçok hastalıkla ilişkili olması nedeniyle, bu enzimin üç boyutlu yapısı ve enzimatik mekanizmasının aydınlatılması üzerine kapsamlı araştırmalar gerçekleştirilmiştir [64-68]. İnsan NAMPT enzimin aktif bölgesi ve katalitik mekanizmasını anlamak amacıyla, NMN (PDB: 2GVG) ve NAMPT inhibitörü FK866 (PDB: 2GVJ) bağlı komplekslerinin X-ışını kristal yapıları ilk defa 2006 yılında çözümlenmiştir. Aynı çalışmada, diğer fosforiboziltransferazlar ile kayda değer bir amino asit dizilimine sahip olmamasına rağmen, *Thermoplasma acidophilum* kaynaklı NAPRT ve *Mycobacterium tuberculosis* kaynaklı QAPRT ile yapısal benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir [69].

Yaklaşık 4000 Å yüzey alanına sahip dimerik yapı sergileyen insan NAMPT enzimi, her bir monomerinde hem içsel stabilizeyi sağlayan hem de fonksiyonel konformasyonun korunmasına katkıda bulunan yirmi iki β -iplik ve on beş α -sarmal içermektedir. Enzimin yapısında, N- ve C-terminal amino asitlerin farklı bölgelerde yer aldığı, karmaşık bir katlanma düzeni gözlemlenmektedir [64]. Dimerik ara yüzünde iki aktif bölge bulunmaktadır ve bu dimerizasyon katalitik aktivite için zorunludur. Polar ve hidrofobik amino asitlerden oluşan bu dimerik ara yüzeyde, yaklaşık 15x6 Å boyutlarında uzun ve dar bir tünel yer almaktadır [70]. Bu tünel, ara yüz boyunca "arka kanal" olarak adlandırılan huni şeklinde bir açıklığa uzanmaktadır. Tünelin giriş kısmında yer alan PRPP bağlanma bölgesi ile NAM'ın yerleştiği nükleobaz cebi, birlikte katalitik aktif bölgeyi oluşturmaktadır. Aktif bölge, "eşik" adı verilen dar bir tünel aracılığıyla, hidrofobik amino asitlerden oluşan arka kanala bağlanmaktadır (Şekil 2.4) [71].



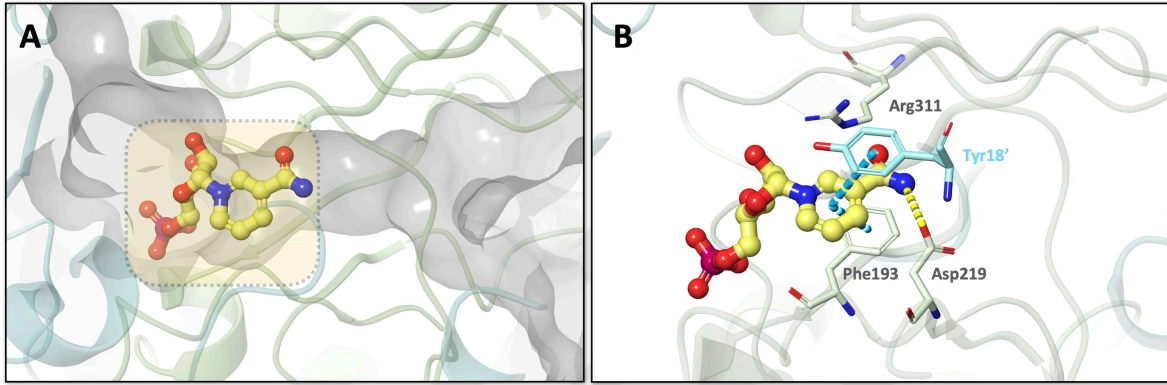
Şekil 2.4. İnsan NAMPT aktif bölgesi (PDB: 2GVG). A zinciri yeşil, B zinciri turkuaz ve NMN sarı renk ile gösterilmiştir.

Enzimatik aktivite sırasında, katalitik aktif bölgede yer alan PRPP bağlanma bölgesindeki His247 amino asidinin ATP aracılığıyla fosforilasyonu, bu bölgeye PRPP'nin bağlanmasını mümkün kılmakta ve oluşan enzim-PRPP kompleksinin daha stabil olmasını sağlamaktadır. Bu fosforilasyonla birlikte, enzimin, substratı olan NAM'a olan afinitesi yaklaşık 160 000 kat artarak belirgin bir katalitik aktivasyon meydana gelmektedir [72]. Bu aktivasyonun ardından, nükleobaz cebine yerleşen NAM'a PRPP'den fosforibozil transferi gerçekleşmekte, bu bölgede NMN sentezlenmektedir (Şekil 2.5) [71].



Şekil 2.5. NAMPT kataliziyle NAM'dan NMN oluşumu

İnsan NAMPT X-ışını kristal yapısı (PDB: 2GVG) incelendiğinde, oluşan NMN molekülünün, aktif bölgede piridin halkası üzerinden Tyr18' ve Phe193 amino asitleri ile π - π etkileşimleri kurarak nükleobaz cebine yerleştiği görülmektedir. Ayrıca, NMN yapısındaki amit karbonili Arg311 amino asidine doğru yöneldiği ve bu sırada Asp219 yan zinciri ile hidrojen bağı meydana getirdiği belirlenmiştir. NMN'nin riboz ve fosfat grupları ise, yüksek derecede hidrofobik özellik sergileyen PRPP bağlanma bölgesine doğru uzanmaktadır (Şekil 2.6) [69].



Şekil 2.6. (A) NMN'nin insan NAMPT aktif bölgesinde (PDB: 2GVG) yerleştiği bölge; (B) NAMPT-NMN etkileşimleri. A zinciri yeşil, B zinciri turkuaz ve NMN sarı renk ile, hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

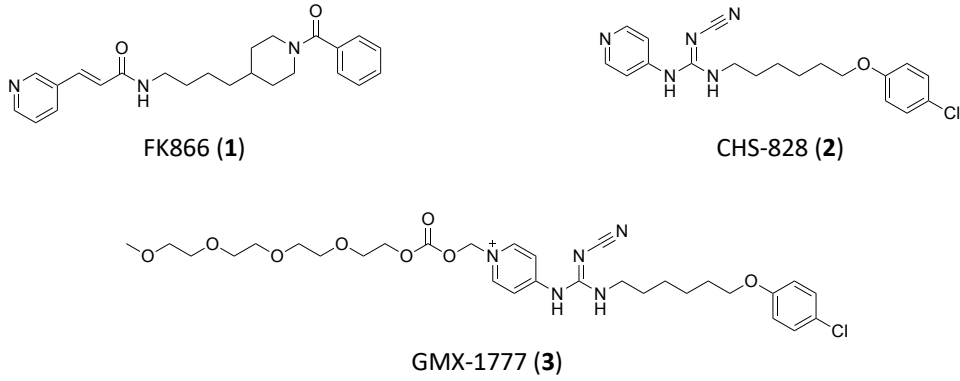
2.3. Tek Hedefli NAMPT İnhibitörleri

Enerji gerektiren hücresel faaliyetlerin gerçekleşmesinde önemli bir rolü olan NAD⁺'ın sentezini sağlayan NAMPT enzimi, kanser başta olmak üzere, diyabet, obezite ve enflamasyon gibi bir çok patofizyolojik süreçler ile ilişkilendirilmiştir [53]. Birçok çalışma NAMPT ekspresyonunun artışı, kolorektal, kolon, mide, meme, over ve tiroit kanserleri, pankreatik duktal adenokarsinoma, glioma, melanoma, sarkoma, lösemi ve lenfoma gibi çeşitli kanser tiplerinde artmış tümörjenik özellikler ile ilişkilendirilmiştir [73-84]. Ayrıca NAMPT'in aşırı ekspresyonunun paklitaksel, adriamisin, fluorourasil ve etoposid gibi kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarına karşı direnci arttırdığı bildirilmiştir [85].

Yapılan çalışmalarda NAMPT inhibisyonunun kanser hücrelerinde hücre büyümesi, koloni dönüşümü ve hücre göçünü baskılaması nedeniyle bu hücrelerde otofaji ve hücre ölümüne

neden olduğu gösterilmiştir [75, 86]. Özellikle IDH1/2-mutant glioblastoma, kondrosarkoma ve mide kanseri hücrelerinin diğer kanser türlerine nazaran NAMPT inhibisyonuna karşı daha duyarlı olduğu bilinmektedir [48, 87]. Bunun yanı sıra kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların duyarlılığını arttırması nedeniyle NAMPT inhibisyonu sağlanması kanser tedavisi için umut vadeci bir strateji olarak değerlendirilmiş ve günümüze kadar birçok NAMPT inhibitörü bildirilmiştir [80, 88, 89].

NAMPT inhibitörlerinin keşfine yönelik ilk çalışmalar 1972 yılında başlasa da insan NAMPT enzim mekanizmasının ve üç boyutlu yapısının aydınlatılamaması gibi nedenlerden dolayı 2000'li yıllara kadar kayda değer bir NAMPT inhibitörüne ulaşılamamıştır. İlk NAMPT inhibitörü FK866 (**1**) (NAMPT $IC_{50}=3$ nM) 2002 yılında keşfedilmiş, hücrel NAD⁺ seviyelerini azaltması sonucunda çeşitli kanser türlerinde apoptotik hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir [16, 90]. İlk kez 2006 yılında, insan NAMPT enziminin X-ışını kristal yapısı, FK866 ile kompleks halinde çözümlenerek, FK866'nın NAMPT enzimin her iki monomerinde de yer alan NAM'ın bağlanma bölgesi de olan nükleobaz cebine ve bu cepten uzanan tünel şeklindeki aktif bölgeye yerleştiği gözlenmiştir. Bu çalışmada FK866'nın aktif bölgede yer alan amino asitler ile olan etkileşimleri de belirlenerek, NAMPT inhibisyonunda etkili olabilecek yapısal gerekliliklerin anlaşılması sağlanmış ve bu bilgiler yeni NAMPT inhibitörlerinin keşfi için önemli bir temel oluşturmuştur [69]. Piridil siyanoguanidin yapısındaki CHS-828 (**2**) (NAMPT $IC_{50} < 25$ nM) ise, meme ve akciğer kanserine karşı antitümör etkileri ile ilk kez 1997 yılında bildirilmesine rağmen, kanser hücrelerini NAMPT inhibisyonu üzerinden öldürdüğü ancak 2008 yılında ortaya koyulmuştur [91]. 2005 yılında da, CHS-828'in farmakokinetik profilini geliştirmek amacıyla ön ilacı olan GMX-1777 (**3**) geliştirilmiştir (Şekil 2.7) [17].

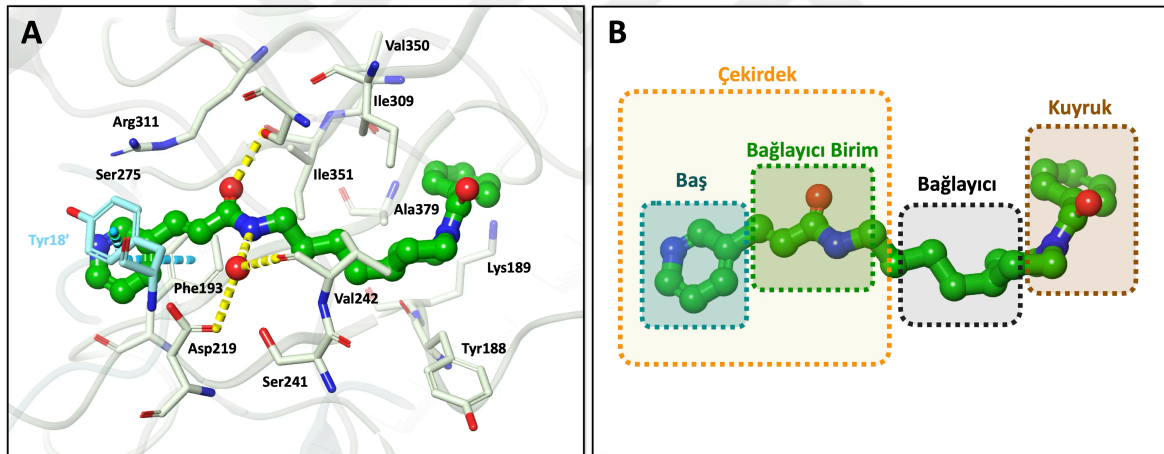


Şekil 2.7. Klinik denemelere giren birinci nesil NAMPT inhibitörleri

Birinci nesil NAMPT inhibitörleri olarak bilinen FK866, CHS-828 ve GMX-1777 için, klinik öncesi çalışmalarda birçok kanser türünün tedavisinde umut vadeci sonuçlar elde edilmiştir [16, 69, 91, 92]. FK866, B-kronik lenfositik lösemi (NCT00435084), melanoma (NCT00432107) ve kutanöz T-hücreli lenfoma (NCT00431912) gibi kanser türleri için, CHS-828 ve ön ilaç formu GMX-1777 ise katı tümörler (NCT00003979), lenfoma (NCT00457574) ve metastatik melanoma (NCT00724841) için Faz I/II klinik denemelerinde bulunmuştur. Fakat, trombositopeni, lenfopeni ve diyare gibi doz sınırlayıcı toksisiteler ile sınırlı antitümör etkinlik ve yetersiz farmakokinetik özellikler, klinik çalışmalarda ilerlemeyi engellemiştir [15, 19, 85, 91]. Bu durum, daha sonraki yıllarda NAMPT enziminin kanser üzerindeki etkisinin tam olarak anlaşılamamış olmasıyla; dolayısıyla uygun olmayan hasta grubu ve endikasyonların seçilmesiyle ilişkilendirilmiştir [22].

Klinik çalışmalarda karşılaşılan sorunlar nedeniyle, toksisite göstermeyen, iyi farmakokinetik özelliklere ve güçlü antitümör etkinliğe sahip yeni NAMPT inhibitörlerinin keşfine yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiş ve ikinci nesil NAMPT inhibitörlerine ulaşılmıştır [14, 58, 65, 66, 93, 94]. Bu doğrultuda, FK866 ve CHS-828'in yapısal ve farmakolojik ortak özellikleri, FK866'nın NAMPT aktif bölgesindeki amino asitlerle kurduğu etkileşimler ve her iki bileşiğin paylaştığı farmakoforik özellikler temel alınmıştır [14, 22]. Çoğu NAMPT inhibitörü, Şekil 2.8'de FK866 üzerinde gösterilen farmakoforik özellikleri taşımaktadır; (i) baş grubu ve bir bağlayıcı birimden oluşan NAM benzeri çekirdek grup, (ii) çekirdek grup ile kuyruk kısmını bağlayan bir bağlayıcı, (iii) kuyruk grubu [14, 65, 66, 93]. Genellikle piridin benzeri aromatik veya heteroaromatik özellikteki baş grubu, NAM'ın da bağlandığı nükleobaz cebinde yer alan Tyr18' ve Phe193 ile π - π etkileşimleri

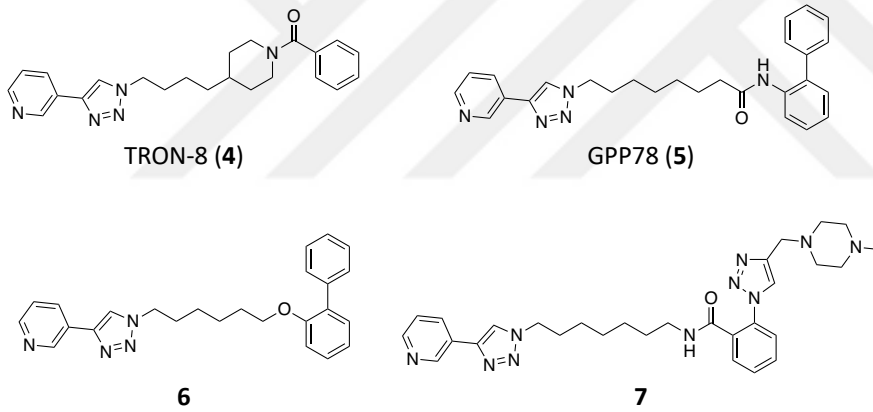
oluşturabilirken, bağlayıcı birim (amit, üre veya siyanoguanidin), bu cepte ve eşik bölgesinde yer alan Ser275, Asp219, Ser241 ve Val242 amino asitleri ile doğrudan veya su-aracılı hidrojen bağları oluşturabilmektedir (Şekil 2.8). Bu etkileşimlerin ayrıca NAMPT inhibisyonu için kritik olduğu da bildirilmiştir [14, 65, 66, 93]. Aromatik halka veya bir alkil zinciri taşıyan hidrofobik karakterdeki bağlayıcı grup ise eşik bölgesinde yer alan Val242, Ile309 ve Ile351 gibi hidrofobik amino asitlerle etkileşerek kuyruk grubunun arka kanala uzanmasını sağlamaktadır. Kuyruk grubu, hidrofobik özellikteki arka kanalda yer alan Tyr188, Lys189, Arg196, Ile309, Val350 ve Ala379 gibi amino asitlerle hidrojen bağları veya hidrofobik etkileşimler meydana getirmektedir (Şekil 2.9). NAMPT inhibitörleri için bağlayıcı grubun uzunluğu ve geometrisi önemli olmakla birlikte, arka kanala yerleşen kuyruk grubu üzerinde yapılan değişiklikler sonucunda bileşiklerin suda çözünürlük, permeabilite gibi fizikokimyasal özellikleri değiştirilerek, ADME özellikleri iyileştirilmiştir [95].



Şekil 2.8. (A) FK866'nın insan NAMPT aktif bölgesindeki (PDB: 2GVJ) biyoaktif konformasyonu; (B) NAMPT inhibitörlerinin farmakoforik özelliklerinin FK866'nın biyoaktif konformasyonu üzerinde gösterimi. A zinciri yeşil, B zinciri turkuaz ve FK866 yeşil renk ile, hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

2008 yılında Galli ve arkadaşları tarafından, FK866 yapısında bağlayıcı birim olan amit fonksiyonel grubu yerine klasik olmayan biyoizosteri 1,4-disübütü triazol halkasını taşıyan TRON-8 (**4**) bildirilmiştir [96]. Takip eden yıllarda ise, triazol içeren yeni bir FK866 analogu olan GPP78 (**5**) (NAMPT IC_{50} =10,2 nM) geliştirilmiştir. GPP78, FK866 ve CHS-828 ile insan

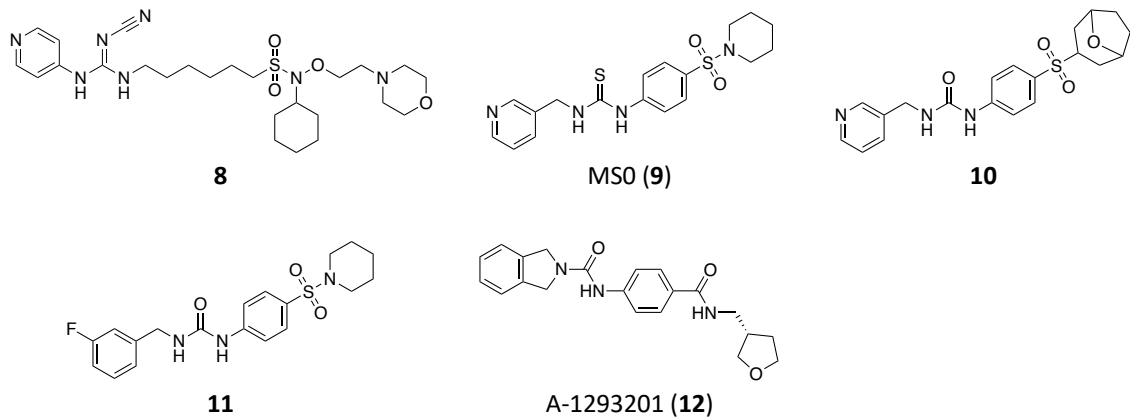
SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerinde benzer etki profiline sahip olmasına rağmen, düşük suda çözünürlük ve yetersiz *in vitro* metabolik stabilite özellikleri sergilemiştir. Bu nedenle, metabolik stabilitesi daha yüksek olan ve eter köprüsü taşıyan bir analogu, Bileşik 6 (NAMPT IC_{50} =3,8 nM) tasarlanmıştır [97]. Aynı çalışma grubu, 2019 yılında eNAMPT'ın fizyopatolojik koşullardaki rolünü daha iyi anlayabilmek amacıyla, eNAMPT'a karşı selektif inhibitörler geliştirmeyi hedeflemiş ve bu doğrultuda, GPP78 temel alınarak protonize olabilen ve plazma membranını geçemeyen bir seri bileşik tasarlanmıştır. Bu seride, özellikle Bileşik 7, güçlü bir NAMPT enzim inhibisyonu (IC_{50} =41,8 nM) sağlamasına rağmen, plazma membranını geçemediği için insan SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerinde etkinliğinin sınırlı kaldığı (IC_{50} >10 μ M) bildirilmiştir [98]. Ancak, plazma membranını geçemeyen bileşiklerin eNAMPT üzerinde daha seçici olacağı hipotezinin desteklenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. TRON-8 (4), GPP78 (5), Bileşik 6 ve 7'nin kimyasal yapıları

2013 yılında Christensen ve arkadaşları, FK866 ve CHS-828 bileşiklerinden yola çıkarak yeni NAMPT inhibitörleri tasarlamışlar. Bu kapsamda geliştirilen Bileşik 8, insan A2780 over kanseri (IC_{50} =0,025 nM) ve MCF-7 meme kanseri (IC_{50} =0,33 nM) hücre hatlarında, FK866 (A2780 IC_{50} =1,6 nM; MCF-7 IC_{50} =7,4 nM) ve CHS-828'e (A2780 IC_{50} =0,56 nM; MCF-7 IC_{50} =1,6 nM) kıyasla belirgin derecede daha güçlü antiproliferatif etki göstermiştir. Ayrıca, *in vivo* A2780 ksenograft fare modelinde 3 mg/kg dozda günde iki kere uygulandığında, tümör hacminde yaklaşık 1/5 oranında azalma sağlandığı bildirilmiştir (Şekil 2.10) [99].

2013 yılında Zheng ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, farmakofor temelli bir sanal tarama çalışması gerçekleştirilmiş ve tiyoüre yapısında MSO (**9**) (NAMPT IC_{50} =7 nM; A2780 IC_{50} =190 nM) isimli lider bileşiğe ulaşılmıştır. Bu bileşik üzerinde gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda, *in vivo* antitümör etkinliği yüksek Bileşik **10**'a (NAMPT IC_{50} =7 nM; A2780 IC_{50} =32 nM) ulaşılmıştır (Şekil 2.10). Daha önce yapılan çalışmalarda, NAMPT inhibitörlerinin azot atomu taşıyan baş grubunun fosforilasyon için bir substrat niteliği taşıdığı ve NAMPT katalizli PRPP katım ürünü oluşturabildiği ortaya konmuştur [18]. Zheng ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, Bileşik **11** (NAMPT IC_{50} =30 nM; A2780 IC_{50} >10 μ M) *in vitro* NAMPT enzim aktivitesi üzerinde etkili olurken insan A2780 over hücrelerinde belirgin bir aktivite kaybı göstermiştir [65]. Aynı çalışmada azot atomu taşımayan Bileşik **11**'in hücre içinde NAMPT katalizli PRPP ile katım ürünü oluşturmadığı ve azot atomu taşıyan Bileşik **10**'un PRPP katım ürünü oluşturabildiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, NAMPT inhibitörlerinin fosforile katım ürünü oluşturmamasının hücresel anti-NAMPT aktivitesi için gerekli olabileceği öne sürülmüştür. Bu doğrultuda, katım ürünü oluşumunun hücresel aktivite için tek başına yeterli olmadığı ve hücresel aktiviteye etki eden başka faktörlerin de rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca, 2017 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, izoindol türevi A-1293201 (**12**) kodlu bileşik üzerinden yapılan değerlendirmelerde, bazı NAMPT inhibitörlerinin PRPP ile katım ürünü oluşturmaksızın da hem *in vitro* hücresel aktiviteyi hem de *in vivo* antitümör etkinliği sürdürebildiği gösterilmiştir (Şekil 2.10) [100].

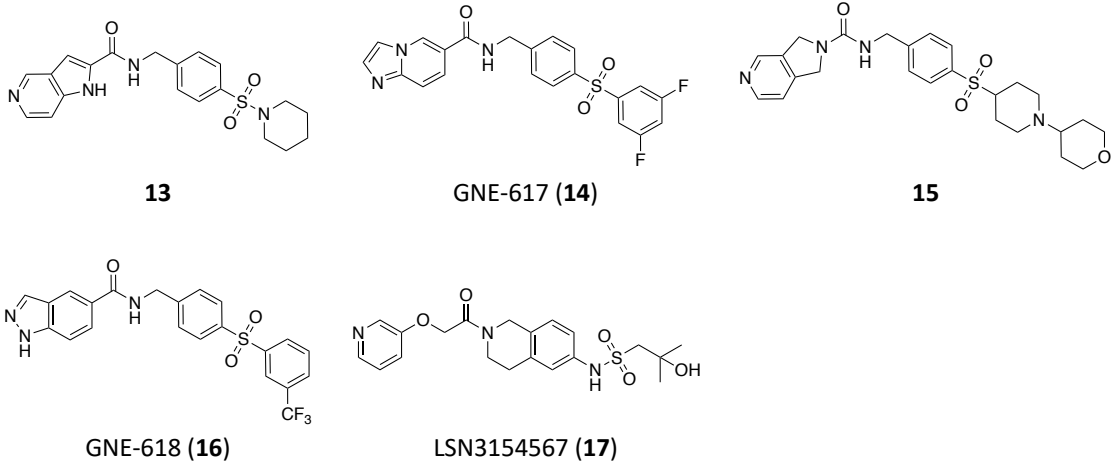


Şekil 2.10. Bileşik 8, MSO (**9**), Bileşik 10, 11 ve A-1293201'nin (**12**) kimyasal yapıları

Diğer bir çalışmada üre türevi bileşiklerin NAMPT aktif bölgesinde Asp219 ve Ser241 amino asitleri ile hidrojen bağı kurmaması üzerine, bileşiklerdeki piridil baş grubu azaindol halkası ile, üre grubu ise amit grubu ile değiştirilmiş, böylece doğrudan hidrojen bağı yapabilen Bileşik **13**'e (NAMPT IC₅₀=9 nM; A2780 IC₅₀=10 nM) ulaşılmıştır [66]. Bu bileşik üzerinde yapılan yapı-aktivite çalışmaları sonucunda, *in vitro* ADME özellikleri iyileştirilmiş imidazolopiridin türevi GNE-617 (**14**) (NAMPT IC₅₀=5 nM; A2780 IC₅₀=2 nM) elde edilmiştir. Aynı çalışma grubu, amit ve üre türevi bileşiklerin sudaki çözünürlük problemini aşmak amacıyla, 2,3-dihidro-1*H*-pirolo[3,4-*c*]piridin yapısında ve sudaki çözünürlüğü yüksek olan üre türevi Bileşik **15**'i (NAMPT IC₅₀=10 nM; A2780 IC₅₀=7 nM) elde etmiştir (Şekil 2.11) [101].

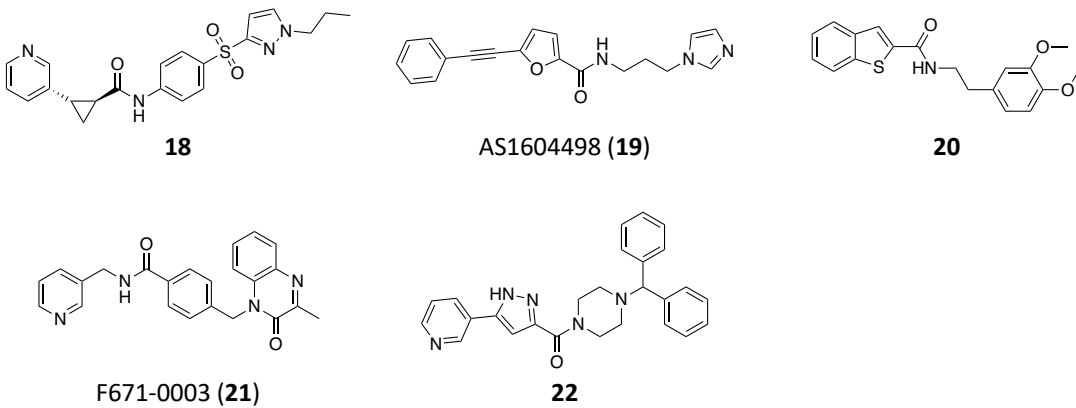
FK866'nın klinik öncesi çalışmaları sırasında maymunlarda gözlenmemesine karşın, farelerde hematolojik yan etkilerin yanında retinal atrofi de rapor edilmiştir. Ayrıca, NMNAT mutasyonunun insanlarda retinal hasara yol açtığı bildirilmiştir [102]. Benzer toksisiteler diğer NAMPT inhibitörleri için de rapor edilmiştir [103, 104]. NAMPT inhibitörlerinde gözlenen trombositopeni, NA desteği ile kayda değer ölçüde azaltılmış olmasına rağmen, retinal toksisitede herhangi bir azalma gözlenmemiştir [103-106]. Bu nedenle, araştırmacılar retinal penetrasyonu ve/veya tutulumu daha düşük olan NAMPT inhibitörlerine ulaşmak amacıyla fizikokimyasal özelliklere dayalı yöntemlerle yeni bileşikler tasarlamışlardır. Zhen ve arkadaşları, protonize olabilen bazik merkez taşıyan bileşiklerin, retinal tutulumuna katkı verdiğini göz önünde bulundurarak, daha az bazik indazol türevi NAMPT inhibitörleri tasarlamışlardır [67]. Bu çalışmada elde edilen 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin türevi GNE-618 (**16**) bileşiğinin (Şekil 2.11) (NAMPT IC₅₀=6,1 nM; A2780 IC₅₀=4,3 nM), imidazolopiridin türevlerine kıyasla retinal toksisitesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir [63].

Diğer bir çalışmada ise, farmakofor temelli sanal tarama sonucunda ulaşılan NAMPT inhibitörlerinin hematolojik ve retinal toksisite gösterdiği belirlenmiştir. Retina bariyerine geçişi önlemek ve buna bağlı oluşan retinal toksisiteyi azaltmak amacıyla permeabilitenin düşürülmesi ve polaritenin artırılması yoluyla, selektif, etkili ve oral aktif LSN3154567 (**17**) bileşiğine (Şekil 2.11) ulaşılmıştır. LSN3154567'nin (NAMPT IC₅₀=3,1 nM) *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kanser hücreleri üzerine yüksek antiproliferatif özellik gösterirken, retinal hücrelerde toksisite oluşturmadığı bildirilmiştir [107].



Şekil 2.11. Bileşik 13, GNE-617 (14), Bileşik 15, GNE-618 (16) ve LSN3154567'nin (17) kimyasal yapıları

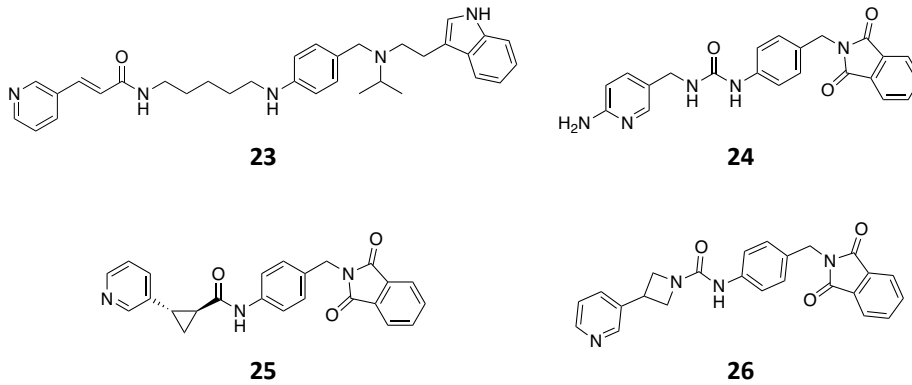
2014-2016 yılları arasında, bildirilen NAMPT inhibitörlerinden farklı yapısal özelliklere sahip bileşikler keşfedebilmek amacıyla fragman temelli tarama, yüksek çıktılı tarama (HTS) ve sanal tarama gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda; *trans*-2-(piridin-3-il)siklopropan karboksamit yapısında Bileşik **18** (NAMPT IC₅₀=5,1 nM), AS1604498 (**19**) (NAMPT IC₅₀=44 nM), benzotiyofen türevi Bileşik **20** (NAMPT IC₅₀=150 nM), F671-0003 (**21**) (NAMPT IC₅₀=85 nM) ve Bileşik **22** (NAMPT IC₅₀=242 nM) elde edilmiştir (Şekil 2.12) [90, 108-112].



Şekil 2.12. Bileşik 18, AS1604498 (19), Bileşik 20, F671-0003 (21) ve Bileşik 22'nin kimyasal yapıları

2016 yılında bildirilen bir çalışmada, FK866:NAMPT X-ışını kristal kompleksinden yola çıkılarak yapı temelli ilaç keşfi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. FK866 bileşiğindeki 3-(piridin-3-il)akrilamit iskeleti korunmuş; kuyruk ve bağlayıcı gruplar üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucu elde edilen bileşiklerden Bileşik **23**'ün (Şekil 2.13) (NAMPT IC_{50} =25,3 nM) güçlü bir NAMPT inhibitörü özelliği gösterdiği ve MDA-MB-231 ksenograft fare modelinde anlamlı antitümör etki sergilediği belirlenmiştir [113].

Palacios ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, kendi bileşik kütüphanelerinde yer alan yapılarla moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiş, üre türevi Bileşik **24**'e (Şekil 2.13) (NAMPT IC_{50} =4,3 nM) ulaşılmıştır [114]. Bileşik **24**'ün ayrıca insan A2780 over ve CORL23 büyük hücreli akciğer kanseri hücrelerinin canlılığını anlamlı ölçüde azalttığı (A2780 IC_{50} =7 nM; CORL23 IC_{50} =57 nM) gösterilmiştir. Bileşik **24** üzerinden yürütülen yapı-aktivite çalışmaları kapsamında, membran permeabilitesini artırmak amacıyla üre grubu yerine siklopropan halkası içeren Bileşik **25** (NAMPT IC_{50} <1 nM; A2780 IC_{50} =27 nM; CORL23 IC_{50} =35 nM) geliştirilmiştir. Aynı çalışma grubu, üre grubunun yerine küçük halkaların kullanımının tolere edilebilir olduğu gözlenmiş ve üre azotunun halka içine alındığı azetidin halkası taşıyan Bileşik **26**'yı (NAMPT IC_{50} =2,7 nM; A2780 IC_{50} =5 nM, CORL23 IC_{50} =29 nM) tasarlamıştır (Şekil 2.13). Ayrıca bu çalışmada, geliştirilen bileşiklerin insan NAMPT enzimleriyle kompleks halinde X-ışını kristal yapıları aydınlatılmış (PDB: 6ATB, 6AZI ve 6PEB), her üç bileşikte de piridin halkasındaki azot atomlarının NAMPT aktif bölgesinde benzer konumda çakıştığı gözlemlenmiştir [115]



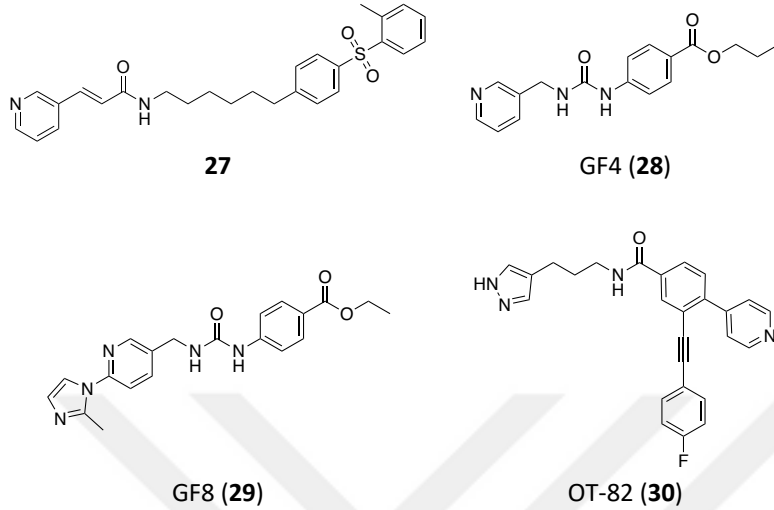
Şekil 2.13. Bileşik 23-26'nın kimyasal yapıları

Zhang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, FK866 yapısında yer alan benzoilpiperidin kuyruk grubu yerine biarilsülfonilamit grubunun getirilmesiyle yeni NAMPT inhibitörleri tasarlanmıştır. Bu bileşiklerden Bileşik **27**'nin (Şekil 2.14) yüksek *in vitro* NAMPT inhibisyonu ($IC_{50}=5,08$ nM) gösterdiği ve insan DU145 prostat ($IC_{50}=2,90$ nM), HeLa serviks ($IC_{50}=2,34$ nM) ve H1975 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ($IC_{50}=2,24$ nM) hücre hatları başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinde *in vitro* antiproliferatif aktivite gösterdiği bildirilmiştir [116].

Çalışma ekibimiz tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, farmakofor temelli sanal tarama sonucunda GF4 (**28**) ($IC_{50}=2,15$ μ M) ve GF8 (**29**) ($IC_{50}=7,31$ μ M) kodlu iki yeni NAMPT inhibitörü keşfedilmiştir. GF4 ve GF8'in insan HepG2 karaciğer hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 2.14) [94].

2020 yılında HTS çalışması sonucunda ulaşılan bir bileşiğin 179 adet analogu sentezlenmiş; bu bileşiklerin hematopoetik kanser türlerine karşı seçiciliği test edilerek fizyokimyasal özellikleri değerlendirilmiştir. Öne çıkan bileşiklerden biri olan OT-82 (**30**) (Şekil 2.14), 12 farklı insan hematolojik (ortalama $IC_{50}=2,89$ nM) ve 17 farklı hematolojik olmayan (ortalama $IC_{50}=13,3$ nM) kanser türünde sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca, *in vivo* ksenograft fare modellerinde tümör hacmini anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir [117]. Moleküler hedefi NAMPT enzimi olarak belirlenen OT-82'nin, FK866 ile benzer NAMPT inhibisyon sağladığı ve kanser hücrelerinde NAD^+ ve ATP seviyelerini düşürerek apoptotik hücre ölümüne yol açtığı belirtilmiştir. Fare modellerinde OT-82 uygulaması sırasında NA takviyesiyle terapötik pencerenin genişlediği ve diğer NAMPT inhibitörlerinden farklı olarak farelerde ve primatlarda kardiyak, nörolojik veya retinal toksisite gözlenmediği bildirilmiştir. Ayrıca, NAMPT inhibitörlerinin hücreSEL NAD^+ seviyelerinin azalmasına bağlı olarak yaşla ilişkili hastalıklar ve yaşlanmayı hızlandırabileceği yönündeki endişelere karşın, OT-82'nin fare modellerinde yaşlanma veya yaşam süresi üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir [117]. Bu umut vadeden sonuçlar doğrultusunda, birinci nesil NAMPT inhibitörlerine kıyasla daha düşük yan etkiye profiline sahip olan ikinci nesil NAMPT

inhibitörü OT-82, lenfoma tedavisi için Faz I klinik denemelere alınmış olup çalışmalar halen devam etmektedir (NCT03921879).



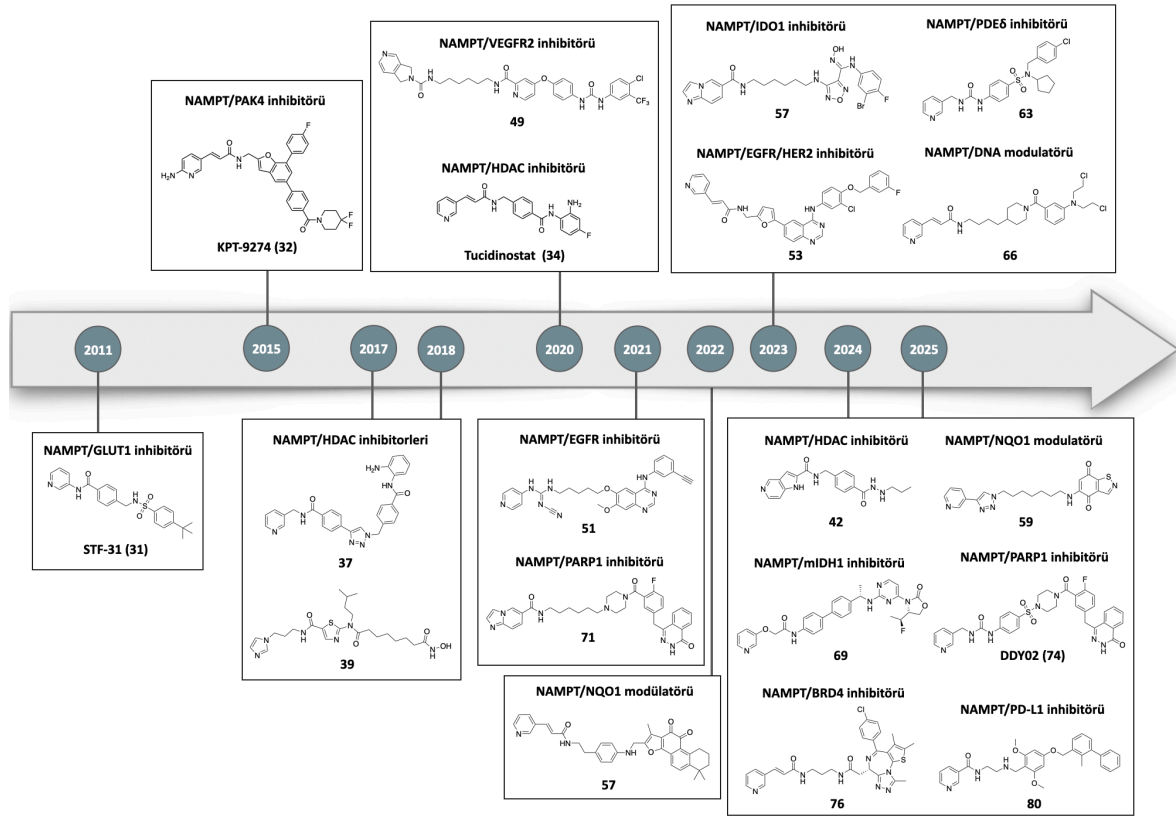
Şekil 2.14. Bileşik 27, GF4 (28), GF8 (29) ve OT-82'nin (30) kimyasal yapıları

2.4. Çok hedefli NAMPT İnhibitörleri

Tek hedefli NAMPT inhibitörlerinden FK866 ve CHS-828'in çeşitli kanser türlerinin tedavisinde, trombositopeni, lenfopeni ve diyare gibi doz sınırlayıcı toksisiteler ile yetersiz antitümör etkinlik göstermeleri nedeniyle klinik çalışmaları ilerletilememiştir [15, 19, 85, 91]. Ayrıca yapılan çalışmalarda; kolorektal, pankreas ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi bazı kanser türlerinde, NAMPT enzimi üzerinde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle NAMPT inhibitörlerine karşı direnç geliştiği gösterilmiştir [105, 118, 119]. NAMPT enziminde gözlenen bu mutasyonlara ek olarak, *de novo* NAD⁺ sentez yolağında görevli QAPRT ve IDO1 enzimlerinin aşırı ekspresyonu da hücrel NAD⁺ seviyelerinin artmasına neden olmakta ve bu durum NAMPT inhibitörlerine karşı gelişen alternatif bir direnç mekanizması oluşturmaktadır [119, 120].

Bu bağlamda, birçok araştırmacı, yalnızca NAMPT enzimini hedeflemek yerine, NAD⁺ sentez mekanizmalarını ve kanserle ilişkili diğer sinyal yollarını da eş zamanlı hedeflemenin; direnç gelişimini engelleyebileceğini, tedavi etkinliğini artırabileceğini ve ayrıca NAMPT inhibitörlerinde gözlenen doz bağımlı toksisiteyi azaltabileceğini öne sürmüştür. Bu amaçla

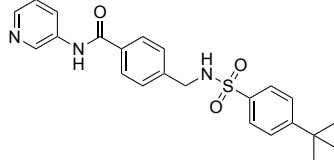
gerçekleştirilen çalışmalarda, NAMPT enziminin yanında farklı hedeflere yönelik etki gösterebilecek çok hedefli bileşikler tasarlanmış ve bunların tek hedefli NAMPT inhibitörlerine göre terapötik üstünlükleri değerlendirilmiştir [14]. Son yıllarda ivme kazanan bu araştırmalar, çok hedefli NAMPT inhibitörlerinin (Şekil 2.15), özellikle geleneksel inhibitörlerde gözlenen doz bağımlı toksisitelerle ilişkili sınırlamaların üstesinden gelerek, daha düşük dozlarda eşdeğer veya daha güçlü antitümör etkinlik sağlayabileceğini ortaya koymuştur [14].



Şekil 2.15. Çok hedefli NAMPT inhibitörleri

2011 yılında Chan ve arkadaşları tarafından glukoz taşıyıcısı 1 (GLUT1) inhibitörü olarak keşfedilen STF-31'in (31) (Şekil 2.16) [121], daha sonraki yıllarda başka bir araştırma grubu tarafından yapılan fragman bazlı çalışmalar sırasında, aynı zamanda NAMPT inhibitörü olduğu ($IC_{50}=19$ nM) ve insan A2780 over kanser hücre hattında NAD^+ seviyelerini önemli ölçüde azaltarak güçlü antiproliferatif aktivite sergilediği ($IC_{50}=0,12$ μ M) keşfedilmiştir [108,

121]. İlerleyen çalışmalarda ise STF-31'in kanser hücrelerindeki sitotoksitesinin esasen NAMPT inhibisyonuna bağlı olduğu öne sürülmüştür [122].

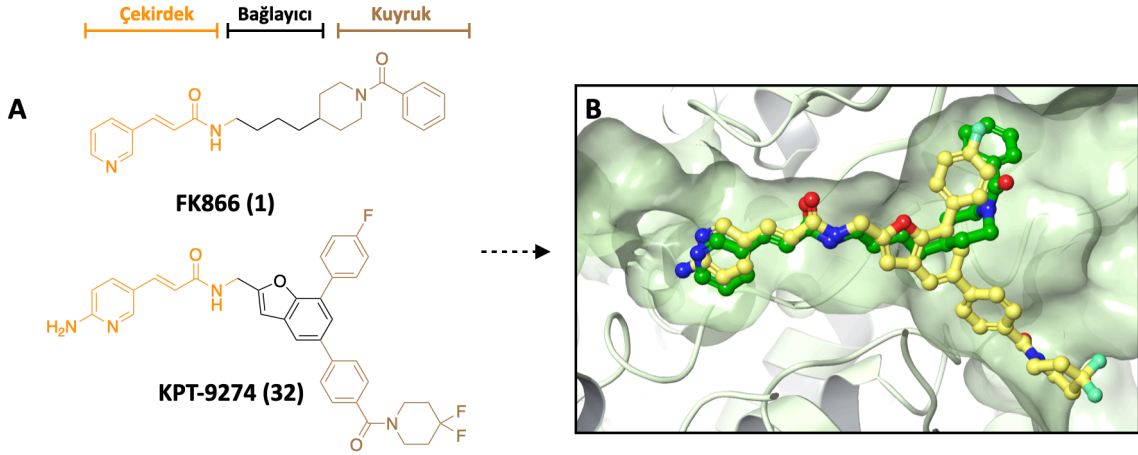


STF-31 (**31**)

Şekil 2.16. STF-31'in (**31**) kimyasal yapısı

P21-Aktive kinazlar (PAK), serin-treonin kinaz ailesine mensup olup, PAK1-6 olmak üzere altı farklı alt türe sahiptir [123, 124]. Bu grupta en kapsamlı şekilde incelenmiş olan PAK4, hücre iskeletinin organizasyonu, hücrenin göçü, proliferasyonu, hayatta kalma, apoptoz ve hücre döngüsü gibi çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. PAK4'ün, kolon, akciğer, meme, mide, prostat, pankreas, lenfoma ve over kanseri gibi pek çok kanser türünde aşırı eksprese edildiği ve tümör oluşumu ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [125-129]. Bu nedenle PAK4 inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar kapsamında, benzofuran halkası içeren bir dizi bileşik tasarlanmış; bunlar arasında yer alan KPT-9274'ün (**32**) (Şekil 2.17), aynı zamanda NAMPT inhibisyon etkisine ($IC_{50} \sim 120$ nM) sahip olduğu tespit edilerek, Karyopharm Therapeutics (ABD) tarafından oral biyoyararlanıma sahip ilk dual NAMPT/PAK4 inhibitörü olarak rapor edilmiştir [130, 131].

İlerleyen zamanlarda, Neggers ve arkadaşları, CRISPR-Cas tabanlı genetik tarama yöntemi ile hedef tanımlama çalışmaları yaparak, KPT-9274'ün birincil hedefinin NAMPT olduğunu belirlemiştir [132]. Aynı çalışmada, bileşiğin NAMPT aktif bölgesindeki bağlantı modu X-ışını kristal yapısıyla (PDB: 5NSD) aydınlatılmış ve aminopiridin halkası ve akrilamit grubu içeren yapısının, FK866 ile benzer bir bağlanma moduna sahip olduğu gösterilmiştir. KPT-9274'ün rijit benzofuran halkası, NAMPT enziminin hidrofobik tüneline bağlayıcı görevi görürken, FK866'dan farklı olarak kuyruk grubunun dallanma göstererek hidrofobik arka tünele yerleştiği belirlenmiştir (Şekil 2.17).

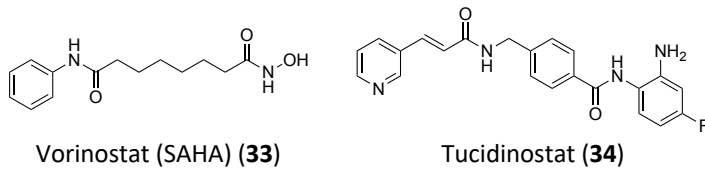


Şekil 2.17. (A) FK866 ve KPT-9274'ün ortak farmakoforik özellikleri; (B) NAMPT aktif bölgesinde FK866 (PDB: 2GVJ) ve KPT-9274 (PDB: 5NSD) biyoaktif konformasyonları

Preklinik çalışmalarda, KPT-9274'ün hem *in vitro* hem de *in vivo* tümör modellerinde çeşitli katı tümörler ve hematolojik malignitelerde proliferasyonu etkili bir şekilde baskıladığı ve kemoterapötik ajanlar olan gemsitabin ve oksaliptatin ile sinerjik etki gösterdiği bildirilmiştir [133]. Özellikle NAMPT ve PAK4 yollarını eş zamanlı hedef alarak hücre mitoz bölünmesi sırasında G₂/M geçişini engellediği ve insan renal hücreli karsinom hücre hatlarından Caki-1 (IC₅₀=0,6 µM) ve 786-O (IC₅₀=0,57 µM) hücrelerinde *in vitro* hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, *in vivo* VHL-mutant 786-O renal hücreli karsinom ksenograft modelinde belirgin bir toksisite oluşturmada tümör büyümesini baskıladığı rapor edilmiştir [131]. Bu umut verici preklinik bulgular doğrultusunda, KPT-9274 üç farklı Faz I klinik denemede yer almıştır. Karyopharm Therapeutics, KPT-9274'ü tekrarlayan ve tedaviye dirençli akut miyeloid lösemi hastalarında değerlendirmektedir (NCT04914845). Öte yandan, Antengene Therapeutics (Çin), KPT-9274'ü ATG-019 adıyla, tek başına veya NA ile kombinasyon halinde, katı tümörlerde ve non-Hodgkin lenfoma tedavisinde araştırmaktadır (NCT04281420).

NAMPT inhibisyonu yanında histon deasetilaz (HDAC) inhibisyonunun sağlandığı çok hedefli stratejiler araştırmacılar tarafından en sık çalışılan konulardan biri olmuştur. HDAC'lar, hem histon hem de histon olmayan proteinlerdeki lizin deasetilasyonunu sağlayarak, gen

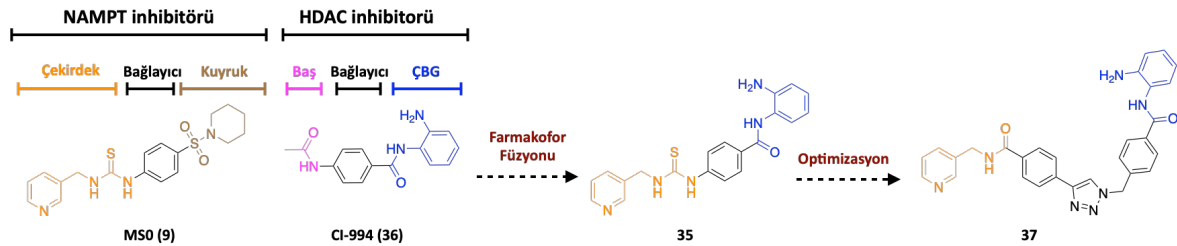
regülasyonu, transkripsiyon, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli hücresel süreçlerde görev almaktadırlar [134, 135]. HDAC'lar, yapısal özellikleri, işlevleri ve hücresel lokalizasyonlarına göre dört sınıfa ayrılmaktadır: Çinko bağımlı sınıf I, II ve IV HDAC'lar (HDAC1-HDAC11) ile NAD^+ bağımlı sınıf III HDAC'lar, diğer adıyla sirtuinler (SIRT1-SIRT7). [136]. HDAC'ların, akciğer, mide ve pankreas kanserleri gibi katı tümörlerin yanı sıra, akut lenfoblastik lösemi, Hodgkin lenfoma ve miyelom gibi hematolojik kanserlerle de ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [137]. Günümüzde klinik kullanıma giren ve genellikle hematolojik kanserlerin tedavisinde kullanılan klasik HDAC inhibitörleri arasında vorinostat (SAHA) (**33**), romidepsin (FK228), belinostat (PXD-101), panobinostat (LBH-589) ve tucidinostat (**34**) (Şekil 2.18) bulunmaktadır [138]. Ancak, mevcut HDAC inhibitörlerinin diyare, mielosupresyon, kardiyovasküler toksisite ve ilaç direnci gibi istenmeyen yan etkileri, tek hedefli HDAC inhibitörlerinin klinik kullanımını sınırlamaktadır [139]. Bu bağlamda, HDAC ve NAMPT enzimlerini eş zamanlı hedefleyen bileşiklerin tasarlanması, klasik NAMPT ve HDAC inhibitörlerine bağlı istenmeyen etkilerin üstesinden gelmek için etkili bir strateji olarak değerlendirilmiştir [140]. Yapılan çalışmalarda, NAMPT inhibitörü FK866'nın, akut miyeloid lösemi ve kronik lenfositik lösemi hücrelerinde HDAC inhibitörlerinin sitotoksik etkisini sinerjistik biçimde artırdığı gösterilmiş olup, bu bulgular söz konusu stratejiyi destekler nitelikte bulunmuştur [141].



Şekil 2.18. Vorinostat (SAHA) (**33**) ve tucidinostadın (**34**) kimyasal yapıları

NAMPT inhibitörlerine benzer şekilde, HDAC inhibitörlerinin çoğu, hidroksamik asit, *o*-amino anilit, hidrazit gibi çinko bağlayıcı bir grup (ÇBG), aromatik amit grubu taşıyan bir baş grubu ve bu iki grubu bağlayan bir bağlayıcı içeren ortak farmakoforik özelliklere sahiptir. Araştırmacılar, bu nedenle NAMPT/HDAC inhibitörlerini tasarlanmasında genellikle farmakofor füzyon stratejisini kullanmışlardır. Buna örnek olarak, Bileşik **35** (NAMPT IC_{50} =116 nM; HDAC1 IC_{50} =1,6 μM), NAMPT inhibitörü MS0 (NAMPT IC_{50} =9,9 nM; HDAC1 IC_{50} >10 μM) ile HDAC inhibitörü CI-994 (**36**) (NAMPT IC_{50} =2 μM ; HDAC1 IC_{50} >1,2 μM)

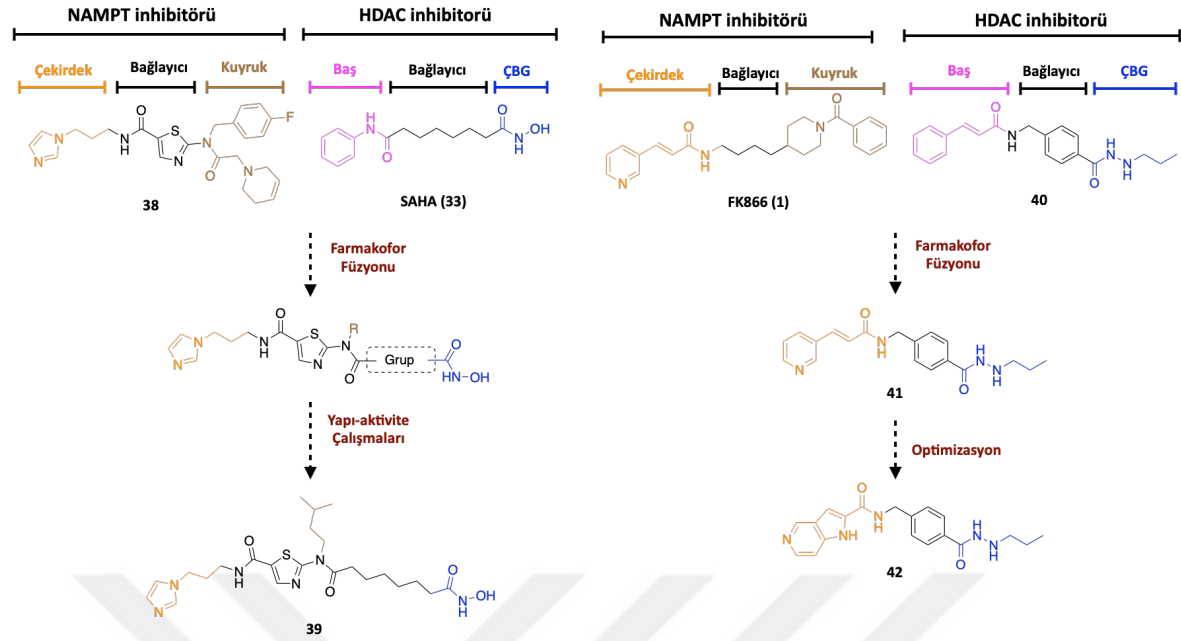
yapılarındaki temel farmakofor grupların füzyonu yoluyla keşfedilmiştir. Bileşik **35** üzerinde yapılan optimizasyon çalışmaları ile, farklı bağlayıcı ve çekirdek grupların eklenmesi sonucunda NAMPT ($IC_{50}=31$ nM) ve HDAC1 ($IC_{50}=55$ nM) üzerinde yüksek ve dengeli bir aktivite gösteren 1,2,3-triazol türevi Bileşik **37**'ye ulaşılmıştır (Şekil 2.19) [142].



Şekil 2.19. Bileşik 35 ve 37'nin tasarım stratejisi

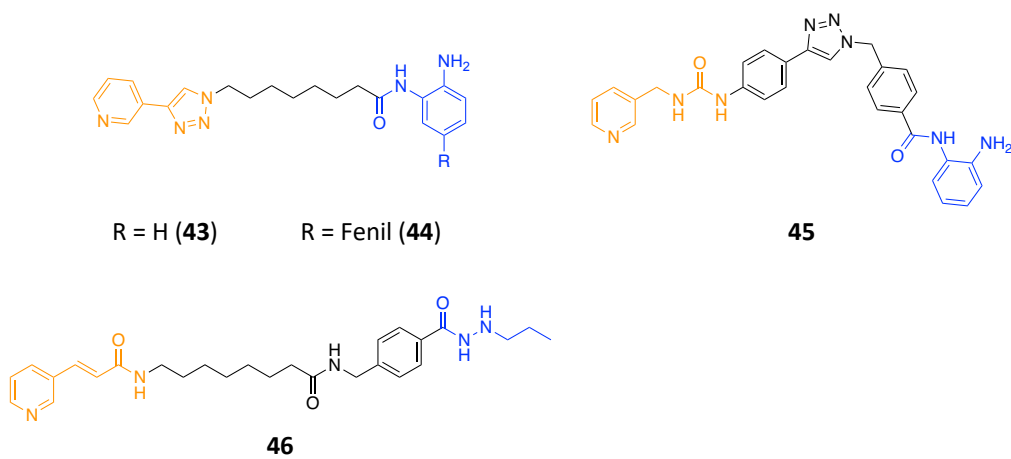
Benzer şekilde, aynı araştırma grubu tarafından yürütülen çalışmalarda, NAMPT inhibitörü Bileşik **38** ve HDAC inhibitörü SAHA'nın farmakoforik gruplarının füzyonu ve yapı-aktivite ilişkisi analizleri sonucunda ulaşılan Bileşik **39**'un, NAMPT ($IC_{50}=15$ nM) ve HDAC1 ($IC_{50}=2$ nM) enzimlerine karşı yüksek ve dengeli inhibitör aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (Şekil 2.20) [143]. Ayrıca, Bileşik **39**'un SAHA ve FK866'nın aksine belirgin bir toksisite oluşturmadan HCT116 ksenograft fare modelinde yüksek derecede *in vivo* antitümör etkinlik sergilediği raporlanmıştır.

İzleyen çalışmalarda, hidrazit türevi Bileşik **40** ve FK866'nın ortak farmakoforik gruplarının birleştirilmesiyle, NAMPT/HDAC1-3 inhibitörleri olan Bileşik **41** (NAMPT $IC_{50}=1,66$ μ M; HDAC1 $IC_{50}=25,1$ nM; HDAC2 $IC_{50}=140$ nM; HDAC3 $IC_{50}=3,12$ nM; HDAC4-HDAC11 $IC_{50}>10$ μ M) ve Bileşik **42** (NAMPT $IC_{50}=1,62$ μ M; HDAC1 $IC_{50}=7,61$ nM; HDAC2 $IC_{50}=37,2$ nM; HDAC3 $IC_{50}=0,72$ nM; HDAC4-HDAC11 $IC_{50}>10$ μ M) tasarlanmıştır. Bileşik 42'nin NAMPT veya HDAC inhibitörlerine dirençli p53 ekspresyonu olmayan hücre hatlarında güçlü antiproliferatif aktivite gösterdiği ve apoptozla ilişkili hücre ölümünü indüklediği belirlenmiştir (Şekil 2.20) [144].



Şekil 2.20 Bileşik 39, 41 ve 42'nin tasarım stratejileri

Buna ek olarak, triazol halkası içeren Bileşik **43** (NAMPT IC_{50} =41 nM; HDAC1 IC_{50} =40 nM) ve Bileşik **44** (NAMPT IC_{50} =18 nM; HDAC1 IC_{50} =15 nM), üre türevi Bileşik **45** (NAMPT IC_{50} =18 nM; HDAC1 IC_{50} =41 nM) ile akrilamit grubu taşıyan Bileşik **46** (NAMPT IC_{50} =489 nM; HDAC1 IC_{50} =17,9 nM) gibi çeşitli yapısal türevler, NAMPT/HDAC inhibitörleri olarak bildirilmiştir (Şekil 2.21) [142, 145-147].

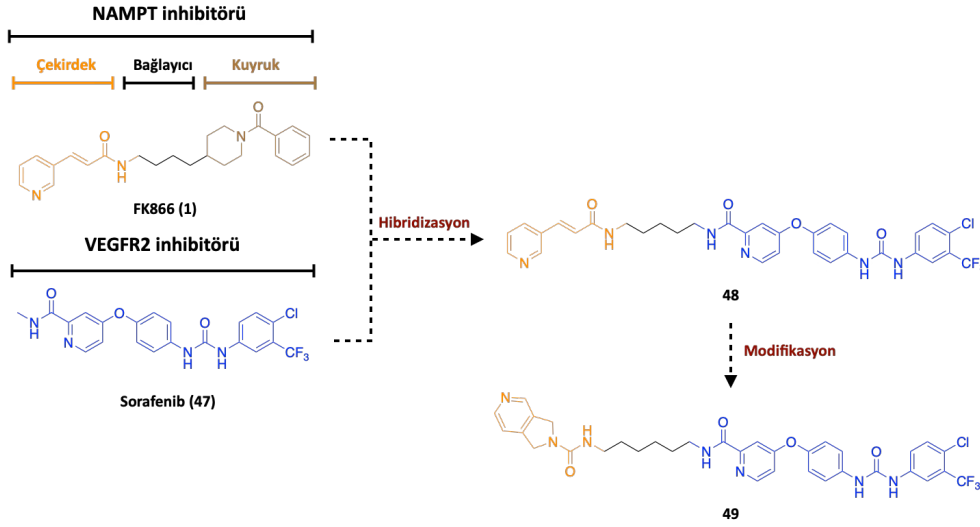


Şekil 2.21. Bileşik 43-46'nın kimyasal yapıları

Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2 (VEGFR2), endotelyal hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması için birincil pozitif sinyal iletiminde görev almakta olup, bu reseptörün inhibisyonu, anjiyogenez sürecini kontrol altına alarak, katı tümörlerin büyümesi ve hayatta kalması için kritik öneme sahiptir [148]. Kansere tedavisinde klinik olarak onaylanmış sunitinib, vandetanib ve sorafenib (**47**) (Şekil 2.22) gibi birçok VEGFR2 inhibitörü bulunmasına rağmen, bu inhibitörlere karşı gelişen ilaç direnci ve çeşitli yan etkiler, klinik kullanımlarını kısıtlamaktadır [148-151].

Bu sorunun üstesinden gelmek amacıyla, Zhang ve arkadaşları tarafından hem VEGFR2 reseptörünü hem de NAMPT enzimini hedefleyen dual etkili inhibitörler geliştirilmiştir. Bu çalışmada, NAMPT inhibitörü FK866 (**1**) (NAMPT IC_{50} =27 nM; Wi38 IC_{50} =0,25 μ M; selektivite indeksi (SI)_{Wi38/A549}=4,8) ve VEGFR inhibitörü sorafenib (**47**) (VEGFR2 IC_{50} =90 nM; Wi38 IC_{50} =48 μ M; SI _{Wi38/A549}=6,2) gibi normal insan diploid Wi38 hücre hatlarında yüksek sitotoksikite gösteren bileşiklerin çekirdek ve bağlayıcı farmakoforik grupları birleştirilerek, iki hedefli inhibitörler tasarlanmıştır.

Bu hibrit bileşikler arasında, Bileşik **48** (NAMPT IC_{50} =37 nM; VEGFR2 IC_{50} =64 nM), normal insan Wi38 diploid hücre hattında düşük toksisite göstermiş (Wi38 IC_{50} >100 μ M) ve insan A549 akciğer kanseri hücre hattında yüksek sitotoksik etki (A549 IC_{50} =0,58 μ M) ve yüksek seçicilik indeksi (SI _{Wi38/A549} >172) sergilemiştir. Ayrıca, Bileşik **48**'in çekirdek ve bağlayıcı gruplarında gerçekleştirilen yapısal modifikasyonlar sonucunda, seçicilik indeksi daha da artırılmış Bileşik **49** (NAMPT IC_{50} =35 nM; VEGFR2 IC_{50} =82 nM; Wi38 IC_{50} >100 μ M; A549 IC_{50} =0,48 μ M; SI _{Wi38/A549} >208) elde edilmiştir (Şekil 2.22) [152].

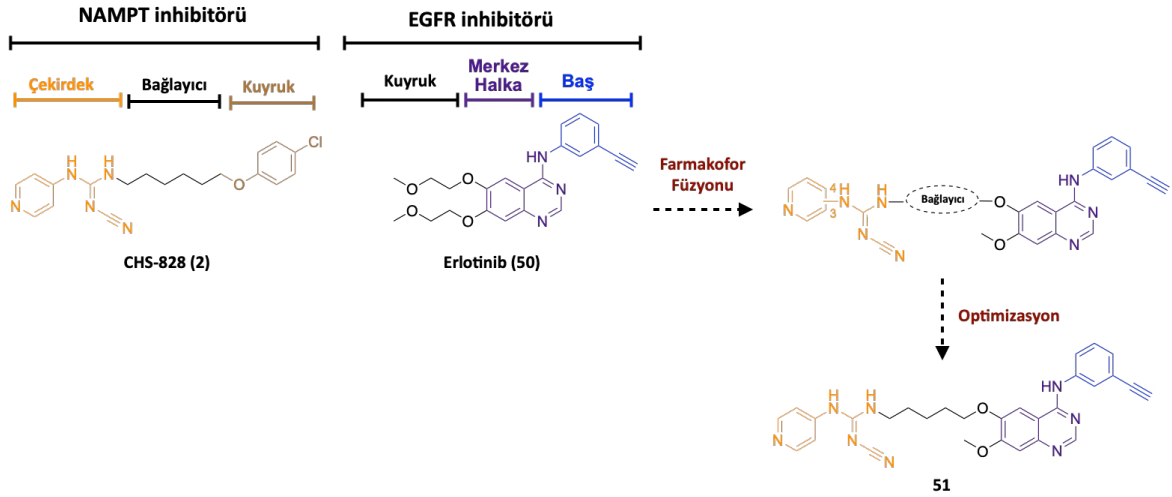


Şekil 2.22. Bileşik 48 ve 49'un tasarım stratejisi

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), eritroblastik lösemi virüsüne ait onkogen homologu/insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (ErbB/HER) protein kinaz ailesinin (HER1-HER4) bir üyesi olup, hücre proliferasyonu, hayatta kalma, farklılaşma ve göç gibi birçok hücreyel sürecin düzenlenmesinde rol oynamaktadır [153]. EGFR'nin artmış ekspresyonu; akciğer, baş ve boyun, kolon, pankreas, meme, over ve böbrek kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanser türleriyle ilişkilendirilmiş ve bu nedenle EGFR, kanser tedavisi için umut verici bir hedef haline gelmiştir [154-161]. EGFR tirozin kinaz inhibitörleri (TKI), küçük hücreli olmayan akciğer, meme, kolorektal ve özofagus kanserleri gibi birçok kanser türünün tedavisinde kullanılmakta olup, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz inhibitörler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır [162]. Birinci nesil EGFR TKI'ları, örneğin erlotinib (**50**) (Şekil 2.23) ve gefitinib, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında umut verici sonuçlar göstermiş; ancak özellikle T790M mutasyonu nedeniyle zamanla ilaç direnci gelişmiş ve etkinlikleri sınırlı kalmıştır [163-165]. Bu direnç mekanizmasını aşmak amacıyla, kapsamlı çalışmalar yürütülmüş ve ikinci ve üçüncü nesil geri dönüşümsüz EGFR TKI'ları olan afatinib ve osimertinib geliştirilmiştir. Bu ajanlar, yapılarında yer alan Michael akseptörü sayesinde, EGFR'nin ATP bağlanma bölgesinde bulunan Cys797 ile kovalent bağ oluşturarak T790M mutasyonunu etkili bir şekilde inhibe edebilmiştir [165, 166]. Ancak, tüm bu avantajlara rağmen, bu inhibitörlere karşı da C797S mutasyonu gibi yeni direnç mekanizmaları ortaya çıkmıştır [167, 168]. Son olarak, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisi için geliştirilen ve Faz I klinik denemeleri devam eden dördüncü nesil

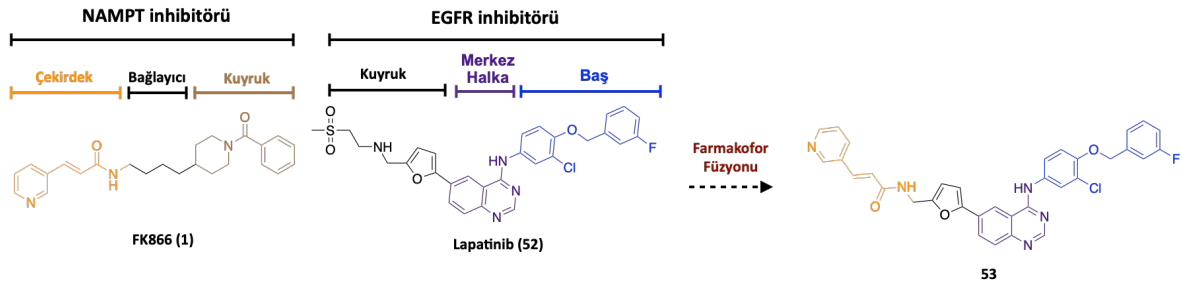
inhibitör TQB3804, bu direnç bariyerini aşmada yetersiz kalmış; dolayısıyla, daha etkili ve direnç gelişimini önleyici yeni terapötik stratejilere duyulan ihtiyaç devam etmektedir [169].

2012 yılında, Okumura ve arkadaşları, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin büyümesini sürdürebilmek için EGFR eksprese ettiğini ve bu hücrelerin yüksek düzeyde hücre içi ATP seviyelerine ihtiyaç duyduğunu rapor etmiştir [170]. NAMPT'ın hücre içi ATP seviyelerini düzenlemede ve enerji üretiminde oynadığı kritik rol göz önüne alındığında, aynı araştırma grubu, NAMPT inhibisyonunun, dirençli kanser hücrelerinde EGFR TKI'larının etkinliğini artırabileceğini öne sürmüştür [166]. Bu bağlamda yürütülen çalışmada, FK866'ın hem gefitinibe duyarlı hem de dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde proliferasyonu etkili bir şekilde baskıladığı ve hücre içi ATP seviyelerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında, Zhang ve arkadaşları hem T790M hem de C797S mutasyonlarına karşı etkili olabilecek ve Michael akseptörü içermeyen dual etkili EGFR ve NAMPT inhibitörleri tasarlamıştır. Bu amaçla, CHS-828'in piridilsianoguanidin çekirdek grubu ile, erlotinibin 4-anilinokinazolin hidrofobik baş grubu, çeşitli bağlayıcılar aracılığıyla birleştirilmiştir. Ayrıca, çekirdek ve uç gruplar arasındaki mesafenin inhibitör aktivitesi üzerindeki etkisi göz önünde bulundurularak, piridin halkasının üçüncü veya dördüncü konumunda yer alan çeşitli uzunluklarda bağlayıcılar değerlendirilmiştir [166]. Bu çalışmalar sonucunda, 4-piridil grubu ve beş metilen birimi uzunluğunda bir bağlayıcı içeren Bileşik **51**, NAMPT ($IC_{50}=41,2$ nM) ve EGFR ($IC_{50}=0,23$ nM) üzerinde dengeli ve güçlü bir inhibitör etki göstermiştir. Ayrıca bu bileşik, mutasyona uğramış EGFR^{T790M} ($IC_{50}=153$ nM), EGFR^{L861Q} ($IC_{50}=0,26$ nM) ve EGFR^{L858R} ($IC_{50}=0,26$ nM) üzerinde de etkili bulunmuştur. Ek olarak, Bileşik **51**, insan MCF-7 meme ($GI_{50}=0,10$ nM), Huh-7 karaciğer ($GI_{50}=0,64$ nM) ve H1975 akciğer kanseri ($GI_{50}=78,3$ nM) hücreleri üzerinde güçlü *in vitro* antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.23) [166].



Şekil 2.23. Bileşik 51'in tasarım stratejisi

Ding ve arkadaşları, NAMPT inhibitörü FK866'nın çekirdek grubu, EGFR/HER2 dual inhibitörü lapatinibin (**52**) 4-anilinokinazolin grubuyla birleştirilmesi sonucu hem EGFR/HER2 hem de NAMPT inhibitörü ilaç konjugatlarını tasarlamıştır (Şekil 2.24) [169]. Bu konjugatlardan Bileşik **53**, NAMPT ($IC_{50}=65,5$ nM), EGFR ($IC_{50}=15,6$ nM) ve HER2 ($IC_{50}=25,8$ nM) üzerinde güçlü inhibitör aktivite göstermiştir. Ayrıca, Bileşik **53**'ün EGFR/HER2 ekspresyon seviyeleri farklılık gösteren kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etkisi değerlendirilmiş; bileşiğin test edilen tüm hücre hatlarında lapatinibden daha güçlü antiproliferatif aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, lapatinibe dirençli insan T47D meme kanseri hücre hattında, Bileşik **53**'ün, lapatinib (**52**) ile kıyaslandığında ($IC_{50}=13,5$ μ M), daha güçlü bir aktivite sergilediği ($IC_{50}=0,36$ μ M) gösterilmiştir. Ayrıca, ilgili bileşiğin, EGFR^{L858R}, EGFR^{T790M} ve EGFR^{C797S} mutasyonlarına sahip insan NCI-1975 akciğer kanseri hücre hattı ve Del19^{T790M} ve Del19^{C797S} mutasyonlarına sahip pro-B kemirgen Ba/F3 hücre hattı üzerindeki *in vitro* antiproliferatif aktivitesinin (NCI-1975 $IC_{50}=2,15$ μ M; Ba/F3 $IC_{50}=0,65$ μ M) osimertinib (NCI-1975 $IC_{50}=3,93$ μ M; Ba/F3 $IC_{50}=1,47$ μ M) ile karşılaştırıldığında daha güçlü olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.24) [169]. Bu bulgular, özellikle EGFR inhibitörlerine karşı gelişen direnç mekanizmalarını aşmayı hedefleyen yaklaşımlar açısından önemlidir. Bu kapsamda, NAMPT/EGFR ve NAMPT/EGFR/HER2 hedeflerine yönelik çoklu inhibitörlerinin tasarımıyla umut verici sonuçlara ulaşılmıştır. Ancak, bu yeni nesil çok hedefli inhibitörlerin, NAMPT inhibitörlerine karşı gelişen direnç üzerindeki etkileri henüz detaylı olarak araştırılmamıştır.

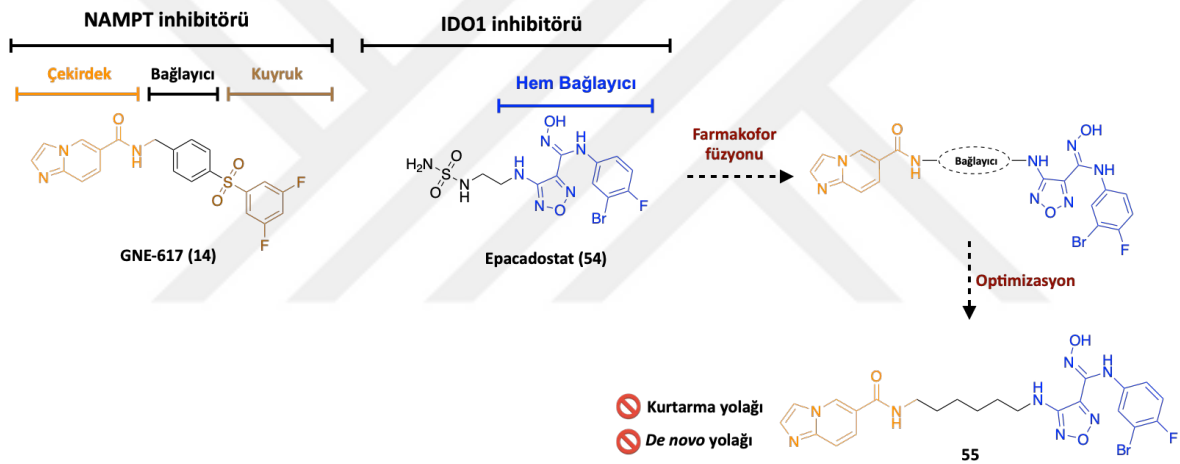


Şekil 2.24. Bileşik 53'ün tasarım stratejisi

Hem içeren IDO1, triptofanın kinürenin yolları üzerinden katabolizmasında görev alan ve bu süreçte hız kısıtlayıcı enzim olarak işlev gören bir oksidazdır [171]. Bu enzimatik aktivite, kinürenin metabolitlerinin birikmesine neden olarak, T hücre aktivitesini baskılamak ve tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınıp elimine edilmesini engellemektedir [172]. IDO1'in kolorektal, meme, özofagus, servikal skuamöz hücreli karsinom ve melanoma gibi çeşitli kanser türlerinde yüksek seviyelerde eksprese edildiği; bu durumun ise zayıf terapötik yanıt ve düşük sağkalım oranlarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir [173-177]. Bununla birlikte, taksol dirençli insan A549 akciğer kanseri hücreleri gibi bazı hücre hatlarında, FK866 ve CHS-828 gibi NAMPT inhibitörlerine karşı direnç geliştiği, bu hücrelerin NAD^+ biyosentezi için *de novo* sentez yolağına yöneldiği ve bununla birlikte IDO1 ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir [119, 178].

Bu bulgular ışığında yapılan bir çalışmada, FK866 ve epacadostatın (54) (Şekil 2.25) tek başına ve kombinasyon halinde, taksol dirençli insan A549 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, NAMPT ve IDO1'in eş zamanlı inhibisyonunun, hücresel NAD^+ seviyelerinde daha belirgin bir azalmaya ve buna bağlı olarak antiproliferatif aktivitenin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (FK866 IC_{50} =52,15 μM ; epacadostat IC_{50} =61,06 μM ; FK866+epacadostat (1:1) IC_{50} =34,53 μM) [178]. Bu sonuçlardan hareketle, NAMPT inhibitörü GNE-617 ve IDO1 inhibitörü epacadostat (54) yapıları temel alınarak farmakofor füzyon stratejisi ile dual NAMPT/IDO1 inhibitörleri tasarlanmıştır [178]. Bu stratejide, GNE-617'nin çekirdek grubu ile epacadostatın hem-bağlayıcı grubu, farklı uzunluktaki alkil zincirleri aracılığıyla birleştirilmiştir. Yapısal

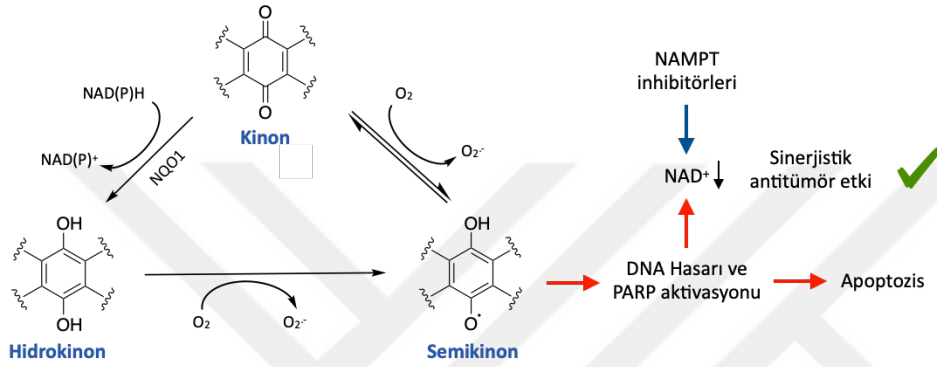
optimizasyon çalışmaları sonucunda, karbon zinciri uzunluğunun artırılmasının NAMPT inhibitör aktivitesini güçlendirdiği, ancak daha rijit alkil zincirlerinin hem NAMPT hem de IDO1 inhibisyonunu olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Bu bağlamda, altı karbonlu alkil zinciri içeren Bileşik **55**, hem NAMPT ($IC_{50}=57,7$ nM) hem de IDO1 ($IC_{50}=233$ nM; HeLa IDO1 $IC_{50}=160$ nM) enzimlerine karşı yüksek inhibisyon aktivitesi sergilemiştir. Ayrıca, hücresel NAD^+ seviyelerini azaltması ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimine neden olması sayesinde, taksol direnci kazanmış insan A549 akciğer kanseri hücre hattında güçlü antiproliferatif etki ($IC_{50}=5,35$ μ M) göstermiştir. Bileşik **55**, aynı zamanda, A549 taksol dirençli ksenograft fare modellerinde anlamlı bir sistemik toksisite oluşturmadan güçlü antitümöral etkinlik sergilemiştir (Şekil 2.25) [178].



Şekil 2.25. Bileşik **55**'in tasarım stratejisi

Yapılan çalışmalarda hem NAMPT inhibisyonu hem de NAD(P)H:Kinon Oksidoredüktaz 1 (NQO1) modülasyonu sağlayan çok hedefli bileşikler tasarlanmıştır. NQO1, farklı seviyelerde olmak üzere hemen hemen tüm dokularda bulunan; özellikle akciğer, meme, prostat, kolon, mide, baş ve boyun ile pankreas kanserlerinde yüksek ekspresyon gösteren indüklenebilir metabolik bir enzimdir [179-181]. Flavin adenin dinükleotit (FAD) bağımlı sitozolik bir flavoenzim olan NQO1, NADH ve NADPH'ı elektron donörü olarak kullanarak kinonları indirger ve daha stabil hidrokinon türevlerine dönüştürerek detoksifikasyon sürecini başlatır [182]. Daha sonra bu hidrokinon türevleri, glutatyon veya glukuronik asit gibi konjugasyon reaksiyonları sonucunda metabolize edilerek vücuttan atılır [180, 183, 184].

NQO1 bir detoksifikasyon enzimi olarak görev yapmasına rağmen, oluşan hidrokinon metabolitleri redoks döngüsüne girerek semikinon ara ürünleri üzerinden oldukça reaktif ve kararsız metabolitlerine dönüşebilmektedir [185]. NQO1'in aşırı eksprese edildiği kanser hücrelerinde, bu redoks döngüsü aracılığıyla ROS oluşmakta ve artan ROS seviyeleri, DNA hasarına ve NAD^+ tüketen PARP1 enziminin aşırı aktivasyonuna yol açarak hücre ölümüne neden olmaktadır (Şekil 2.26) [179].

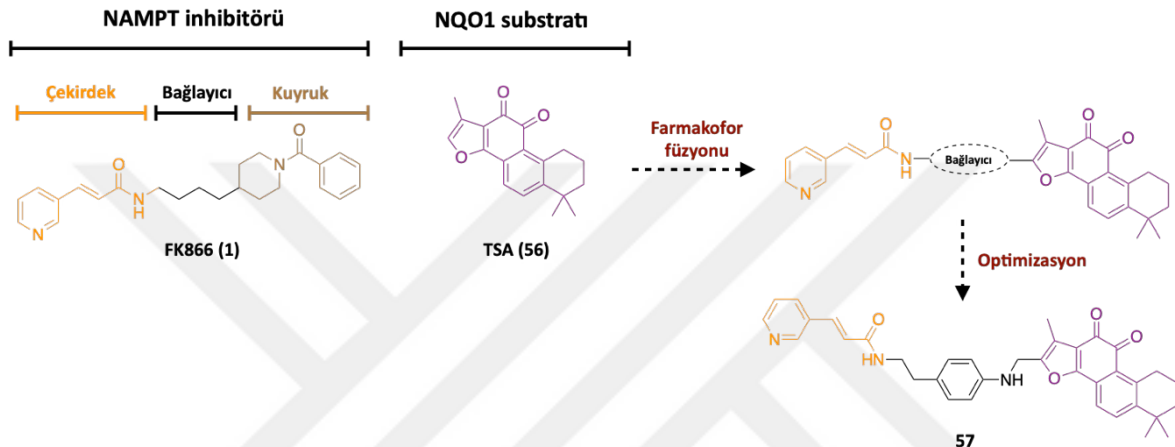


Şekil 2.26. NAMPT inhibitörleri ve NQO1 substratlarının sinerjistik antitümör etkisi

Bu nedenle, NQO1'i aktive eden substratlar antikanser ajanlar olarak değerlendirilmiş; yürütülen bir çalışmada, NQO1 substratı olan tanshinon IIA (TSA)'nın (**56**) (Şekil 2.27), ROS aracılı apoptoz yoluyla insan A549 akciğer kanseri hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca TSA'nın hücrel NAD^+ seviyelerini düşürerek NAMPT ekspresyonunun önemli ölçüde artmasına neden olduğu tespit edilmiştir [186]. Bu bilgilere dayanarak, NQO1 aracılığıyla gerçekleşen apoptotik hücre ölümünün, NAMPT inhibisyonu ile hücrel NAD^+ tüketiminin artması sonucunda artırılabilir düşüncüyle; NAMPT ve NQO1 enzimlerini eş zamanlı hedefleyen bileşiklerin geliştirilmesi amaçlanmıştır [184].

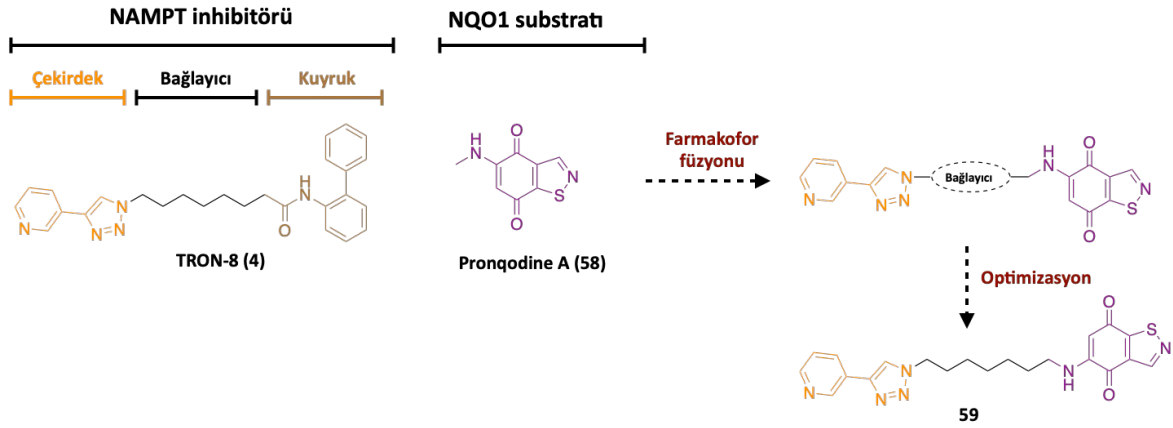
TSA (NQO1 metabolizma hızı=530 $\mu\text{mol NADPH/dk}/\mu\text{mol NQO1}$) ve NQO1 bağlanma cebini işgal edebilmesi amacıyla, FK866 (NAMPT IC_{50} =35 nM) yapısındaki (*E*)-3-(piridin-3-il)akrilamit grubu, farklı bağlayıcılarla birleştirilmiştir. Bileşikler arasında, etilfenil bağlayıcısı taşıyan Bileşik **57**, güçlü NAMPT inhibisyon aktivitesi (IC_{50} =0,183 μM) gösterirken ve NQO1 substratı özelliği de sergilemiştir (NQO1 metabolizma hızı=949 $\mu\text{mol NADPH/dk}/\mu\text{mol}$

NQO1). Buna ek olarak, Bileşik **57**, insan A549 akciğer kanseri hücreleri ($IC_{50}=1,15 \mu M$) ve taksol dirençli A549 akciğer kanseri hücre hattı ($IC_{50}=4,1 \mu M$) üzerinde güçlü *in vitro* antiproliferatif aktivite göstermiştir. Normal insan L02 hücre hattına kıyasla yüksek seçicilik oranı ($IC_{50}=120,4 \mu M$) ile normal hücelere karşı daha az toksik olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Bileşik **57**, taksol dirençli A549 ksenograft fare modelinde belirgin bir toksisite oluşturmadan güçlü *in vivo* antitümör etkinlik göstermiştir (Şekil 2.27) [184].



Şekil 2.27. Bileşik 57'nin tasarım stratejisi

Jiangzhu ve arkadaşları, FK866 ve TRON-8 gibi NAMPT inhibitörlerinin çekirdek grupları ile NQO1 substratı olan pronodin A (**58**) yapısını çeşitli bağlayıcılar aracılığıyla birleştirerek çok hedefli bileşikler tasarlamışlardır. Yürüttükleri *in vitro* antitümör aktivite çalışmalarında, triazol halkası içeren NAMPT farmakoforuna sahip Bileşik **59**'un, insan A549 akciğer kanseri ($IC_{50}=1,39 \mu M$) ve insan MCF-7 meme kanseri ($IC_{50}=4,59 \mu M$) hücre hatlarına karşı, normal insan L02 hepatik hücre hattına kıyasla yüksek seçicilik (seçicilik oranı=50,88) göstererek antitümör aktivite sergilemiştir. Güçlü NAMPT inhibitör aktivitesi ($IC_{50}=404,1 \text{ nM}$) sergileyen Bileşik **59**'un antikanser aktivitesinin NQO1 ile ilişkisini netleştirmek amacıyla, NQO1 lentivirüsü enfeksiyonu ile NQO1 ekspresyonu artırılmış insan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında NQO1'in elektron donörü olan NAD(P)H'nin indirgenmesi sonucunda 340 nm'deki absorbansın önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (NQO1⁽⁺⁾ MDA-MB-231 $IC_{50}=0,92 \mu M$). Ancak, Bileşik **59**'un sudaki çözünürlüğünün iyi olmadığı ve bu konuda iyileştirmeye ihtiyaç duyulduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Şekil 2.28) [187].



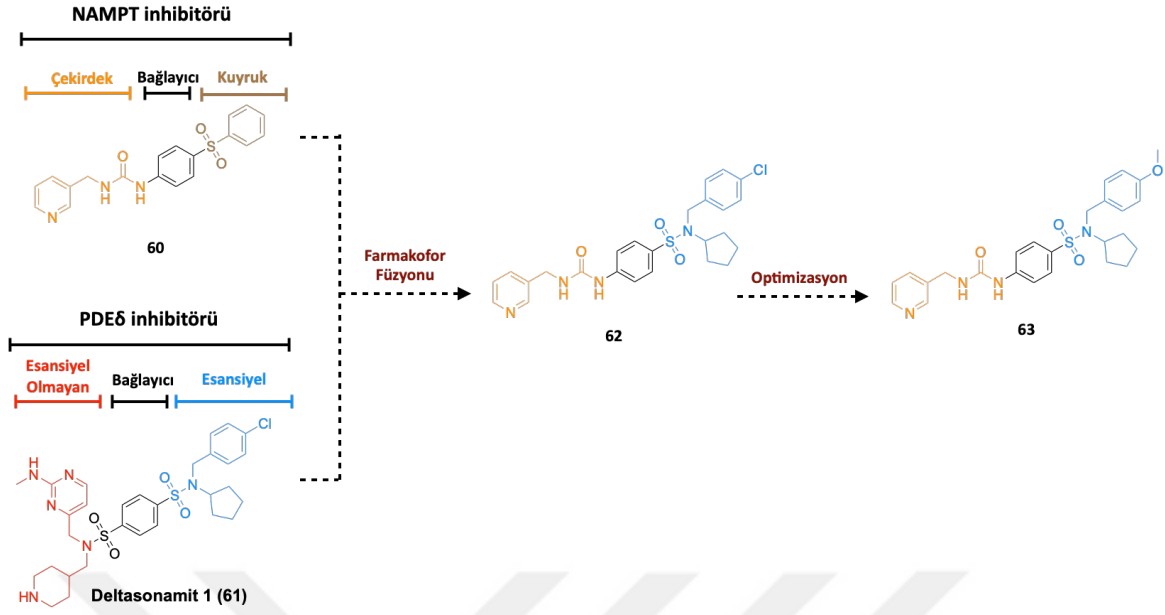
Şekil 2.28. Bileşik 59'un tasarım stratejisi

NAMPT inhibisyonunun yanı sıra KRAS geninin düzenlenmesinde rol alan PDEδ inhibisyonunun sağlanması çok hedefli bir strateji olarak benimsenmiş ve bu konuyla ilgili çalışmalar yürütülmüştür. KRAS geni, RAS ailesine ait GTPaz'lerden biri olan KRAS proteinini kodlayan bir onkogendir [188]. KRAS genindeki mutasyonlar, KRAS proteininin aktif ve inaktif formları arasında geçiş yapma yeteneğini bozarak, MAPK, PI3K, RAL-GEF ve PLC yolları dahil olmak üzere çeşitli sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır [189-191]. Bu sinyal yolları, hücre döngüsü ilerlemesi, proliferasyon, otofaji, apoptoz, göç, invazyon ve glukoz metabolizması gibi birçok transkripsiyon faktörünü ve hücre işlevi düzenleyerek, pankreas kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünün ilerlemesinde rol oynamaktadır [192, 193]. KRAS mutasyonları, yalnızca sinyal yollarını aktive etmekle kalmaz, aynı zamanda metabolik yeniden programlamayı teşvik ederek pankreas kanseri hücrelerinin ilerlemesini hızlandırabilmektedir. Mutant KRAS, GLUT1, hekzokinazlar, PFK1 ve LDHA gibi hız sınırlayıcı glikoliz enzimlerinin ekspresyonunu artırarak glikoliz aktivitesini ve laktat üretimini artırmaktadır [194-196]. Glukoz alımı ve glikoliz metabolizmasındaki artış ise pankreas kanseri hücrelerinde NAD^+ ihtiyacının artmasına neden olmaktadır [197].

KRAS proteininin hücre içi lokalizasyonu, tümör büyümesi ve proliferasyon üzerindeki işlevlerini etkilemektedir. PDEδ, KRAS proteininin lipid kısmı ile etkileşime girerek bu lokalizasyonu düzenlemektedir [198, 199]. PDEδ-KRAS etkileşiminin baskılanması veya inhibe edilmesi, KRAS sinyal yolağının zayıflatılması yoluyla kanser tedavisi için etkili bir

strateji olarak tanımlanmış; bu etkileşimi bozan inhibitörlerin keşfi amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır [200]. Ancak, bilinen PDEδ inhibitörleri genellikle zayıf *in vivo* antitümör etkinlikleri nedeniyle sınırlı kalmış; hücresel aktiviteyi ve *in vivo* ilaç etkinliğini artırmak, PDEδ inhibitörlerinin geliştirilmesinde hala çözülmesi gereken önemli bir sorun haline gelmiştir [201].

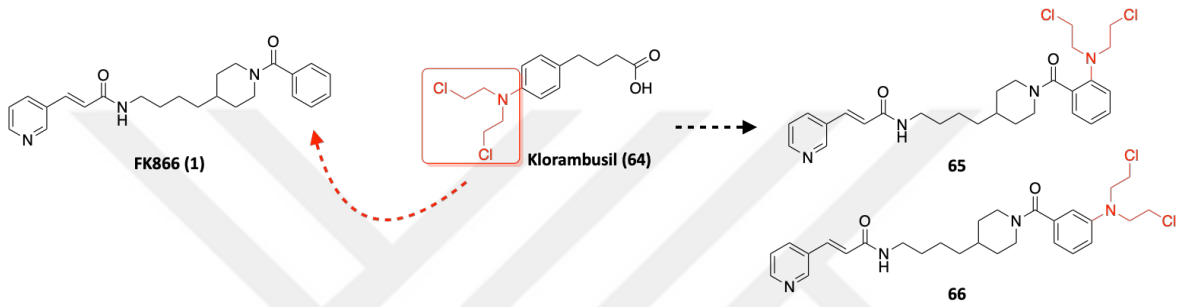
Dong ve arkadaşları, pankreas kanserinde NAD⁺ metabolizması için kritik öneme sahip NAMPT enzimi ile PDEδ'nin eş zamanlı inhibisyonunun, metabolik çöküşü tetikleyerek hücre canlılığını azaltabileceğini ve sinerjik bir antitümör etki oluşturabileceğini öne sürmüştür. Dual NAMPT/PDEδ inhibitörü olan MSO ile pankreas kanseri hücreleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, PDEδ ve NAMPT sinyal yolları arasındaki sinerjinin birleşme indeksinin (CI) <1 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçtan hareketle, NAMPT inhibitörü Bileşik **60** ile PDEδ inhibitörü deltasonamit 1'in (**61**) aktivite açısından esansiyel ve esansiyel olmayan grupları birleştirilerek dual NAMPT/PDEδ inhibitörü Bileşik **62** (NAMPT IC₅₀=12,11 nM; PDEδ K_{D2}=5,14 nM; A549 IC₅₀=10 nM; MiaPaca-2 IC₅₀=38 nM; HCT116 IC₅₀=13 nM) tasarlanmıştır (Şekil 2.29). Bileşik **62**'den yola çıkılarak bağlayıcı ve önemli farmakoforik gruplar üzerinde optimizasyon çalışmaları yürütülerek yeni bileşikler geliştirilmiştir. Bu bileşikler, insan A549 akciğer, MiaPaca-2 pankreas ve HCT116 kolorektal kanseri hücre hatlarında, NAMPT ve PDEδ inhibitörlerinin tek başına veya birlikte uygulanmasına kıyasla daha yüksek veya benzer düzeyde *in vitro* antitümör aktivite göstermiştir. Özellikle Bileşik **63** (NAMPT IC₅₀=3,41 nM; PDEδ K_{D2}=0,50 nM), güçlü bir antitümör etki sergilemiş (A549 IC₅₀=2 nM; MiaPaca-2 IC₅₀=3 nM; HCT116 IC₅₀=7 nM) ve ileri biyolojik değerlendirmeler için aday olarak seçilmiştir. Bileşik **63**, insan MiaPaca-2 pankreas kanseri fare modelinde, belirgin bir toksisite göstermeden tümör ağırlığını önemli ölçüde azaltmıştır (Şekil 2.29) [202].



Şekil 2.29. Bileşik 62 ve 63'ün tasarım stratejisi

Kanser hücrelerinde NAD^+ seviyelerinin sinerjik bir şekilde azaltmaya yönelik bir diğer strateji, NAMPT inhibitörlerinin alkilleyici ajanlarla birlikte kullanılmasıdır. Alkilleyici ajanlar, DNA ile kovalent bağlar oluşturarak DNA replikasyonunu engellemekte ve hücre proliferasyonunu durdurarak antitümör etki sağlamaktadır [203]. Ancak bu süreç, DNA hasarına bağlı olarak PARP aktivasyonunu tetikleyerek hücresel NAD^+ tüketiminde artışa yol açmaktadır [204]. Alkilleyici ajanlar olan klorambusil (**64**) ve melfalan, tümör hücreleri üzerinde güçlü antitümör etkiler göstermelerine ve geniş etki spektrumuna sahip olmalarına rağmen, düşük tümör seçiciliği ve yüksek yan etki profili nedeniyle klinik kullanımları sınırlıdır [205, 206]. Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek amacıyla, alkilleyici ajanların diğer antitümör ilaçlarla hibritleştirilmesi önerilen bir strateji haline gelmiş ve bu strateji doğrultusunda birçok hibrit bileşik geliştirilmiştir [207]. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, NAMPT'ı inhibe eden ve aynı zamanda DNA'yı alkilleyebilen ilk dual etkili bileşikler bildirilmiştir [208]. Bu çalışmada, klorambusilin (**64**) *N,N*-bis(2-kloroetil)amin farmakofor grubu, FK866 ile birleştirilerek, Bileşik **65** (NAMPT $\text{IC}_{50}=0,16$ nM) ve Bileşik **66** (NAMPT $\text{IC}_{50}=0,15$ nM) tasarlanmıştır. Bileşik **66**, fare CT-26 kolorektal karsinomu, B16 melanoma, Hepa 1-6 karaciğer kanseri hücre hatlarında; ayrıca insan LN-18 glioblastom, A549 akciğer, NCI-H1299 akciğer, HCT116 kolorektal, MDA-MB-231 meme, HepG2

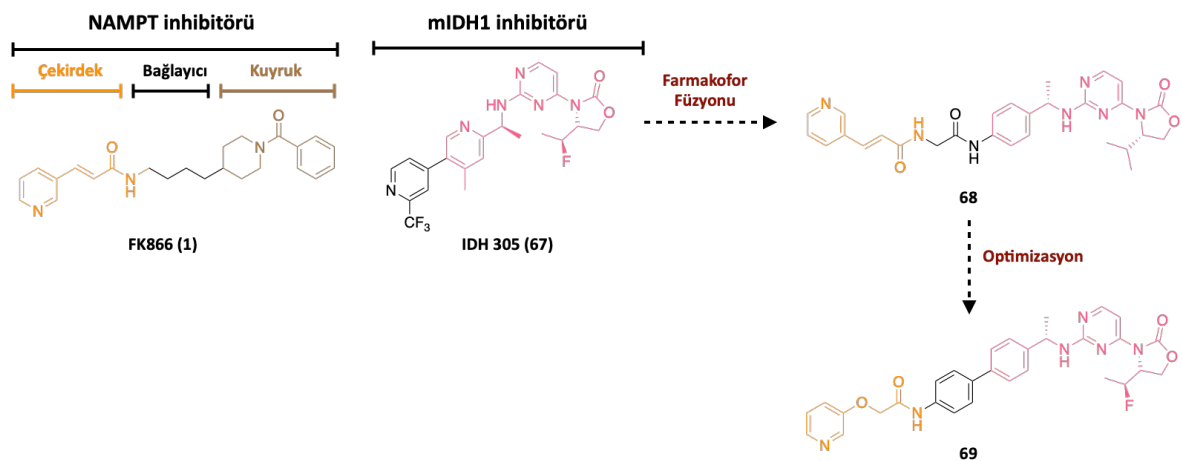
karaciğer ve PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde FK866 ve klorambusil ile karşılaştırıldığında daha yüksek *in vitro* antitümör aktivite göstermiştir. Ayrıca, fare CT-26 kolon kanseri ksenograft modelinde, aynı dozlarda FK866 ve klorambusil ile karşılaştırıldığında, Bileşik **66**'nın farelerin vücut ağırlığında kayba neden olmadan daha güçlü *in vivo* antitümör etki sağladığı belirlenmiştir. Ek olarak, Bileşik **66**'nın antitümör etkisinin, DNA hasarına bağlı NAD^+ tükenmesi ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Şekil 2.30).



Şekil 2.30. Bileşik 65 ve 66'nin tasarım stratejisi

Magnezyum bağımlı IDH enzimleri, NADP^+ veya NAD^{++} kofaktör olarak kullanarak TCA döngüsünde izositratın oksidatif dekarboksilasyonunu katalizleyerek alfa-ketoglutarat (α -KG) oluşumunu sağlamaktadır [209, 210]. IDH enzimleri, IDH1-IDH3 olmak üzere üç alt tipe ayrılır; benzer enzimatik aktivitelere sahip olmalarına rağmen hücresel lokalizasyonları ve işlevleri bakımından farklılık gösterirler [211, 212]. Bu izoenzimler arasında özellikle IDH1 ve IDH2'nin tümör oluşumuyla daha yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. IDH1 enziminde rastlanan en yaygın mutasyonlar (R132H ve R132C), glioblastom, akut miyeloid lösemi, kolanjiokarsinom ve kondrosarkom gibi çeşitli tümör türlerinde tespit edilmiştir [213-217]. Bu mutasyonlar, mutant IDH1 (mIDH1) enziminin α -KG'yi D-2-hidroksiglutarata (D-2HG) dönüştürmesine ve bu süreçte NADPH 'ı NADP^{++} 'a oksitlemesine neden olmaktadır [218]. Onkometabolit olarak kabul edilen D-2HG'nin hücre içinde birikimi, α -KG bağımlı dioksijenaz enzimlerini inhibe etmektedir. Bu da histon ve DNA demetilasyon süreçlerini baskılayarak epigenetik düzensizliklere, gen ekspresyonunda bozulmalara ve hücresel farklılaşmanın anormal şekilde ilerlemesine yol açarak tümör gelişimine katkıda bulunmaktadır [209, 211, 218].

Tümör gelişimi üzerindeki etkileri nedeniyle, mutant IDH1 (mIDH1) inhibitörlerinin keşfine yönelik birçok çalışma ile çeşitli mIDH1 inhibitörleri geliştirilmiştir [209, 211]. Bu inhibitörlerden ivosidenib ve olutasidenib, tedaviye dirençli veya tekrarlayan akut miyeloid lösemi hastalarının tedavisi için FDA onayı almıştır [219, 220]. Klinik kullanıma olan mIDH1 inhibitörleri için özellikle katı tümörlerdeki düşük tedavi etkinliği ve zamanla gelişen ilaç direnci önemli kısıtlamalar oluşturmaktadır. Bu sorunların üstesinden gelmek amacıyla Xiaoming ve arkadaşları, dual NAMPT/mIDH1 inhibitörleri tasarlamıştır [209]. Bu kapsamda, NAMPT inhibitörü FK866'nın farmakoforik grupları ile mIDH1 inhibitörü IDH 305'in (67) 3-pirimidin-4-il-oksazolidin-2-on iskeleti birleştirilerek, Bileşik 68 (NAMPT IC_{50} =15,07 nM; mIDH1-R132H IC_{50} =175,3 nM; mIDH1-R132C IC_{50} =362,5 nM; IDH1-WT IC_{50} =4,43 μ M) tasarlamıştır. Ardından gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen Bileşik 69, mIDH1 (mIDH1^{R132H} IC_{50} =14,93 nM; mIDH1^{R132C} IC_{50} =56,97 nM) ve NAMPT (IC_{50} =12,56 nM) enzimleri üzerinde güçlü bir inhibisyon etki sağlayarak, yabani tip (WT) IDH1 enzimine karşı yüksek seçicilik (IDH1-WT IC_{50} =5,79 μ M) göstermiştir. Ayrıca, bu bileşiğin kan-beyin bariyerini geçme kapasitesi araştırılmış ve merkezi sinir sistemine ulaşabildiği doğrulanmıştır. Bileşik 69'un insan U87 MG IDH1^{R132H} glioblastoma hücre hattında da etkili olduğu (IC_{50} =0,32 μ M) saptanmıştır. Fare U87 MG IDH1^{R132H} glioma tümör modelinde yapılan *in vivo* çalışmalarda bu bileşiğin, tümör büyümesini anlamlı düzeyde baskıladığı, kilo kaybını azalttığı ve sağkalım süresini uzattığı gösterilmiştir (Şekil 2.31) [209].



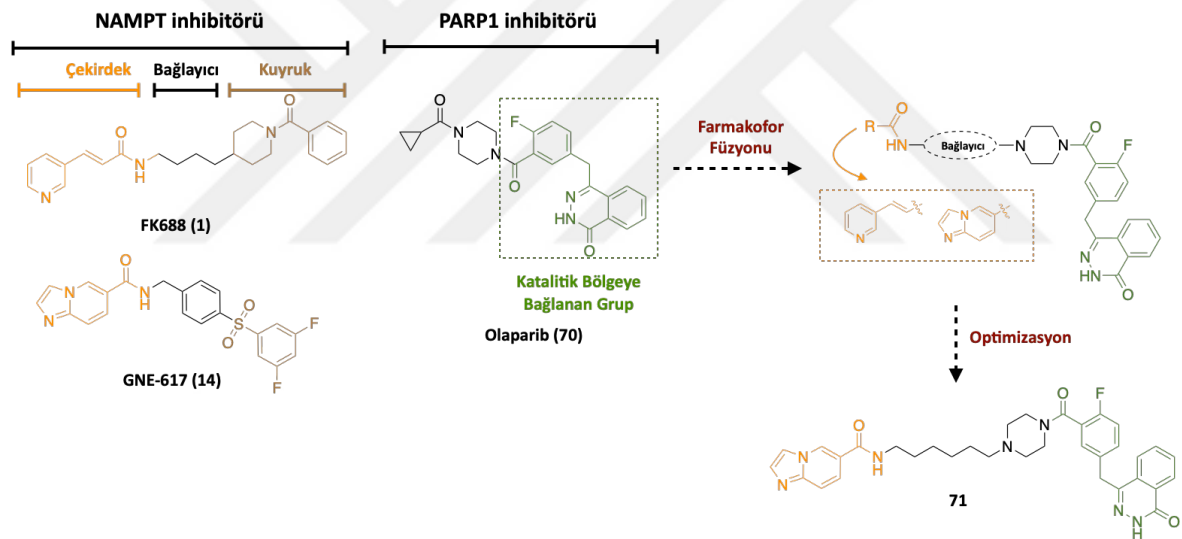
Şekil 2.31. Bileşik 68 ve 69'un tasarım stratejisi

NAMPT inhibisyonuna ek olarak PARP1 inhibisyonunun sağlanması, son yıllarda öne çıkan terapötik stratejilerden biri haline gelmiştir. NAD⁺'ı kosubstrat olarak kullanan PARP1, proteinlerin poli(ADP-ribozil)asyonunu katalizlemekte ve DNA tek veya çift sarmal kırıklarını tanıyarak DNA onarımında görev almaktadır [221]. Kanser hücreleri, yüksek çoğalma hızları nedeniyle DNA hasarına karşı daha hassas olup, DNA onarım mekanizmalarına büyük ölçüde bağımlıdır [222]. Özellikle meme kanseri hücrelerinde meme kanseri geni 1/2 (BRCA 1/2) gen mutasyonları, DNA onarım süreçlerini aksatmakta ve DNA kırıklarının birikmesine yol açmaktadır. Çeşitli çalışmalar, birçok kanser türünde PARP1 ekspresyonunun arttığını ve PARP1 inhibisyonunun tümör büyümesini ve metastazı baskıladığını göstermiştir. Bu nedenle PARP1, kanser tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olarak kabul edilmiştir [223]. PARP1 inhibitörü olaparib (**70**) (Şekil 2.32), BRCA1/2 mutasyon taşıyan HER2-negatif metastatik meme kanseri hastalarında, standart kemoterapiye kıyasla daha yüksek yanıt oranları ve progresyonsuz sağkalım süresi sağlaması nedeniyle FDA onayı almıştır [224]. Bununla birlikte, BRCA1/2 mutasyonu taşımayan meme kanseri hastalarında olaparibin sınırlı etkisi gözlemlenmiş olup, bu grup için alternatif tedavi stratejilere halen ihtiyaç duyulmaktadır.

PARP1'in fonksiyonlarını sürdürebilmesi için hücrel NAD⁺ seviyelerinin yeterli düzeyde olması gerekmektedir; bu seviyelerdeki düşüş, PARP1'in aktivitesini, dolayısıyla hücre canlılığı, enerji metabolizması ve DNA hasar stresine karşı cevap kapasitesini olumsuz etkilemektedir [225]. Ayrıca, NAMPT inhibisyonunun BRCA1/2 ve Rad51 ve DNA replikasyonu ile DNA hasar yanıtında görev alan diğer genlerin ekspresyonunu baskıladığı da bildirilmiştir [22]. Bu bulgular ışığında, NAMPT ve PARP inhibisyonunun birlikte sağlanması, antikanser tedavi için yeni bir strateji olarak değerlendirilmiş; NAMPT ve PARP1 inhibitörlerinin bir arada kullanımının *in vivo* BRCA mutasyonu olmayan meme kanseri, Ewing sarkomu ve over kanseri ksenograft fare modelleri üzerinde sinerjik bir şekilde antikanser etki gösterdiği kanıtlanmıştır [226-228].

Bu çerçevede, 2021 yılında patentlenip 2025 yılında yayımlanan bir çalışmada, PARP1 inhibitörü olaparib (**70**) (PARP1 IC₅₀=1,4 nM) ile NAMPT inhibitörü FK866 veya GNE-617 (NAMPT IC₅₀=13 nM) yapılarından hareketle dual NAMPT/PARP1 inhibitörleri geliştirilmiştir [229, 230]. Bileşiklerin tasarımı, FK866'nın (E)-3-(piridin-3-il)akrilamit ve GNE-617'nin

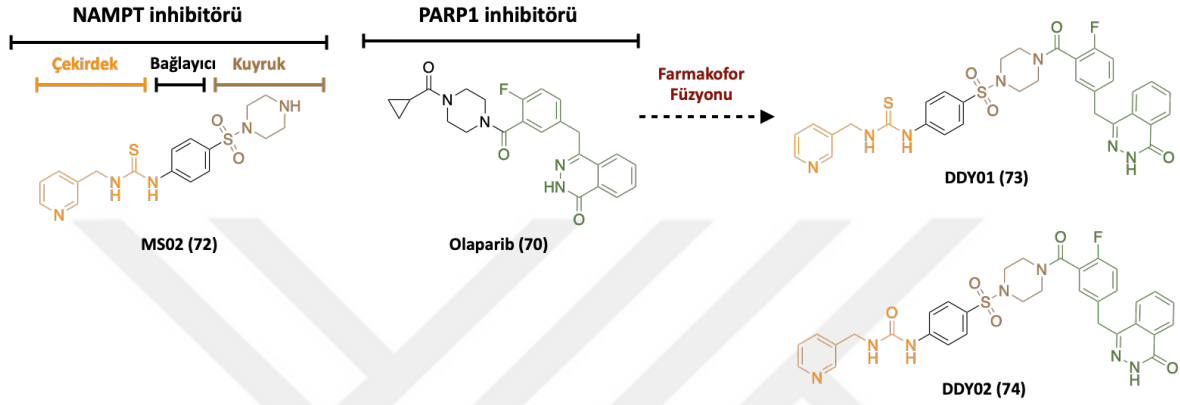
imidazo[1,2-*a*]piridin-6-karboksamit grubu ile olaparibin PARP1 katalitik bölgesine bağlanan grubu, çeşitli bağlayıcılarla birleştirilmiştir. Elde edilen bileşikler arasında Bileşik **71**'in (NAMPT IC_{50} =18 nM, PARP1 IC_{50} =0,8 nM), *in vitro* NAMPT ve PARP1 enzim inhibisyon aktiviteleri açısından en yüksek potansiyele sahip bileşik olarak öne çıkmıştır. Bu bileşik, insan BRCA-mutant MDA-MB-436 ve BRCA-mutant olmayan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında referans molekül GNE-617'ye kıyasla daha güçlü antiproliferatif etki göstermiştir (MDA-MB-436 IC_{50} =0,96 μ M; MDA-MB-231 IC_{50} =0,7 μ M). Ayrıca Bileşik **71**'in, BRCA-mutant olmayan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde GNE-617 ve olaparibin tek başına veya kombinasyon halinde uygulanmasına kıyasla daha yüksek apoptoz indüksiyonu sağladığı ve antimigrasyon etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (Şekil 2.32) [229, 230].



Şekil 2.32. Bileşik 71'in tasarım stratejisi

Diğer bir çalışmada, Wen ve arkadaşları, NAMPT inhibitörü MS02'nin (**72**) kuyruk grubunda yer alan ve PARP1 inhibitörü olaparibde bulunan piperazin halkasını, her iki hedef için gerekli farmakoforik grupları birleştirilmek için köprü olarak kullanmıştır. Bu tasarım stratejisiyle, tiyüre türevi DDY01 (**73**) (%83 NAMPT inhibisyonu; PARP1 IC_{50} =9 nM) ve üre türevi DDY02 (**74**) (NAMPT IC_{50} =10 nM; PARP1 IC_{50} =50 nM) bileşikler elde edilmiştir (Şekil 2.33). Yapılan *in vitro* proliferasyon testleri, DDY02'nin (**74**) olaparibe dirençli insan MDA-

MB468 meme kanseri hücre hatları üzerinde güçlü antiproliferatif etki ($IC_{50}=4,43 \mu M$) sağladığını ve bu etkinin öncelikle NAMPT inhibisyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, DDY02'nin bu hücrelerde PARP1 inhibisyonu yoluyla DNA hasarını artırarak apoptozu indüklediği, hücre döngüsünün ilerlemesini durdurduğu ve hücre göçünü engellediği gösterilmiştir [231].

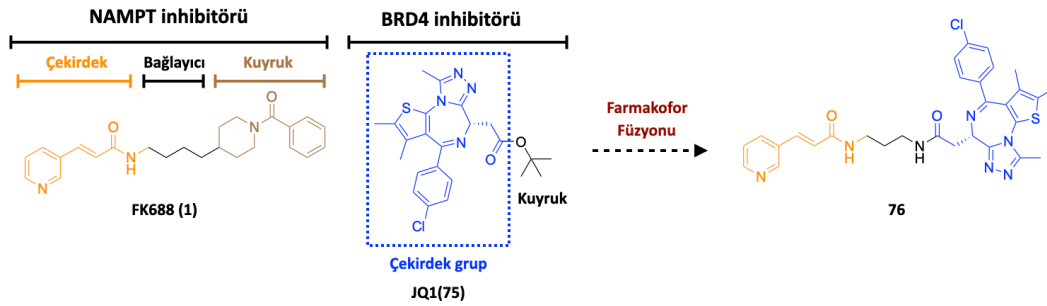


Şekil 2.33. DDY01 (73) ve DDY02'nin (74) tasarım stratejisi

Bromodomain içeren protein 4 (BRD4), bromodomain ve ekstra terminal bölge (BET) ailesinin bir üyesi olup, asetillenmiş histon lizin kalıntılarını okuyarak gen ekspresyonunu arttırmaktadır [232]. BRD4'ün aşırı eksprese edilmesi birçok kanser türü ile ilişkilendirilmiş, BRD4 inhibisyonunun tümör büyümesini etkili biçimde baskılayabildiği bildirilmiştir [233]. Bu nedenle BRD4, kanser tedavisinde önemli bir epigenetik hedef olarak değerlendirilmiş; çok sayıda BRD4 inhibitörü bildirilmiştir [234]. Hematolojik kanserler veya katı tümörler için klinik deneme aşamasında olan BRD4 inhibitörlerinin umut vadeden antitümör etkiler sergilemesine rağmen, monoterapi olarak terapötik etkinliklerinin düşük kaldığı ve yan etkilerle birlikte ilaç direncinin geliştiği rapor edilmiştir [235, 236].

Yin ve arkadaşları tarafından, karaciğer kanserinde NAPRT aracılığıyla NAD^+ düzeylerinde meydana gelen artışın, NAMPT inhibitörlerine karşı gelişen dirençte rol oynayan bir mekanizma olması nedeniyle, NAMPT ve NAPRT'nin eşzamanlı hedeflenmesinin ilaç direncini aşmak için uygun bir strateji olarak değerlendirilmiştir [237]. Bu stratejiyi doğrulamak amacıyla yürüttükleri çalışmada, BRD4 inhibitörü JQ1'in (75) NAMPT inhibitörü FK866 ile kombinasyonunun NAPRT ekspresyonunu baskılayarak, hem kurtarma yolağı hem

de Preiss-Handler yolu üzerinden NAD⁺ sentezinin inhibe edildiği gösterilmiştir [238]. Ayrıca, bu kombinasyonun insan Hep3B karaciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, inhibitörlerin tek başına kullanımına kıyasla daha etkili bir şekilde azalttığı (JQ1 IC₅₀=5 µM; FK866 IC₅₀=53,67 µM; JQ1+FK866 (1:1) IC₅₀=1,55 µM) ve apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Bu umut verici sonuçlardan hareketle araştırmacılar, çok hedefli ilaç tasarımı yaklaşımını benimseyerek NAMPT/BRD4 dual inhibitörlerinin geliştirilmesini amaçlamış; bu doğrultuda FK866'nın ve JQ1'in NAMPT ve BRD4 inhibisyonu için önemli olan kısımları çeşitli bağlayıcı gruplarla birleştirilmiştir (Şekil 2.34). Farmakoforik grupların birleştirilmesi sonucu elde edilen dual NAMPT/BRD4 inhibitörü Bileşik 76'nın (NAMPT IC₅₀=35 nM; BRD4 IC₅₀=58 nM) insan Hep3B karaciğer kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif etki göstererek (IC₅₀=2,37 µM) hücre göçünü engellediği ve apoptoza neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, *in vivo* HCCLM3 ksenograft fare modelinde belirgin bir toksisite oluşturmada güçlü bir antikanser etki sergilediği gösterilmiştir [238].

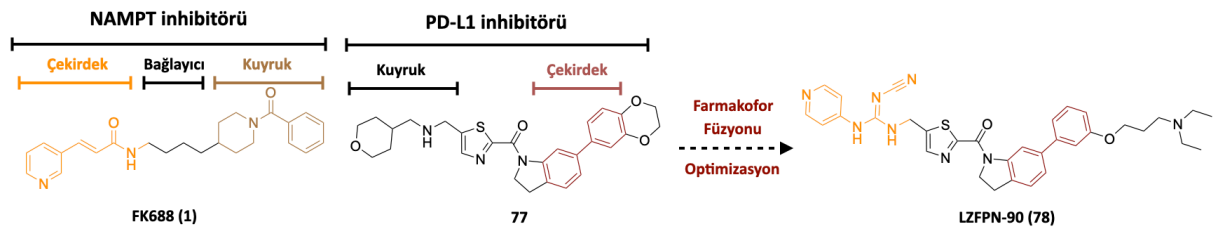


Şekil 2.34. Bileşik 76'nın tasarım stratejisi

Kanser ile ilişkili diğer bir hedef olan programlanmış hücre ölümü proteini-1 (PD-1), sitokinlerin etkisiyle immün ve tümör hücrelerinde eksprese edilmekte olup, hücre yüzeyinde bulunan programlanmış hücre ölümü ligandı-1 (PD-L1) ile etkileşerek T hücrelerinin aktivitesini baskılamakta ve bu yolla immün yanıtın düzenlenmesinde inhibitör olarak rol oynamaktadır [239]. Tümör hücrelerinde PD-L1'in aşırı eksprese edilmesi ise tümörlerin immün sistemden kaçışını kolaylaştırarak kanser tedavisini olumsuz yönde etkilemektedir [240]. Bu nedenle PD-1/PD-L1'nin etkileşimi, kanser tedavisinde kritik bir hedef olarak öne çıkmış, bu etkileşimin inhibitörlerle engellenmesinin T hücre aktivitesini

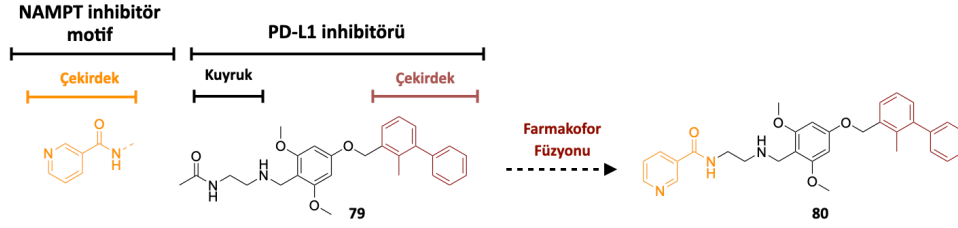
ve antitümör immün yanıtını anlamlı düzeyde artırdığı ortaya konmuştur [239]. Diğer yandan, tümör mikroçevresinin immün baskılayıcı özellikleri nedeniyle de PD-1/PD-L1 inhibitörlerinin etkinliği çoğu zaman sınırlı kalmakta; bazı hastalarda primer direnç gözlenirken, bazı hastalarda ise başlangıçta alınan yanıtlar zamanla edinilmiş direnç gelişimi ile kaybolmaktadır [240].

Yapılan çalışmalarda, NAMPT enziminin tümör hücrelerinin immün yanıtı kaçışında merkezi bir rol oynadığı ve bu durumun PD-L1 inhibitörlerine karşı direnç gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir [241]. Dolayısıyla, Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PD-L1 inhibisyonu ile eşzamanlı NAMPT inhibisyonunun sağlanması, immünoterapötik etkinliği potansiyelize edebilecek yenilikçi bir tedavi stratejisi olarak değerlendirilerek dual etkili PD-L1/NAMPT inhibitörler geliştirilmiştir. FK866'nın 3-(piridin-3-il)akrilamit yapısı ile PD-L1 inhibitörünün (77) aktivite için önemli olduğu bilinen bifenil çekirdeği birleştirilerek, optimizasyon çalışmaları sonucunda LZFPN-90 (78) adlı dual NAMPT/PD-L1 inhibitörü (NAMPT IC_{50} =13 nM; PD-L1 IC_{50} =28 nM) elde edilmiştir (Şekil 2.35). LZFPN-90'nin (78) *in vitro* insan A2780 over, HCT-116 kolon, LLC akciğer kanser hücrelerinde T hücrelerinin aktivasyonunu sağlayarak hücre büyümesini inhibe ettiği, hücre döngüsünü engellediği ve apoptozu indüklediği belirlenmiştir [242].



Şekil 2.35. Bileşik 78'in tasarım stratejisi

2025 yılında gerçekleşen diğer bir çalışmada ise, NAMPT inhibisyonu için önemli olduğu bildirilen piridin-3-karboksamit çekirdeği, PD-L1 inhibitörünün (79) kuyruk kısmı ile birleştirilerek dual NAMPT/PD-L1 inhibitörü Bileşik 80 (NAMPT IC_{50} =63 nM; PD-L1 IC_{50} =0,582 μ M) elde edilmiştir (Şekil 2.36). Bileşik 80'in *in vivo* fare B16-F10 melanoma modelinde, tümör büyümesini anti-PD-L1 monoklonal antikorlara kıyasla daha etkili şekilde baskıladığı gösterilmiştir [243].



Şekil 2.36. Bileşik 80'in tasarım stratejisi

2.5. Sirtuinler ve SIRT1

HDAC'lar, histon ve histon olmayan proteinlerdeki ϵ -N-asetil lizin kalıntılarından asetil gruplarını uzaklaştıran, epigenetik düzenleyici enzim ailesi olarak tanımlanmaktadır. HDAC'lar, kofaktör bağımlılıklarına göre çinko bağımlı sınıf I, II ve IV HDAC'lar ve NAD⁺ bağımlı sınıf III HDAC'lar yani sirtuinler olarak iki ana grup altında sınıflandırılmaktadır [136].

Bakteriden insana kadar birçok organizmada evrimsel olarak korunan sirtuin genleri, ilk kez 1979 yılında *Saccharomyces cerevisiae*'den izole edilmiş ve eşleşme tipi lokuslar, telomerler ile ribozomal DNA'nın (rDNA) transkripsiyonel sessizleşmesini düzenlediği gösterilmiştir. Bu gen, başlangıçta mitokondri düzenleyici faktör 1 (MAR1) olarak adlandırılmıştır [244]. İzleyen yıllarda, bu genin dört farklı homoloğu tanımlanmış ve *Sir* (sessiz enformasyon düzenleyici) 1-4 olarak adlandırılmıştır [245]. İlk çalışmalarda, bu genler arasında *Sir2* geninin, *S. cerevisiae* kromozom XII üzerinde tekrarlanan 100-200 kopya ribozomal ribonükleik asit (rRNA) genleri arasındaki rekombinasyonu baskılayan tek *Sir* geni olduğunu gösterilmiştir [246]. 1991 yılında, *Sir2*'nin telomere yakın genlerin bir parçası olduğu bilinirken, 1993 yılında telomerlerde ve çiftleşme tipi lokuslarda bulunan sessiz bölgelerin, N-terminal lizin kalıntılarından düşük asetilasyon düzeyine sahip histonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir [247, 248]. *Sir2* geninin aşırı ekspresyonunun belirgin düzeyde histon deasetilasyonuna neden olması, bu geni diğer *Sir* genlerinden ayıran bir özellik olarak öne çıkmıştır [249]. 1995 yılında, *S. cerevisiae*'de *Sir2* geni ile yüksek homoloji gösteren HST1-4 genleri keşfedilmiş, bu genlerin çiftleşme tipi lokus ve telomerlerde sessizleştirme, hücre döngüsünün ilerlemesi ve genom bütünlüğünün korunması gibi süreçlerde rol oynadığı ortaya konmuştur [250]. Maya türlerinde *Sir2* homologlarının keşfedilmesinden kısa bir

süre sonra, bakterilerden bitkilere ve memelilere kadar birçok organizmalarda benzer genlerin tanımlanmasıyla bu gen ailesi günümüzde “sirtuinler” olarak adlandırılmaktadır.

1999 yılında yapılan bir çalışmada, *Sir2* geninin silinmesinin maya hücrelerinde replikatif yaşam süresinin azalttığı, buna karşılık genin aşırı eksprese edildiği hücrelerde yaşam süresini uzadığı bildirilmiştir [251]. Yaşam süresindeki bu uzamanın, *Sir2* aracılığıyla rDNA’daki aşırı sessizleşmenin sağlanması ve buna bağlı olarak hücrelerde yaşlanmaya neden olan ekstrakromozomal rDNA halkalarının üretiminde azalma ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür [252]. Aynı yıl Frye tarafından yapılan bir çalışmada, insan *Sir2* homologlarının ADP-riboziltransferaz aktivitesi gösterdiği keşfedilmiştir [253]. Bu çalışmayı takiben Imai ve arkadaşları, maya ve fare *Sir2* proteinlerinin histon H3 ve H4 peptitlerinde NAD⁺ bağımlı lizin deasetilasyonu gerçekleştirdiğini, bunun da gen sessizleşmesini sağladığını, rekombinasyonu baskıladığını ve *in vivo* yaşam süresini uzattığını bildirmiştir [254].

Memelilerde SIRT1-SIRT7 olarak adlandırılan yedi farklı *Sir2* homologu tanımlanmıştır. Bu NAD⁺ bağımlı enzimlerin her bir üyesi, korunmuş 275 amino asitlik bir katalitik merkeze ve farklı uzunluk ve dizilimde N- ve C-terminal bölgelerine sahiptir [255]. Bu yapısal farklılıklar, her bir sirtuinin substrat spesifitesi, doku ekspresyon paterni, hücresel lokalizasyonu, enzimatik aktivitesi ve hedef proteinleri açısından farklılık göstermesine neden olmaktadır [256]. Memeli sirtuinlerinin tümü yalnızca deasetilaz aktivitesi göstermekle kalmayıp; aynı zamanda farklı açıl gruplarını da uzaklaştırarak deasetilaz aktivitesi sergilemektedir. Bu fonksiyonel çeşitlilik sayesinde sirtuinler; oksidatif stres, DNA onarımı, genomik stabilite, hücre yaşaması, apoptoz, metabolizma, yaşlanma ve yaşam süresi gibi bir çok biyolojik süreçte görev almaktadır [257].

Maya *Sir2* proteiniyle en yüksek dizilim benzerliğine sahip ve en kapsamlı şekilde çalışılmış olan SIRT1, esas olarak çekirdekte lokalize olmakla birlikte, hücresel stres veya insülin sinyal yolağının inhibisyonu gibi durumlarda sitoplazmaya geçebilmektedir [258]. SIRT1; histon H1K26 ve H4K16 ile histon olmayan proteinlerin deasetilasyonunu sağlayarak, DNA hasarı, apoptoz, sirkadiyen ritim, insülin sekresyonu, enflamasyon, oksidatif stres, mitokondri aktivitesi, metabolizma ve stres cevabı gibi birçok süreci düzenlemektedir [259, 260]. Ayrıca SIRT1; kanser, enflamasyon kaynaklı hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, karaciğer

fonksiyonu ve rejenerasyonu, kök hücre farklılaşması ve primer fibroblastlarda replikatif yaşlanma gibi pek çok patolojik durumla da ilişkilendirilmiştir [261-264].

SIRT2 ağırlıklı olarak sitoplazmada lokalizedir; ancak hücre döngüsünün G₂/M faz geçişi sırasında çekirdeğe taşınmaktadır [265]. SIRT2, deasetilaz aktivitesinin yanı sıra demiristolaz, 4-oksononanoilaz ve ADP-ribozilaz aktiviteleri de göstermektedir. SIRT2, α -tubulin filamentlerinin deasetilasyonu yoluyla mikrotübül stabilitesini, dolayısıyla da hücre hareketliliği, hücre göçü ve hücre bölünmesi gibi süreçleri düzenlemektedir. Ayrıca, agresom yolları üzerinden proteinlerin degradasyonunu etkilemektedir [266]. Hücre döngüsünün G₂/M fazında, sentrozom ve mitotik iğ gibi yapılarla etkileşime girerek erken metafaz sırasında mitotik kontrolü sağlamaktadır [267]. Aynı zamanda genomik stabilite ve kromatin yeniden yapılanmasını artırarak birçok kanser hücresinde tümör oluşumunu baskılayabileceği düşünülmektedir. Ancak, p53 gibi apoptoza aracılık eden transkripsiyon faktörlerini deasetile ederek tümör gelişimini destekleyebileceği de öne sürülmüştür [268]. SIRT2'nin ayrıca yaşlanma, yaşam süresi ve nörodejenerasyon ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [269].

Çoğunlukla mitokondride lokalize olan SIRT3, deasetilaz aktivitesi aracılığıyla birçok enzimi hedef alarak metabolik dengenin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. SIRT3; uzun zincirli açıl-KoA dehidrogenaz (LCAD), TCA siklusunda yer alan enzimler, IDH ve glutamat dehidrogenaz (GDH) gibi hedef proteinlerin deasetilasyonunu sağlayarak yağ asidi oksidasyonu yollarını düzenlemektedir. Ayrıca oksidatif fosforilasyon sürecinde elektron transportu üzerinde etkili olan SIRT3, mitokondriyal antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz 2'nin (SOD2) aktivasyonunu sağlayarak oksidatif strese karşı hücresel koruma sağlamaktadır [270].

Mitokondriyal bir sirtuin olan SIRT4, mono-ADP-riboziltransferaz aktivitesi göstermesinin yanında, deglutarilaz, deasetilaz ve lipoamidaz aktiviteleri de sergilemektedir. Tip 2 diyabet, nörodejenerasyon ve kanser gibi yaşlanma ilişkili hastalıkları gelişimi ile yakından ilişkili olan SIRT4, mitokondriyal fonksiyonların düzenlenmesinde görev almaktadır [271].

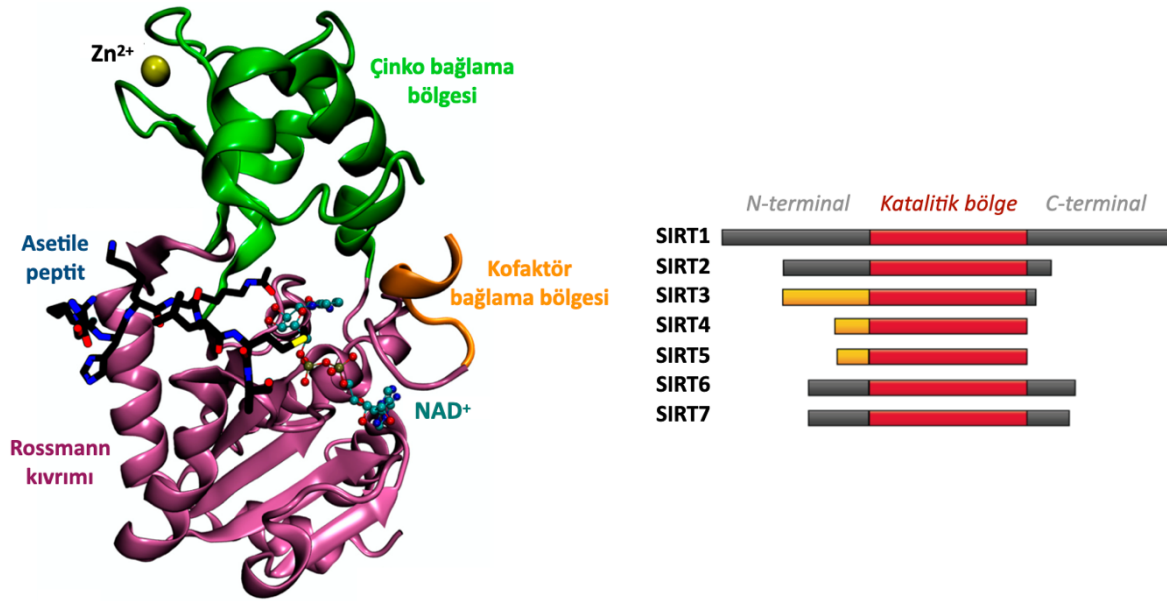
Diğer bir mitokondriyal sirtuin olan SIRT5, lizin kalıntılarından asetil, glutaril, süksinil ve malonil gruplarını uzaklaştırarak aktivite göstermektedir [272, 273]. Hücrel homeostazın önemli bir düzenleyicisi olan SIRT5, glikoliz, TCA siklusu, yağ asidi oksidasyonu, elektron transport zinciri ve ROS detoksifikasyonu gibi çeşitli metabolik yollarda görev alan proteinleri modüle etmektedir. Ayrıca, miyokardiyal enerji dengesini düzenleyerek kalp fizyolojisi ve stres cevabı üzerinde de etkili olduğu bildirilmektedir [272].

Çekirdekte lokalize olan SIRT6, histon H3K9 ve H3K56'yı deasetile ederek genom stabilitesi ve telomer fonksiyonunu sağlamaktadır [274]. Aynı zamanda, oksidatif stres koşullarında PARP1'i aktive ederek DNA onarımını desteklemektedir [275]. SIRT6'nın ayrıca mono-ADP-ribozil transferaz, depalmitoilaz ve demiristilaz aktiviteleri de bulunmaktadır [276].

SIRT ailesinin en son keşfedilen üyesi olan SIRT7, çekirdekte bulunmakta ve diğer insan sirtuin homologlarından farklı olarak, RNA polimeraz I transkripsiyonunu aktive ederek RNA metabolizmasını düzenlemektedir [277]. Ayrıca, çekirdekte bulunan proteinlerin ve histon H3K18'in deasetilasyonu ile, tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu baskılayarak metastatik yolları aktive ettiği de bildirilmiştir [278].

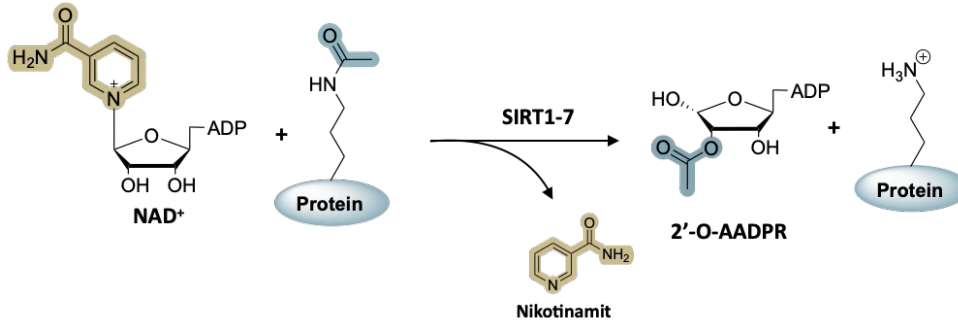
Günümüze kadar, birçok insan SIRT enziminin yüksek çözünürlüklü yapısı, apo formda veya bir substrat veya inhibitör bağlı holo formda literatürde bildirilmiş ve bu yapılar, sirtuinlerin katalitik mekanizmasının aydınlatılmasına önemli katkılar sağlamıştır [279, 280]. Amino asit dizilimlerinin hizalanması sonucunda, tüm sirtuinlerin yaklaşık 275 amino asitlik ortak bir katalitik merkeze sahip olduğu belirlenmiştir. Oval bir şekle sahip bu katalitik merkez, dört döngü ile birbirine bağlanan büyük ve küçük olmak üzere iki alt bölgeden oluşmaktadır. Büyük alt bölge, NAD⁺/NADH bağlayıcı proteinlere özgü yapısal olarak homoloji gösteren Rossmann kıvrımından, küçük alt bölge ise, yapısal olarak çeşitlilik gösteren çinko bağlanma bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 2.37). Sirtuin homologlarında, çinko bağlanma bölgesinde gözlenen yapısal farklılıkların, enzimlerin substrat spesifiteleri üzerinde belirleyici olduğu düşünülmektedir. Rossmann kıvrımı ile çinko bağlanma bölgesini birbirine bağlayan döngüler, bu iki alt bölge arasında belirgin bir yarı oluşturarak katalitik aktif bölgeyi şekillendirmekte, NAD⁺ ve substratlar bu bölgeye bağlanmaktadır [281]. Substrat, hidrofobik bir tünel şeklindeki aktif bölgeye bağlandığında; ana peptid zinciri, Rossmann

kıvrımı ve onunla çinko bağlanma bölgesi arasında konumlanan β -zincirleri ile β -tabakası benzeri etkileşimler kurmaktadır. Bu etkileşimler, substratın Rossmann kıvrımı ile çinko bağlanma bölgesi arasında bağlantı kurmasına ve asetile lizin yan zincirinin hidrofobik tünele yönlenmesine neden olmaktadır. Asetile lizin substratının bağlanması sonucunda enzim, açık formdan kapalı forma geçmekte ve bu konformasyon değişikliği, substrat bağlanma tüneline yakın konumdaki kofaktör bağlanma bölgesine NAD^+ 'ın doğru şekilde yerleşmesini sağlamaktadır [280].



Şekil 2.37. SIRT1-SIRT7 genel yapısını oluşturan bölgeler

Sirtuinlerin, NAD^+ bağımlı substrat deasetilasyonu mekanizmasının ilk basamağında, ADP-riboz ve NAM grupları arasındaki glikozidik bağ, asetile lizin substratının yan zincirindeki nükleofilik atağı ile kırılmaktadır. Asetile peptit ve ADP-ribozun oluşturduğu ara basamaklar sonucunda, asetil grubunun ADP-riboz yapısına transferi gerçekleşmekte ve reaksiyon; 2'-O-asetil-ADP-riboz (2'-O-AADPR), deasetile lizin substratı ve NAM olmak üzere üç temel ürünün oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.38). Bu mekanizma, sirtuinlerin NAD^+ düzeylerine duyarlılığını ve metabolik durumla bağlantılı olarak genetik ve epigenetik düzenlemelerdeki rollerini açıklayan temel biyokimyasal süreçtir [282].



Şekil 2.38. Sirtuinlerin deasetilasyon mekanizması

Memeli sirtuinlerinin en iyi tanımlanmış üyesi olan SIRT1, H1K26, H3K9, H3K14, H3K18, H3K56, H4K16, H4K12 ve H4K16 histon kalıntıların deasetilasyonunu sağlayarak, kromatin yapısını ve gen regülasyonunu düzenlemektedir [262, 283]. Ayrıca, histon olmayan proteinlerin aktivitesini de düzenleyerek DNA onarımı, kromatin düzenlenmesi, gen ekspresyonu, hücre farklılaşması ve proliferasyonu, yaşlanma, endokrin sinyalizasyonu, stres cevabı, metabolizma, sirkadiyen ritim ve karsinogenez gibi biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır [283]. SIRT1, p53, FOXO1, FOXO3, FOXO4, HSF1, HIF-1 α , NF- κ B, p300 ve TIP60 gibi transkripsiyon faktörlerini ve ATG, LKB1 gibi transkripsiyonel olmayan proteinleri doğrudan deasetile edebilmektedir. Ayrıca dolaylı yollarla PPAR α/γ , MyoD gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini artırabilmektedir [262].

Hücrel SIRT1 ekspresyonu, p53 ve kanserde HIC1 gibi baskılayıcı transkripsiyon faktörleri tarafından azaltılabilirken; E2F1, FOXO3a ve c-Myc gibi transkripsiyon faktörleri aracılığıyla artırılabilir. Bazı hücrel durumlarda ise negatif geribildirim döngüsü ile de düzenlenebilir [262]. Bununla birlikte, NAD⁺ bağımlı bir enzim olması nedeniyle hücrel NAD⁺/NADH oranı, SIRT1 aktivitesi üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, birçok patofizyolojik süreçte SIRT1 aktivitesinin bu oranla orantılı olarak arttığı [284] ve açlık veya kalori kısıtlaması durumlarında SIRT1 ekspresyon seviyesinin yükseldiği gösterilmiş, bu durumun hücrel yaşam süresinin uzaması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [285].

Hücrel homeostazın korunmasında merkezi bir rol üstlenen SIRT1, farklı dokularda çeşitli fizyolojik süreçleri düzenlenmektedir. Örneğin, karaciğer, iskelet kası ve adipoz dokuda

mitokondriyal biyogenezi artırmakta ve yağ ile kolesterol katabolizmasını uyararak metabolik dengeyi sağlamaktadır [286]. Ayrıca, pankreas hücrelerinde insülin salınması ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyerek, glukoz homeostazını düzenlemektedir [287]. Bu özellikleri nedeniyle SIRT1; yaşlanma ilişkili hastalıklar, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik sendrom, enflamasyon, yaşam süresi ve kanser gibi çeşitli patolojilerle ilişkilendirilmiştir [256, 262, 283, 288, 289].

SIRT1'in kanserle ilişkisini aydınlatmaya yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda, bu izoformun farklı protein substratlarını hedef alarak tümör gelişiminin çeşitli evrelerinde hem baskılayıcı hem de destekleyici roller üstlenebildiği gösterilmiştir [283].

Glioblastoma, kolon, prostat, over, mide ve meme kanserlerinde gözlemlenen düşük SIRT1 ekspresyonu, tümör baskılayıcı özelliğiyle ilişkilendirilmiştir [290-293]. Bazı durumlarda ise SIRT1, tümör gelişimini destekleyici veya engelleyici transkripsiyon faktörlerini düzenleyerek antitümör etkinliğe katkı sağlamaktadır. SIRT1, DNA onarımı ve genomik stabilitenin korunmasına yönelik olarak WRN, Ku70, APE1, XPA ve XPC gibi proteinleri deasetile ederek, özellikle kronik miyeloid lösemi, akciğer ve deri kanserlerinde tümör oluşumunun baskılanmasında rol oynamaktadır [294, 295]. Kolon kanserinde, SIRT1 ekspresyonunun artışı, E2F1 transkripsiyon faktörünü aktive ederek hücre döngüsünü düzenleyen kinazların ekspresyonunu artırmakta ve hücre proliferasyonu sınırlamaktadır [296]. Ayrıca β -kateninin deasetilasyonu ile çekirdekte lokalize olan onkogenik formunun sitoplazmaya kaymasına neden olarak proliferasyonu azalmaktadır [297]. SIRT1, immün hücrelerde ise farklı transkripsiyon faktörlerini hedefleyerek, tümör çevresi inflamasyonu ve tümör oluşumunun baskılanmasını da sağlamaktadır [262]. Bu faktörlerden enflamatuvar cevabı düzenleyen NF- κ B'nin p65 alt ünitesini deasetile ederek transaktivasyonu inhibe etmekte ve NF- κ B aracılı TNF- α ve IL-1 gibi pro-enflamatuvar genlerin aktivasyonunu inhibe etmektedir [298].

Diğer yandan, SIRT1, p53'ün deasetilasyonunu sağlayarak kanser hücrelerinde DNA hasarı ve oksidatif stres cevabı karşısında hücre siklusunun durması veya apoptoz gibi tümör

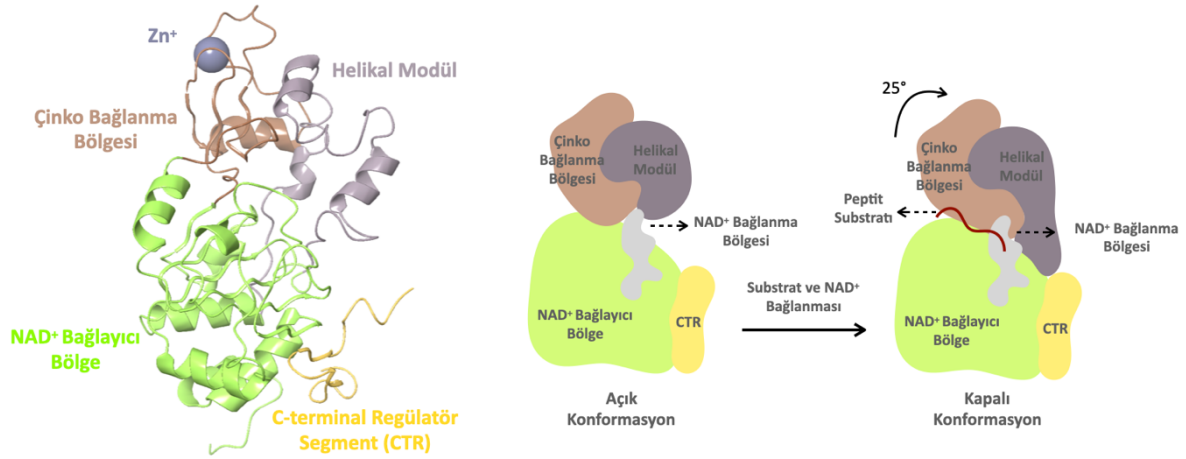
baskılayıcı süreçleri inhibe etmektedir [299]. Akciğer, prostat, deri, kolon, bazal hücreli ve skuamöz hücreli karsinomlar, akut ve kronik miyeloid lösemi, lenfoblastik lenfoma gibi bazı kanser türlerinde SIRT1'in aşırı ekspresyonu tespit edilmiş ve bu durum tümör progresyonu, apoptoz, otofaji, DNA onarımı ve hücrel homeostazla ilişkilendirilmiştir [300]. Özellikle bazı kolon kanserlerinde artan SIRT1 ekspresyonu, c-Myc artışıyla bağlantılı olarak malign prognozu olumsuz yönde etkilemektedir [301].

Kanser hücrelerinde SIRT1 enziminin aktivasyonunun mu yoksa inhibisyonunun mu daha etkili olacağı konusu halen netlik kazanmamış olup, bu durum günümüzde tartışmalı bir alan olarak dikkat çekmektedir [283, 302]. SIRT1 fonksiyonu, kanserin hücre tipi, evresi, genetik yapısı ve tümör mikroçevresi gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bu nedenle, SIRT1 enzime yönelik terapötik stratejilerin, spesifik kanser türlerinin biyolojik özelliklerine göre özelleştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

SIRT1, düzenlediği çok sayıda biyolojik süreç sayesinde kanser, enflamasyon, diyabet, yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif bozukluklar gibi çeşitli patolojik durumların tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olarak dikkat çekmektedir. Bu doğrultuda, SIRT1 enziminin moleküler işleyiş mekanizmasını daha iyi anlamak ve yeni SIRT1 modülatörlerinin keşfini desteklemek amacıyla, enzimin apo formuna ek olarak substrat, inhibitör, aktivatör ve kofaktör ile kompleks halinde X-ışını kristal yapıları aydınlatılmış ve detaylı yapısal analizleri gerçekleştirilmiştir [303-305].

İnsan SIRT1 enzimi 747 amino asitten oluşmakta olup, tüm sirtuinlerde ortak olan katalitik bölgeye ek olarak, N- ve C-terminal bölgeleri ile C-terminalde yer alan, katalitik bölgeyi stabilize eden ve enzim aktivitesini düzenleyen C-terminal regülatör segmentini (CTR) içermektedir [305]. Katalitik bölge, 277 amino asitten oluşmakta ve küçük ile büyük olmak üzere iki alt bölgeye ayrılmaktadır. Büyük alt bölgede, NAD⁺ bağlayıcı bölge olarak da adlandırılan ve yapısal olarak tüm sirtuin izoformlarında korunan geniş bir Rossmann kıvrımı yer alırken; küçük alt bölgede ise 269-324 arasındaki amino asit dizisinden oluşan helikal modül ve 362-419 arasındaki diziden oluşan çinko bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Ayrıca, 641-665 aralığında bulunan ve 25 amino asitten oluşan CTR, NAD⁺ bağlayıcı bölgenin alt kenarına bağlanarak bu bölgenin merkezi paralel β -tabakasını tamamlamaktadır. SIRT1

enziminin apo formu, substrat ve kofaktör bağlı formuna kıyasla açık bir konformasyon sergilemektedir. Bu açık konformasyonda, küçük alt bölge yaklaşık 25°'lik bir dönüş hareketi yapmakta ve bu hareket, büyük ve küçük alt bölgeler arasındaki etkileşimlerin bozulmasına ve yaklaşık 15 Å genişliğinde bir yarığın oluşmasına neden olmaktadır. NAD⁺ ve substrat bağlandığında benzer bir dönüş hareketi ile kapalı konformasyon oluşmaktadır. Bu konformasyonda büyük ve küçük alt bölgeler arasındaki etkileşimler sayesinde yarık tamamen kapanmakta ve substratın yerleştiği hidrofobik bir tünel meydana gelmektedir (Şekil 2.39) [305].



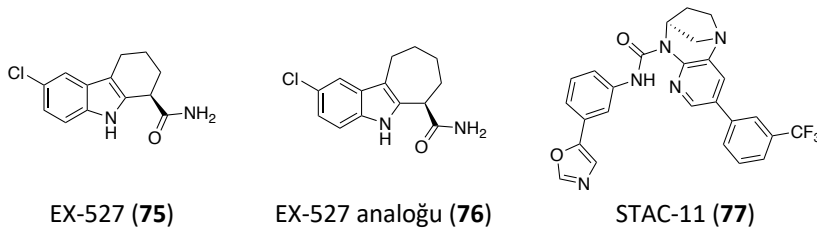
Şekil 2.39. İnsan SIRT1 enzim bölgeleri ile bu bölgelerin açık ve kapalı konformasyonları

SIRT1 enzim yapısının ve mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik araştırmaların yanı sıra, SIRT1 inhibitörleri ve aktivatörlerinin enzim aktivitesini nasıl modüle ettiğini anlamaya yönelik de çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, indol türevi bir SIRT1 inhibitörü olan EX-527'nin (**75**) aktif bölge etkileşimlerinin anlaşılabilmesi amacıyla insan SIRT1 enzimi EX-527 analogu (**76**) ile (Şekil 2.40) kompleks hâlinde kristalize edilerek (PDB: 4I5I) yapısı çözülmüş ve bu analogun SIRT1 katalitik aktif bölgesinde yer alan NAD⁺ bağlanma bölgesine yerleştiği belirlenmiştir. Bu bağlanma bölgesinde, yedi üyeli halkaya bağlı amit grubunun Asp348 ile hidrojen bağları meydana getirdiği; indol halkasının ise Asn346 ile su aracılı (HOH712) hidrojen bağı ve Phe273 ile π - π etkileşimleri oluşturduğu gösterilmiştir (Şekil 2.41). Aynı çalışmada, EX-527 analogunun NAD⁺'ın NAM grubunun yerini alarak, fonksiyonel bir taklit mekanizmasıyla etki gösterdiği

ortaya koyulmuştur. Bu yer değiştirme, NAM grubunun ortamdaki uzaklaşmasına ve kofaktörün aktif olmayan, alternatif bir bağlanma konformasyonu kazanmasına neden olmaktadır. Bu yeni konformasyonel yapı, asetile lizin substratının bağlanmasını sterik olarak engellemekte ve SIRT1 enziminin inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır [304].

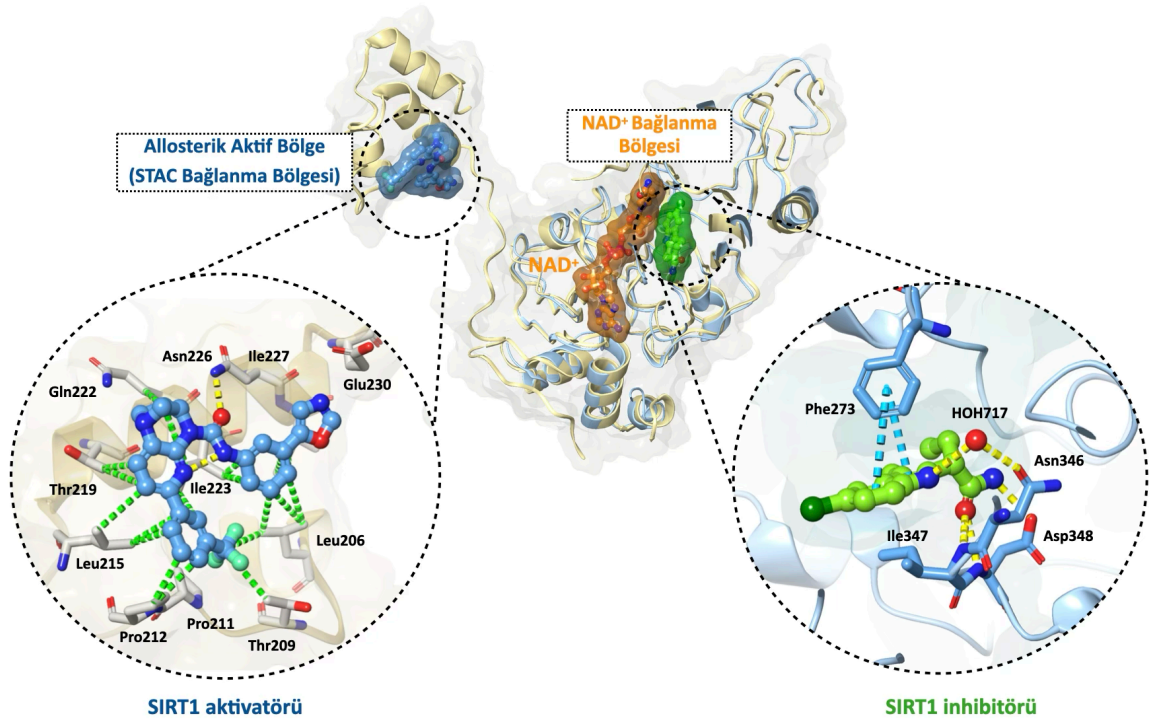
Milne ve arkadaşları, inhibitörlerin aksine aktivatör bileşiklerin NAD^+ bağlanma bölgesinden farklı, allosterik bir bölgeye bağlandığını öne sürmüştür. SIRT1'in kısaltılmış versiyonları ile elde edilen veriler doğrultusunda, N-terminal bölgede yer alan 183-225 numaralı amino asitlerin bu allosterik bölgeyi oluşturduğu ve aktivatörlerin bu bölgeye bağlandığı belirlenmiştir [306]. Hubbard ve arkadaşlarının daha sonraki çalışmalarında ise, allosterik bölgede yer alan Glu230 amino asidinin, sirtuin aktivatör bileşikleri (STAC) aracılı aktivasyon için kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir [307].

STAC'ların insan SIRT1 enzimine nasıl bağlandığını aydınlatmaya yönelik gerçekleştirilen çalışmalar, tam uzunluktaki enzimin yüksek çözünürlüklü X-ışını kristal yapısının elde edilememesi nedeniyle ilerleyememiştir. Bu sorunu aşmak amacıyla, 2015 yılında, bazal katalitik aktivitesi ve STAC'lar tarafından aktive edilebilme özellikleri açısından tam uzunluktaki enzimle biyokimyasal olarak eşdeğer olan insan SIRT1 varyantı (mini-SIRT1) geliştirilmiş ve STAC-11 (**77**) (Şekil 2.40) adlı SIRT1 aktivatörü ile kompleks halindeki X-ışını kristal yapısı (PDB: 4ZZJ) aydınlatılmıştır [303]. Bu çalışma, önceki bulgularla uyumlu şekilde, SIRT1 N-terminal bölgesinde yer alan 183-229 arasındaki amino asitleri içeren bölgeyi STAC bağlanma bölgesi olarak tanımlamış; ayrıca Glu230 mutasyonunun, mini-SIRT1 yapısında da tam uzunluktaki enzimde olduğu gibi STAC aracılı aktivasyonu zayıflattığını göstermiştir.



Şekil 2.40. EX-527 (**75**), EX-527 analogu (**76**) ve STAC-11'nin (**77**) kimyasal yapıları

Mini-SIRT1:STAC-11 kompleksinde, STAC-11'in bağlandığı ana bölgenin, yüzeyde yer alan sığ bir hidrofobik çöküntü şeklinde olduğu ve bu bölgenin derin bir ek hidrofobik cebe sahip olduğu belirlenmiştir. STAC-11, bu bölgeye intramoleküler hidrojen bağlarının yardımıyla düzlemsel bir konformasyonda yerleşmekte ve triflorometil grubu, hidrofobik alt cepte konumlanmaktadır. Aktivatör, bu bölgede Leu206, Thr209, Pro211, Pro212, Leu215, Thr219, Ile223 ve Ile227 amino asitleriyle hidrofobik etkileşimler oluştururken; karbonil grubunun oksijen atomu, Asn226 ile hidrojen bağı yapmaktadır (Şekil 2.41). Yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları sonucunda ise, bölgede yer alan amino asitlerden Thr219, Ile223, Asn226 ve Ile227'nin STAC'larla doğrudan etkileşim kurduğu, özellikle Ile223'ün enzim aktivitesi için kritik öneme sahip olduğu kanıtlanmıştır. Buna karşılık, Gln222 ve Val224'ün aktivatör bağlanmasında doğrudan bir rol oynamadığı, Glu230 amino asidinin ise SIRT1 aktivasyonu için kritik olduğu saptanmıştır. Glu230 üzerinde yapılan mutagenез, STAC'ların maksimum aktivasyon düzeyini önemli ölçüde azaltmış, ancak EC₅₀ değerinde yalnızca sınırlı bir değişiklik meydana gelmiştir. Bu bulgular, Glu230'un taşıdığı negatif yükün, SIRT1'in aktive olmuş konformasyonunun oluşumu veya stabilizasyonunda önemli bir rol oynayabileceğini; muhtemelen Glu230'un pozitif yüklü Arg446 amino asidi ile elektrostatik bir etkileşime girdiğini düşündürmektedir [303, 308].



Şekil 2.41. İnsan SIRT1 X-ışını kristal yapılarının (PDB: 4ZZJ (sarı) ve 4I5I (mavi)) üst üste çakıştırılmış hali ile SIRT1 aktivatörü STAC-11 (77) ve SIRT1 inhibitörü EX-527 analogunun (76) biyoaktif konformasyonları. Hidrojen bağı, π - π ve hidrofobik etkileşimler sırasıyla sarı, mavi ve yeşil renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

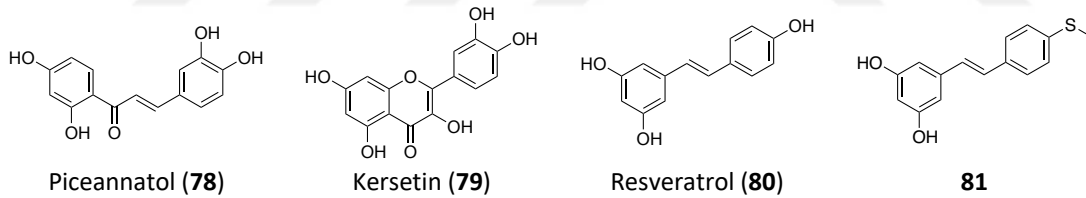
2.6. SIRT1 Aktivatörleri

Kanser, diyabet, Parkinson, Alzheimer gibi yaşlanma ilişkili hastalıkların yanı sıra metabolik ve enflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere, günümüze kadar SIRT1 enzimini hedefleyen birçok aktivatör ve inhibitör etkili bileşik literatürde bildirilmiştir [288, 309-312]. Sirtuin modülasyonuna yönelik yapılan ilk çalışmalar, memelilerde yaşam süresinin düzenlenmesi üzerine odaklanmıştır. Bu çalışmalarda, kalori kısıtlamasının SIRT1 ekspresyonunu artırdığı ve bunun sonucunda yaşam süresinin uzayabildiği gösterilmiştir [313]. Bu bulgulardan yola çıkarak birçok araştırmacı sirtuinleri aktive edebilecek bileşiklerin keşfine yönelik çalışmalar gerçekleştirmiştir [314].

2003 yılında Howitz ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, SIRT aktivatörlerine ulaşmak amacıyla küçük moleküller içeren bir bileşik kütüphanesi insan SIRT1 enzimi üzerindeki aktiviteleri belirlenerek taranmıştır [315]. İlk taramalar sonucunda, *in vitro* SIRT1 aktivitesini sırasıyla 5 ve 8 kat artırabilen polifenolik yapıya sahip piceannatol (**78**) ve

kersetin (**79**) bileşikler tanımlanmış ve bu bileşiklerin yapı-aktivite ilişkileri incelenmiştir. İkinci tarama çalışmasında ise, on beş yeni SIRT1 aktivatörü daha keşfedilmiş ve bu bileşikler, STAC olarak adlandırılmıştır. Bu bileşikler arasında yer alan ve SIRT1 aktivitesini 13 kat artırdığı bildirilen resveratrol (**80**), p53 proteininin deasetilasyonunu artırarak kalori kısıtlamasına benzer şekilde hücre hayatta kalımını desteklediği gösterilmiştir. Diğer çalışmalar ise, resveratrolün SIRT1 aktivasyonu aracılığıyla aksonal koruma sağladığını, yağ mobilizasyonunu teşvik ettiğini ve NF-κB'ye bağlı transkripsiyonel aktiviteyi inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Şekil 2.42) [316-318].

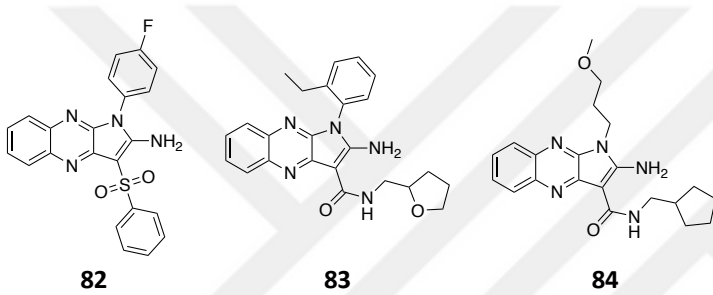
2006 yılında Yang ve arkadaşları, resveratrolün düşük biyoyararlanımı, düşük çözünürlüğü ve ışık ile oksidasyona karşı duyarlılığı gibi kısıtlamaları nedeniyle, daha potent, daha stabil ve organizmalarda yaşam süresini uzatma potansiyeline sahip yeni bileşikler tasarlamıştır. Bu amaçla, resveratrolün hidroksil grubu yerine daha az toksik bir tiyometil grubunun getirilmesiyle, resveratrol'den daha güçlü SIRT1 aktivasyonu sağlayabilen Bileşik **81** (Şekil 2.42) geliştirilmiştir.



Şekil 2.42. Piceannatol (**78**), kersetin (**79**), resveratrol (**80**) ve Bileşik **81**'in kimyasal yapıları

Resveratrolün farmakokinetik özelliklerini iyileştirme amacıyla Sirtris Pharmaceuticals (ABD) adlı bir biyoteknoloji ilaç şirketi, bileşiğin mikronize oral formülasyonunu (SRT501) üretmiştir. SRT501, tek başına veya bortezomib ile kombine halinde kolorektal kanser ve hepatik metastaz ile multipl miyelom tedavisinde değerlendirilmek üzere Faz I/II klinik denemelere alınmıştır (NCT00920803, NCT00920556). Ancak, tedavi sırasında gözlemlenen kusma, bulantı ve diyare gibi gastrointestinal yan etkileri nedeniyle klinik çalışmalar ilerletilememiştir [319, 320].

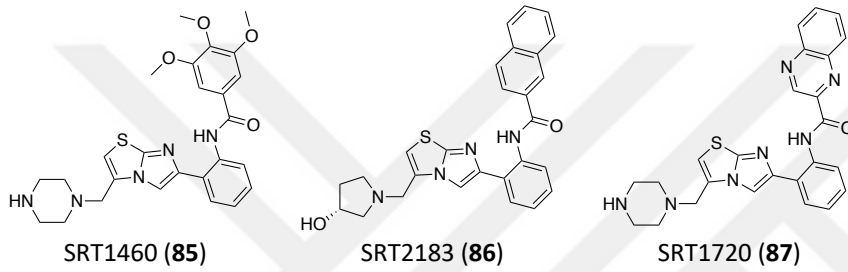
Sirtris Pharmaceuticals öncülüğünde birçok araştırmacı benzimidazol, imidazotiyazol, tiyazolopiridin ve üre türevi gibi polifenollerden farklı yapısal özellikler taşıyan sentetik SIRT1 aktivatörleri geliştirmiştir [306, 312, 321, 322]. 2006 yılında Nayagam ve arkadaşları, 14 700 bileşikle SIRT1 enzimine karşı HTS çalışması gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda, pirolokinoksalin türevi SIRT1 aktivatörlerine (Bileşik **82-84**) (Şekil 2.43) ulaşılmıştır. Elde edilen bu bileşiklerin, resveratrol ile benzer şekilde PPAR γ aracılığıyla yağ mobilizasyonunu artırdığı ve TNF- α tarafından indüklenen lipopolisakkarit yanıtını azalttığı gösterilmiştir. Bu etkiler doğrultusunda, söz konusu bileşiklerin obezite ve diyabet gibi hastalıkların tedavisinde potansiyel birer aday olabileceği öne sürülmüştür [323].



Şekil 2.43. Bileşik 82-84'ün kimyasal yapıları

Sirtris Pharmaceuticals tarafından 2007 yılında gerçekleştirilen HTS çalışması kapsamında resveratrol'den farklı bileşikler seçilmiş [306], elde edilen sonuçlar imidazo[1,2-*b*]tiyazol türevi SRT1460 (**85**) ($EC_{1,5}=2,9 \mu M$ ve maksimum aktivasyon=%447), SRT2183 (**86**) ($EC_{1,5}=0,36 \mu M$ ve maksimum aktivasyon=%296) ve SRT1720 (**87**) ($EC_{1,5}=0,16 \mu M$ ve maksimum aktivasyon=%781) bileşiklerinin resveratrol'den daha iyi *in vitro* SIRT1 enzim aktivitesi ($EC_{1,5}=46,2 \mu M$ ve maksimum aktivasyon=%201) sergilediğini göstermiştir (Şekil 2.44). Biyolojik değerlendirmeler, SRT2183'ün p53 asetilasyon düzeyini azalttığını, bu etkinin SIRT1 inhibitörü EX-527 ile geri döndürülebildiğini gösterilmiştir [306]. SRT2183'ün sonraki çalışmalarda glioma ve over kanseri hücreleri üzerinde hücre döngüsünün durması, apoptoz ve otofajiyi indüklemesi gibi antikanser etkiler gösterdiği bildirilmiştir [324, 325]. Aynı çalışmada, SRT1720'nin insülin dirençli fare modellerinde iyi bir farmakokinetik bir profil sergilediği ve hiperinsülinemi durumunu anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir. SRT1720 için daha sonra yapılan çalışmalarda ise, bu bileşiğin hERG ve sitokrom P450 inhibisyonu gerçekleştirmediği ve hedef dışı proteinlere karşı seçiciliğinin kabul edilebilir

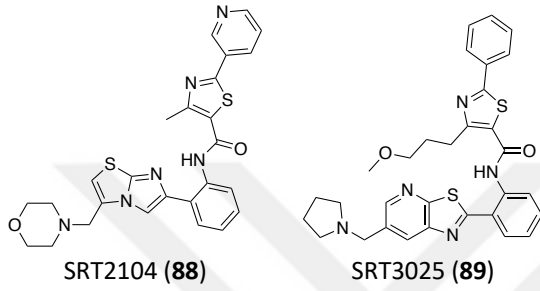
düzeyde olduğu belirtilmiştir [322]. SRT1720'nin umut vadeci bu özellikleri doğrultusunda, multiple miyelom üzerindeki etkileri prelinik modellerde incelenmiştir. Yapılan çalışmalar, bu bileşiğin hem standart tedavilere hem de bortezomibe dirençli multiple miyelom hücrelerinde, kanser olmayan hücre canlılığını önemli ölçüde etkilemeden hücre proliferasyonunu baskılandığını ve apoptozu indüklediğini göstermiştir. Hayvan tümör modellerinde ise SRT1720'nin tümör büyümesini anlamlı şekilde baskıladığı, ayrıca bortezomib veya deksametazon ile kombine halde kullanıldığında sitotoksik aktivitenin arttığı saptanmıştır [326].



Şekil 2.44. SRT1460 (85), SRT2183 (86) ve SRT1720'nin (87) kimyasal yapıları

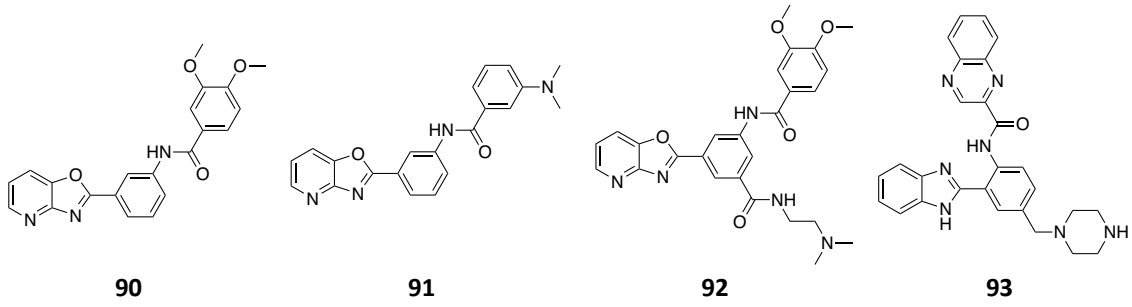
Sentetik SIRT1 aktivatörlerinin ikinci nesli, imidazo[1,2-*b*]tiyazol yapısındaki bileşiklerin optimize edilmesiyle geliştirilen SRT2104 (88) ve SRT3025 (89) (Şekil 2.45) ile temsil edilmektedir [327]. SRT2104, insan ve fare karaciğeri mitokondrileri ve plazmada sergilediği stabilite, güçlü biyokimyasal aktivitesi ve uygun farmakokinetik özellikleri ile ileri araştırmalar için ümit verici bir aday olarak belirlenmiştir. 2008 yılında başlatılan klinik değerlendirmeler kapsamında SRT2104, sağlıklı bireylerde uygun doz aralığının belirlenmesine yönelik Faz I klinik denemelere (NCT00920660), tip 2 diyabet (NCT00937326), psöriyazis (NCT01154101) hastalarında Faz II klinik denemelere; sepsis (NCT01014117), iskelet kası atrofisi (NCT01039909) ve ülseratif kolit (NCT01453491) için ise Faz I klinik denemelere dahil edilmiştir. Klinik çalışmaların yanı sıra, SRT2104 için günümüze kadar Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı, beyin iskemisi, optik sinir dejeneratif hastalıklar, depresyon, lipid metabolizması bozuklukları, kardiyovasküler hastalıklar, kas-iskelet sistemi hastalıkları ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi birçok hastalık modelinde çok sayıda klinik öncesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir [328].

Ancak tüm bu çalışmalara rağmen, SRT2104'ün kullanımı hala temel araştırma düzeyinde kalmış ve klinik gelişimi Faz II aşamasının ötesine geçememiştir. SRT2104'e benzer şekilde geliştirilen SRT3025 de klinik öncesi çalışmalarda farmakokinetik özellikleri ve güvenilirlik profili açısından olumlu değerlendirilmiş ve klinik çalışmalara alınmıştır (NCT01340911). Ancak, QT uzaması ve aritmi gibi kardiyak yan etkiler nedeniyle bu çalışmalar durdurulmuştur [329].



Şekil 2.45. SRT2104 (88) ve SRT3025'in (89) kimyasal yapıları

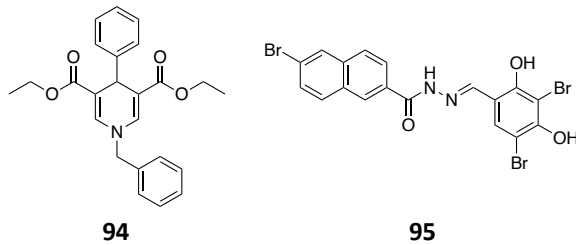
Bemis ve arkadaşları tarafından yürütülen bir diğer çalışmada, HTS çalışmasıyla oksazolo[4,5-*b*]piridin türevi yeni SIRT1 aktivatörleri tanımlanmıştır. Tarama sonucunda Bileşik **90** ($EC_{1,5}=6 \mu M$ ve maksimum aktivasyon=%240) ve Bileşik **91** ($EC_{1,5}=25 \mu M$ ve maksimum aktivasyon=%207) elde edilmiştir. Bu bileşiklerin hem biyolojik aktivitesini hem de sudaki çözünürlüğünü artırmak amacıyla, yapısal optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, merkezi fenil halkasına çözünürlüğü artırıcı amidoetildimetilamin grubu eklenerek tasarlanan Bileşik **92**'nin, iyi düzeyde bir SIRT1 aktivasyonu ($EC_{1,5}=0,7 \mu M$ ve maksimum aktivasyon=%240) sağladığı gösterilmiştir. Ardından, bisiklik halka sisteminde yapılan modifikasyonlarla benzimidazol ve azabenzimidazol türevi SIRT1 aktivatörleri elde edilmiş; bu türevler arasında en yüksek aktiviteye sahip olan Bileşik **93**'ün, yüksek düzeyde SIRT1 aktivasyonu ($EC_{1,5}=0,4 \mu M$ ve maksimum aktivasyon=%820) sağladığı gösterilmiştir (Şekil 2.46) [321].



Şekil 2.46. Bileşik 90-93'ün kimyasal yapıları

2009 yılında Mai ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 1,4-dihidropiridin türevi yeni SIRT modulatorleri keşfedilmiştir. Bu bileşikler arasında, N1 pozisyonunda benzil grubu taşıyan Bileşik **94**'ün (Şekil 2.47), hem SIRT1 ($EC_{1,5}=1 \mu M$), hem SIRT2 ($EC_{1,5}=25 \mu M$), hem de SIRT3 ($EC_{1,5} \sim 50 \mu M$) aktivatörü olarak işlev gösterdiği belirlenmiştir. Bileşik **94**'ün, fare C2C12 miyoblast hücrelerinde hücresel yaşlanmayı %40'a kadar azalttığı ve peroksizom proliferatör aktive edilmiş PGC-1 α aracılığıyla mitokondriyal fonksiyonu artırdığı bildirilmiştir [330].

Wu ve arkadaşlarının yürüttüğü bir başka çalışmada, resveratrol'den (SIRT1 $EC_{1,5}=23,6 \mu M$) daha güçlü SIRT1 aktivasyonu gösterebilen (SIRT $EC_{1,5}=1,6-7 \mu M$) bir seri diaril açilhidrazon türevi bileşik keşfedilmiştir. Bu serinin çeşitli analogları sentezlenmiş ve gerçekleştirilen yapısal optimizasyonlar sonucunda, naftalen halkası taşıyan Bileşik **95** (SIRT1 $EC_{1,5}=2,7 \mu M$) geliştirilmiştir (Şekil 2.47) [331].

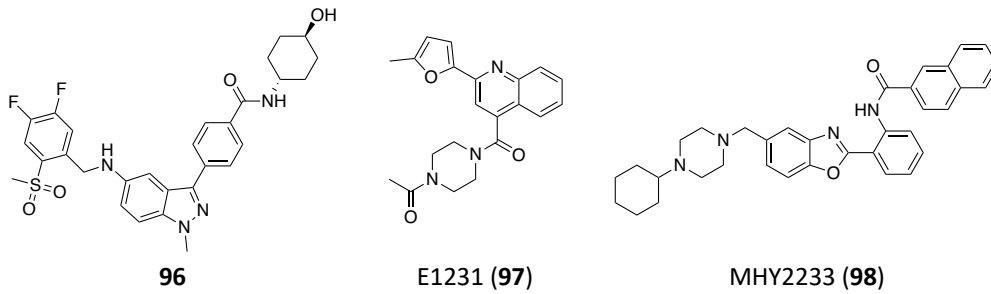


Şekil 2.47. Bileşik 94 ve 95'in kimyasal yapıları

2017 yılında Atobe ve arkadaşlarının kendi sentezledikleri bileşiklerden oluşan kütüphane üzerinde gerçekleştirdikleri taraması sonucunda, SIRT1 aktivasyonu sağlayan ($EC_{50}=1,49 \mu M$) 3-kinolil grubu taşıyan bir indazol türevi bileşik tanımlanmıştır. Yapı-aktivite ilişkisi çalışmaları sonucunda, *in vitro* osteogenez aktivitesi sergileyen Bileşik **96**'ya ($EC_{50}=0,4 \mu M$) ulaşılmıştır (Şekil 2.48) [332].

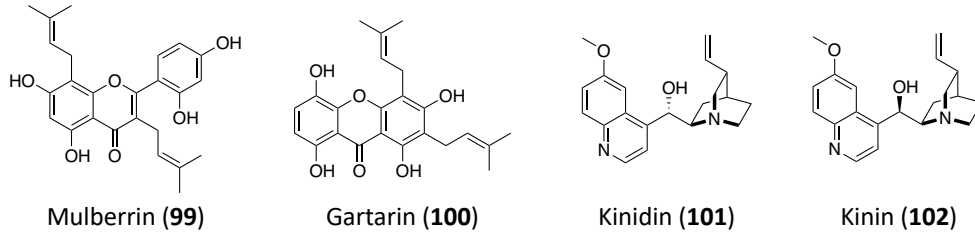
2018 yılında yapılan bir diğer çalışmada, HTS yöntemiyle piperazin 1,4-diamit türevi olan E1231 (**97**) adlı yeni bir SIRT1 aktivatörü ($EC_{50}=0,83 \mu M$) bildirilmiştir (Şekil 2.48). Bileşiğin kolesterol ve lipit metabolizması üzerindeki olumlu etkileri hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde doğrulamış ve etki mekanizmasına ilişkin incelemeler gerçekleştirilmiştir [333].

Aynı yıl yayınlanan diğer bir çalışmada ise, resveratrol ve SRT1720 gibi bilinen SIRT1 aktivatörlerinin yapısal özelliklerinden esinlenerek toplam on sekiz adet yeni benzoksazol türevi bileşik sentezlenmiştir. Bileşikler arasında, MHY2233 (**98**), resveratrol'den daha güçlü *in vitro* SIRT1 aktivasyonu sergilemiş; fare modellerinde lipit birikimini ve insülin direncini azaltmıştır (Şekil 2.48) [334].



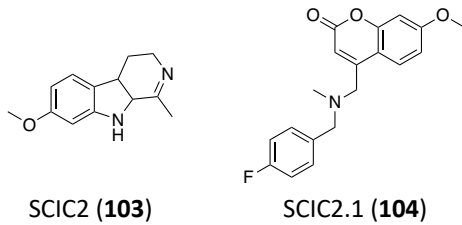
Şekil 2.48. Bileşik 96, E1231 (97) ve MHY2233'ün (98) kimyasal yapıları

2019 yılında yapılan bir çalışmada, SIRT1 enziminin allosterik aktif bölgesine bağlanan kokristalize ligandlar referans alınarak iki ayrı farmakofor model geliştirilmiş ve doğal bileşiklerden oluşan bir kütüphanede tarama yapılmıştır. Farmakofor uyumu gösteren bileşiklerin, moleküler docking ve moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilerek etkileşim kararlılıkları değerlendirilmiş ve mulberrin (**99**) ($EC_{50}=2,10 \mu M$), gartanin (**100**) ($EC_{50}=1,79 \mu M$), kinidin (**101**) ($EC_{50}=1,71 \mu M$), kinin (**102**) ($EC_{50}=1,14 \mu M$) bileşiklerinin (Şekil 2.49) SIRT1 aktivatörü olduğu belirlenmiştir [335].



Şekil 2.49. Mulberrin (99), gartarin (100), kinidin (101) ve kininin (102) kimyasal yapıları

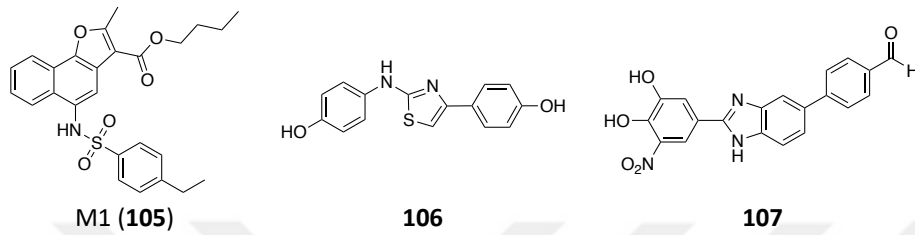
2020 yılında, geniş kapsamlı bir bileşik kütüphanesi üzerinde gerçekleştirilen HTS çalışması sonucunda, SCIC2 (**103**) adlı bileşiğin etkili bir SIRT1 aktivatörü ($EC_{50}=50\pm1,8 \mu M$, $K_d=26,4\pm0,6 \mu M$) olduğu gösterilmiştir. SCIC2'nin SIRT1 aktivatörü etkisini güçlendirmek amacıyla geliştirilen SCIC2.1 (**104**) bileşiğinin daha güçlü SIRT1 aktivitesi gösterdiği ($EC_{50}=36,83\pm2,23 \mu M$) belirlenmiştir. Hücresel düzeyde gerçekleştirilen çalışmalarda, her iki bileşiğin de hem kanser hücrelerinde hem de kanser olmayan hücrelerde hücre döngüsü ilerleyişini etkilemediği gözlemlenmiştir. Buna karşılık, SIRT1 aracılığıyla düzenlenen stres yanıtı mekanizmaları üzerinde belirgin bir artış sağladığı ve yaşlanmaya bağlı β -galaktozidaz aktivitesini azaltarak hücresel yaşlanma sürecinin baskılanmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Şekil 2.50) [336].



Şekil 2.50. SCIC2 (103) ve SCIC2.1'in (104) kimyasal yapıları

2021 yılında, ligand ve yapı temelli yöntemlerin bir arada kullanıldığı sanal tarama çalışması sonucunda, SIRT1 aktivatörü olan naftofuran türevi M1 (**105**) bileşiğine ulaşılmıştır. M1'in, glukoz ile indüklenen insan HK-2 kanser olmayan böbrek hücrelerindeki enflamasyonu, SIRT1/NF- κB (p65) sinyal yolağı üzerinden azalttığı gösterilmiştir. 2022 yılında keşfedilen tiyazol türevi Bileşik **106** ise, referans bileşik resveratrol'den daha yüksek düzeyde SIRT1 aktivasyonu sağlamış ve *in vivo* fare modellerinde belirgin kardiyoprotektif etkiler

göstermiştir [337]. 2024 yılında tamamlanan başka bir çalışmada, benzimidazol türevi SIRT1 aktivatörleri geliştirilmiş, bileşiklerin SIRT1 aktivasyonunda kritik rol oynayan Glu230 ve Arg446 amino asitleri ile etkileştiği moleküler docking çalışmaları ile gösterilmiştir. Seri içerisinde Bileşik **107**, sergilediği 6 μM 'lık EC_{50} değeri ile (maksimum aktivasyon oranı=%240,5) öne çıkmıştır (Şekil 2.51) [338].



Şekil 2.51. M1 (105), Bileşik 106 ve 107'nin kimyasal yapıları

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Moleküler modelleme çalışmaları, Schrödinger Küçük Molekül İlaç Keşfi Programı (Small-Molecule Drug Discovery Suite 2023-3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Farmakofor modelleme

Veri seti oluşturma ve bileşiklerin hizalanması

NAMPT inhibisyonu ve SIRT1 aktivasyonu için ayrı ayrı farmakofor modellerin oluşturulması amacıyla, insan NAMPT enzimi üzerinde inhibitör etkileri belirlenmiş toplamda 31 adet NAMPT inhibitörü [65-69, 93, 95, 100, 109, 111, 112, 114, 339-341] ve insan SIRT1 enzimi üzerinde aktivatör etkileri belirlenmiş toplamda 13 allosterik SIRT1 aktivatörü literatürden derlenerek iki ayrı veri seti oluşturulmuştur [306, 342, 343]. Bileşikler Schrödinger programının Maestro ara yüzünde çizilmiş ve LigPrep modülü ile varsayılan değerler kullanılarak bileşiklerin üç boyutlu yapıları hazırlanmıştır.

NAMPT inhibisyonu ve SIRT1 aktivasyonu için farmakofor modellerin oluşturma sürecinden önce, veri setleri Schrödinger programının “Ligand Alignment” modülü ile esnek konformasyonlarda ortak yapı iskeletleri temel alınarak hizalanmıştır. NAMPT inhibitörlerinden oluşan veri setinin hizalanması sırasında insan NAMPT X-ışını kristal yapılarına (PDB: 5U2M, 5U2N [100], 7PPE [68], 6ATB, 6AZJ, 6PEB [115], 4JNM [339], 4JR5 [65], 5KIT [344], 2GVJ [69], 4KFN, 4KFO [66], 4M6P [67], 4O0Z, 4O10, 4O13 [341], 4LWW, 4LTS [93], 4WQ6 [344]) bağlı olarak bulunan koligandların biyoaktif konformasyonları sabit tutulmuş, benzer kimyasal yapıda olan bileşiklerin hizalanmasında referans olarak kullanılmıştır. SIRT1 aktivatörlerinden oluşan veri setinin hizalanmasında ise SIRT1 X-ışını kristal yapısında (PDB: 4ZZJ [342]) bulunan STAC-11 adlı koliganda ait biyoaktif

konformasyon sabit tutulmuş; veri setinde yer alan SIRT1 aktivatörlerinin hizalanmasında bu konformasyon referans olarak kullanılmıştır.

Farmakofor hipotez oluşturma

Elde edilen hizalı veri setleri kullanılarak Schrödinger programının “Phase” modülünde yer alan “Developing Pharmacophore Hypothesis” protokolü ile NAMPT ve SIRT1 enzimlerine yönelik farmakofor hipotezler oluşturulmuştur. NAMPT inhibisyonu için farmakofor hipotezlerinin oluşturulmasında kullanılan bileşiklerin IC_{50} olarak bildirilen *in vitro* NAMPT inhibisyon değerleri pIC_{50} ($-\log(IC_{50})$) değerlerine çevrilmiş, bileşikler aktif (26 bileşik) ve inaktif set (5 bileşik) olarak gruplandırılmıştır (pIC_{50} değeri >5 : aktif; pIC_{50} değeri <5 : inaktif). SIRT1 aktivasyonu için farmakofor hipotezlerinin oluşturulmasında kullanılan veri seti (13 bileşik) için ise herhangi bir gruplama yapılmamıştır. İstenilen farmakofor özellikler, hidrojen bağı akseptörü (A), hidrojen bağı donörü (D), hidrofobik grup (H), negatif yüklü grup (N), pozitif yüklü grup (P), aromatik halka (R), aromatik vektör/alan (X) olarak tanımlanmış, bu özelliklere göre her iki hedef için de farmakofor hipotezler oluşturulmuştur. Oluşturulan farmakofor hipotezler çeşitli parametrelere göre puanlanmış, SIRT1 için aktif bileşiklerin, NAMPT için ise aktif ve inaktif bileşiklerin hipoteze katkısı temel alınarak sıralanmıştır. Bu sıralamalarda en iyi sonuç veren hipotezler, NAMPT ve SIRT1 hedefleri için iş akışında bir sonraki basamak için seçilmiştir.

Farmakofor hipotez doğrulama

NAMPT inhibisyonu ve SIRT1 aktivasyonu için seçilen farmakofor hipotezler, performans değerlendirmesi için aktif ve tuzak (decoy) bileşiklerden oluşan doğrulama setleri ile taranmıştır. 1250 adet NAMPT enzimine, 910 adet SIRT1 enzimine karşı inaktif olan tuzak bileşik “Decoy finder” programı [345] ile ZINC “drug-like” sanal kütüphanesi üzerinden elde edilmiştir. Ayrıca, veri setinde yer almayan 50 adet NAMPT inhibitörü ve 90 adet SIRT1 allosterik aktivatörü ile iki ayrı doğrulama seti oluşturulmuştur. NAMPT inhibisyonu için oluşturulan farmakofor hipotez, 1300 adet (50 aktif, 1250 tuzak), SIRT1 aktivasyonu için oluşturulan farmakofor hipotez ise 1000 adet (90 aktif, 910 tuzak) bileşikten oluşan doğrulama setleri ile taranarak, çıktılar uyum puanına göre sıralanmış ve üst sıralarda aktif

bileşiklerin yer alıp almadığı değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, hipotezlerin verimini ve yeterliliğini ortaya koyan doğruluk, hassasiyet, enrichment factor (EF), kümelenmiş eğri altında kalan alan (AUAC) ve goodness of hit score (GH) gibi istatistiksel göstergeler hesaplanmış ve receiver operating characteristic (ROC) analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ROC grafiklerinden model yorulma noktaları belirlenmiştir [346, 347]. Doğrulama basamağından başarıyla geçen hipotezler, hedef enzimler için farmakofor model olarak tanımlanmıştır.

3.1.2. Sanal tarama

ZINC “drug-like” sanal kütüphanesinde [348] bulunan üç boyutlu yapıdaki yaklaşık 10 milyon bileşik sıralı tarama yöntemi [349] ile sırasıyla SIRT1 ve NAMPT enzimleri için belirlenen doğrulanmış farmakofor modeller (Model NAMPT ve Model SIRT1) kullanılarak Schrödinger programının “Phase” modülünde yer alan “Ligand Screening” paneli ile konformerleri oluşturularak taranmıştır.

Önce 10 milyon bileşik, SIRT1 aktivasyonu için oluşturan doğrulanmış farmakofor model ile taranmış, elde edilen tarama çıktısı bileşikler filtreleme basamağına geçirilmiştir. İlk filtreleme aşamasında, ROC analizleri [350] sonucunda SIRT1 farmakofor modeli için belirlenen model yorulma noktası ve en iyi % aktif oranı veren yüzdelik dilim bir arada değerlendirilerek, model performansının bozulma gösterdiği ve aktif bileşiklerin yüksek oranda yer aldığı yüzdelik dilime göre sanal tarama çıktısı bileşikler değerlendirmeye alınmıştır. Daha sonra Lipinski 5 [351] ve Veber [352] kurallarına uygunluk, kiralite, ADMET, sentezlenebilme, reaktivite ve görsel inceleme gibi filtrelerle ikinci bir inceleme gerçekleştirilmiş ve tüm filtrelerden geçen sanal tarama çıktısı bileşikler bir sonraki basamağa iletilmiştir. Sonraki basamakta ise bileşikler, NAMPT inhibisyonu için oluşturulan farmakofor model ile taranmış, elde edilen tarama çıktısı bileşikler, NAMPT farmakofor modeli için belirlenen model yorulma noktası ve en iyi % aktif oranı veren yüzdelik dilim bir arada değerlendirilerek belirlenen yüzdelik dilime göre filtrelenmiştir. Filtrelenen bileşikler bir sonraki filtreleme basamağı olan moleküler docking basamağına iletilmiş ve bu

basamakta bileşikler bağlanma enerjisi (XP GScore) üzerinden değerlendirilmiştir. Ayrıca bileşiklerin SIRT1 enzimi allosterik aktif bölgesi ve NAMPT enzimi aktif bölgesinde yer alan amino asitler ile beklenen etkileşimlerin sağlanıp sağlanmadığı belirlenmiş ve farmakofor modellere uyumları da göz önüne alınarak bağlantı modları incelenmiştir. Her iki aktif bölgede de istenilen kriterleri sağlayan ortak bileşikler daha sonra Schrödinger programının “Canvas Similarity and Clustering” paneli ile “Lineer” tipte fingerprint, “Tanimato” benzerlik metriği ve “Complete” bağlantı metodu seçilerek gruplandırılmıştır [353]. Gruplandırma sonucunda her grubu temsil eden bileşikler satın alınmak üzere seçilmiştir.

3.1.3. Moleküler Docking

İnsan NAMPT X-ışını kristal yapıları (PDB: 4M6P [67], 4JNM [339], 4N9D [108]) ve insan SIRT1 X-ışını kristal yapısı (PDB: 4ZZJ [303]) RCSB Protein Data Bank veri tabanından indirilmiş, Schrödinger programının “Protein Preparation Wizard” modülü kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlık aşamasında aktif bölgedeki kristal su molekülleri (4M6P için HOH714, HOH751, HOH783, HOH807, HOH898, HOH916, HOH965, HOH1161, HOH1261; 4JNM için HOH731, HOH737, HOH873, HOH988; 4N9D için HOH722, HOH777, HOH933, HOH934) hariç tüm su molekülleri silinmiş, hidrojen atomları eklenmiş, eksik veya yanlış atom tipleri düzeltilmiştir. OPLS4 kuvvet alanı uygulanarak RMSD değeri en fazla 0,3 Å olacak şekilde enerji minimizasyonu yapılmıştır. Proteinlerin hazırlanması aşamasından sonra NAMPT X-ışını kristal yapısına bağlı inhibitör bileşikler ve SIRT1 X-ışını kristal yapısına bağlı aktivatör bileşik (STAC-11) seçilerek ilgili aktif bölgeleri koordinatlarıyla tanımlayan bir kutu (grid) Schrödinger programının “Receptor Grid Generation” paneliyle oluşturulmuştur. Bu aşamada van der Waals ölçeklendirme faktörü 1,00 ve yük parçalı kesme noktası 0,25 olarak tanımlanmıştır. Elde edilen reseptör grid dosyaları kaydedilerek Schrödinger programının “Glide” modülü ile moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kullanılacak moleküler docking protokolünün doğrulanması amacıyla, NAMPT X-ışını kristal yapısına bağlı inhibitörler ve SIRT1 X-ışını kristal yapısına bağlı aktivatör bileşik (STAC-11), enzim aktif bölgelerine tekrar yerleştirilmiş ve elde edilen docking konformasyonları ile biyoaktif konformasyonları karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda 0,2221 Å (PDB: 4M6P), 0,3111 Å (PDB: 4JNM), 0,9476 Å (PDB: 4N9D) ve 0,7158 Å (PDB: 4ZZJ) olarak hesaplanan RMSD değerleri kabul edilebilir düzeyde bulunmuştur. Bileşikler, grid dosyaları üzerinden

insan NAMPT ve insan SIRT1 kristal yapılarına doğrulanmış docking protokolü ile Extra Precision (XP) algoritması kullanılarak yerleştirilmiştir. Bu aşamada 4M6P, 4JNM, 4N9D ve 4ZZJ PDB kodlu X-ışını kristal yapıları için van der Waals ölçeklendirme faktörü 0,80 ve yük parçalı kesme noktası sırasıyla 0,20; 0,15; 0,15; 0,15 olarak belirlenmiştir [354]. Elde edilen bağlantı modları XP Gscore ile puanlandırılmıştır.

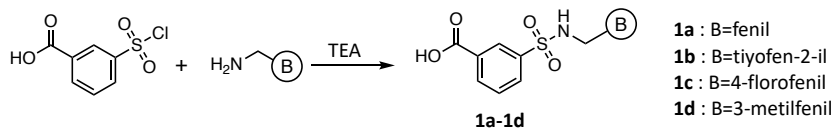
3.2. Kimyasal Çalışmalar

3.2.1. Materyal

Çalışmalarımızda kullanılan çözücü ve re ajanlar analitik saflıktadır. Kimyasallar Abcr (Almanya), Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), Carlo Erba (Almanya), BLD (Çin) ve Isolab (Almanya) firmalarının ticari olarak temin edilmiş olup, ek bir saflaştırma işlemine tabi tutulmaksızın kullanılmıştır.

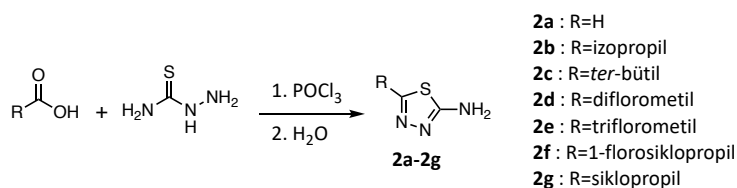
3.2.2. Genel sentez yöntemleri

3-[N-(Arilmetil)sülfamoil]benzoik asit türevleri (**1a-1d**)



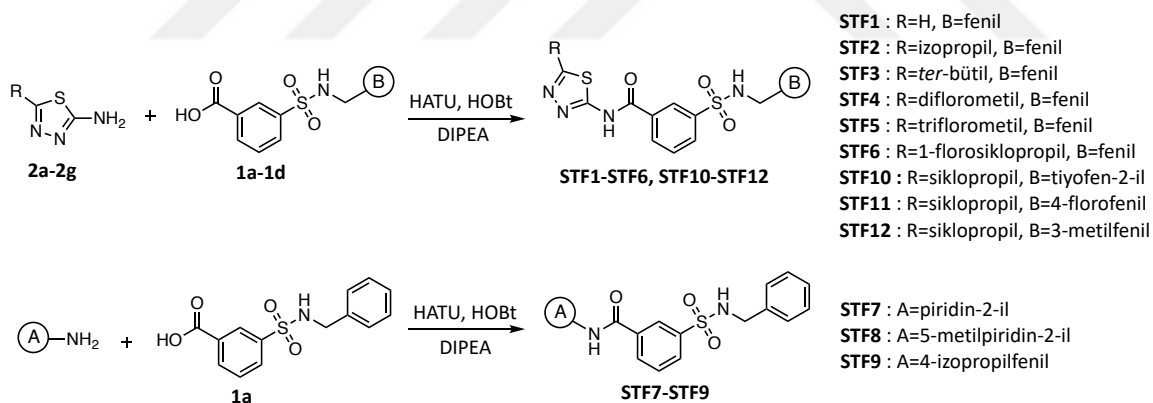
3-(Klorosülfonil)benzoik asit (1 ekivalan) ve sentezlenecek bileşiğe uygun amin türevi (1,5 ekivalan) trietilamin (TEA) (1,5 ekivalan) varlığında diklorometan (DCM) içerisinde 5-10 saat arasında değişen sürelerde oda sıcaklığında karıştırılır. Süre sonunda reaksiyon ortamı alçak basınç altında yoğunlaştırılır ve elde edilen kalıntı etil asetat ile çözülerek 0,1 M HCl (3x10 ml) çözeltisi ile ekstre edilir. Devamında, organik faz %5'lik NaOH (3x10 ml) çözeltisi ile ekstre edilir. Sulu faz, derişik HCl çözeltisi ile pH=3-4 olacak şekilde asitlendirilip çöken madde süzülür.

2-Amino-1,3,4-tiyadiazol türevleri (**2a-2g**)



Sentezlenecek bileşiğe uygun karboksilik asit türevi (1,1 ekivalan) ve tiyosemikarbazit (1 ekivalan) POCl₃ içerisinde 30 dakika ile 1 saat arasında değişen sürelerde 80 °C’de geri çeviren soğutucu altında ısıtılır. Süre sonunda reaksiyon ortamının üzerine su ilave edilerek 2 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtmaya devam edilir. Reaksiyon tamamlanınca reaksiyon ortamı NaOH çözeltisi ile pH=6-7 olacak şekilde ayarlanır ve çöken katı süzülür. Daha ileri saflaştırmaya tabi tutulmayan ham ürün bir sonraki basamakta kullanılır.

3-[*N*-(arilmetil)sülfamoil]-*N*-(aril)benzamid türevleri (**STF1-STF12**)



Sentezlenecek bileşiğe uygun 3-[*N*-(arilmetil)sülfamoil]benzoik asit türevi (**1a-1d**) (1 ekivalan), HATU (1 ekivalan), HOBT (1 ekivalan) ve DIPEA (3 ekivalan) karışımının tetrahidrofuran içerisindeki çözeltisi 10 dakika oda sıcaklığında karıştırılır. Sonrasında reaksiyon ortamına uygun amin türevi (1 ekivalan) (**2a-2g**, 2-aminopiridin, 2-amino-5-metilpiridin, 4-izopropilanilin) eklenerek oda sıcaklığında 24-48 saat arasında değişen sürelerde karıştırılmaya devam edilir. Süre sonunda reaksiyon ortamı alçak basınç altında yoğunlaştırılır ve elde edilen kalıntı diklorometan ile seyreltilerek, sırasıyla 2N HCl (3x10 ml), %1’lik NaHCO₃ (3x10 ml) ve %3’lük NaCl (1x10 ml) çözeltileri ile ekstre edilir. Organik faz,

susuz Na₂SO₄ ile kurutularak alçak basınç altında yoğunlaştırılır. Kalıntı, uygun çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile veya uygun bir çözücü ile yıkanarak saflaştırılır.

3.3. Analitik Çalışmalar

3.3.1. Erime noktası tayini

Sentezlenen bileşiklerin erime noktaları, Schmelzpunktbestimmer SMP-II model dijital erime noktası tayin cihazı kullanılarak belirlenmiş, elde edilen değerler düzeltilmeden raporlanmıştır.

3.3.2. İnce tabaka kromatografisi

Sentez çalışmalarında, reaksiyon takibi ve bileşiklerin saflık kontrollerinin yapılması amacıyla gerçekleştirilen ince tabaka kromatografisi analizi için Merck marka TLC Silica gel 60 F₂₅₄ kaplamalı hazır alüminyum plaklar kullanılmıştır. Çözücü sistemi olarak *n*-hekzan:etil asetat (35:15 ve 25:25), diklorometan:metanol (48:2 ve 45:5) ve diklorometan:aseton (40:10 ve 35:15) ile bromkrezol, dragendorf ve ninhidrin belirteçlerinden yararlanılmıştır.

3.3.3. Kolon kromatografisi

Sentezlenen bileşiklerin saflaştırma işlemlerinde, sabit faz olarak Merck marka Silica gel 60 (0,063-0,200 mm) ile hareketli faz olarak bileşiklerin monograflarında belirtilen oranlarda *n*-hekzan:etil asetat, diklorometan:metanol, diklorometan:aseton çözücü sistemleri kullanılmıştır.

3.3.4. ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

Sentezlenen final bileşiklerin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında ve Gazi Üniversitesi Temel ve Mühendislik

Bilimleri Merkez Laboratuvarı Uygulama veya Araştırma Merkezinde (GÜTMAM) Bruker Avance Neo 500 MHz FT-NMR Spektrometre cihazı ile dimetil sülfoksit- d_6 (DMSO- d_6) içerisinde tetrametilsilan (TMS) iç standartı kullanılarak kaydedilmiştir. Kimyasal kayma değerleri δ (ppm) skalasında değerlendirilmiş, eşleşme sabitleri (J), Hertz (Hz) cinsinden verilmiştir.

3.3.5. HRMS spektrumları

Sentezlenen bileşiklerin yüksek çözünürlüklü kütle spektrumları (HRMS), Waters LCT Premier XE UPLC/MS-TOF sistemi kullanılarak pozitif iyon (ESI+) ve negatif iyon (ESI-) elektrosprey iyonizasyon teknikleri kullanılarak metanol içinde alınmıştır. Kromatografik ayırım için; 0,25 ml/dk akış hızıyla sabit faz olarak Aquity UPLC Beh C18 kolonu (130 Å; 1,7 μ m; 2,1x50 mm), hareketli faz olarak ise su:asetonitril (80:20→10:90) gradient çözücü sistemi kullanılmıştır.

3.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.4.1. NAMPT aktivitelerinin belirlenmesi

Sanal tarama sonucu elde edilen bileşikler ile sentez ve yapı-aydınlatma çalışmaları tamamlanan bileşiklerin ve pozitif kontrol olarak NAMPT inhibitörü FK866'nın 100 μ M ve 50 μ M tarama konsantrasyonlarındaki *in vitro* NAMPT inhibitör aktiviteleri, NAMPT Inhibitor Screening Assay Kit (BPS Bioscience, Katalog No: 71276) kullanılarak belirlenmiştir [94]. İlk basamakta; kör ve pozitif kontrol kuyucukları dışındaki kuyucuklara test bileşikleri (10 μ l/kuyucuk) ve kör dışındaki tüm kuyucuklara insan NAMPT enzimi (10 μ l/kuyucuk) (NAMPT dilüsyon tamponu ile seyreltilmiş, 30 ng/ μ l konsantrasyonunda enzim) sırasıyla eklenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sonrasında tüm kuyucuklara substrat karışımı (12,5 μ l NAMPT test tamponu+2,5 μ l ATP+2,5 μ l nikotinamid+2,5 μ l PRPP+2,5 μ l %30'luk etanol+12,5 μ l su) eklenerek (35 μ l/kuyucuk) 2 saat süreyle 30 °C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda oluşan floresan ışımaya, eksitasyon 340 nm, emisyon 460 nm dalga boylarında Molecular Device Spectramax i3x marka cihaz ile kaydedilmiştir. Elde edilen değerler, enzim içermeyen kör kuyucuklara ait değerlere göre

normalize edilerek test bileşiklerinin % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Her deney en az üç kez tekrarlanmıştır. Bileşiklerin IC_{50} değerleri; 0,001-500 μ M arasında değişen konsantrasyonlar için elde edilen normalize doz-yanıt eğrileri yardımıyla GraphPad Prism 10.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4.2. SIRT1, SIRT2 ve SIRT3 aktivitelerinin belirlenmesi

Sanal tarama çıktısı ve sentezlenen bileşiklerin *in vitro* SIRT1-3 inhibitör etkilerinin belirlenmesinde SIRT1 Direct Fluorescent Screening Assay Kit (Katalog no: 10010401, Cayman Chemical), SIRT3 Direct Fluorescent Screening Assay Kit (Katalog no: 10011566 SIRT3, Cayman Chemical) ve SIRT2 Screening Assay Kit (Katalog No: ab156066, abcam) kullanılmıştır [355, 356]. Bileşiklerin SIRT1 enzimi üzerine etkileri 100 μ M ve 50 μ M tarama konsantrasyonlarında araştırılmış; izoform seçiciliğini belirlemek amacıyla SIRT2 ve SIRT3 enzimlerine karşı etkinlikleri incelenen bileşikler ise 50 μ M konsantrasyonda test edilmiştir.

SIRT1 ve SIRT3 enzim kitlerinin çalışma protokolüne göre ilk basamakta; test bileşiği (5 μ l/kuyucuk), SIRT1 veya SIRT3 enzimi (5 μ l/kuyucuk), NAD^+ -substrat karışımı (15 μ l/kuyucuk) ve tampon çözeltisi (25 μ l/kuyucuk) 96 kuyucuklu plakalara eklenip 37 °C'de 45 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Sonrasında, kuyucuklara developer çözeltisi (50 μ l/kuyucuk) eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edilmiş ve süre sonunda floresans ışımada, eksitasyon 360 nm, emisyon 460 nm dalga boylarında Molecular Device Spectramax i3x marka cihaz ile kaydedilmiştir.

SIRT2 enzim kitinin çalışma protokolünde ise, test bileşiği (5 μ l/kuyucuk), substrat (5 μ l/kuyucuk), NAD^+ (5 μ l/kuyucuk), tampon çözeltisi (5 μ l/kuyucuk), developer çözeltisi (5 μ l/kuyucuk) ve SIRT2 enzimi (5 μ l/kuyucuk) 96 kuyucuklu plakalara eklenip oda sıcaklığında 45 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için stop çözeltisi (20 μ l/kuyucuk) eklenmiş, 30 dakika sonra meydana gelen floresans ışımada, eksitasyon 490 nm, emisyon 530 nm dalga boylarında Molecular Device Spectramax i3x marka cihaz ile kaydedilmiştir.

Elde edilen değerler enzim içermeyen kör kuyucuklara ait zemin floresans şiddeti değerlerine göre normalize edilmiş, test bileşiklerinin SIRT1, SIRT2 ve SIRT3 enzimlerine karşı % aktivasyon veya % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Her deney en az üç kez tekrarlanmıştır. Bileşiklerin SIRT1 $EC_{1,5}$ değerleri 0,1-300 μ M arasında değişen konsantrasyonlar için elde edilen normalize doz-yanıt eğrileri yardımıyla GraphPad Prism 10.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır [331].

3.4.3. Antiproliferatif etkinin belirlenmesi

F1, F2, STF2 ve STF6 kodlu bileşiklerin insan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücreleri üzerindeki *in vitro* antiproliferatif etkileri MTS yöntemi ile araştırılmıştır [357]. Gebze Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü hücre ve doku bankasında bulunan hücreler, %10 FBS, 100 IU/ml penisilin, 100 μ g/ml streptomisin içeren DMEM besiyerinde kültürlenmiştir. Devamında, 5×10^5 sayıda hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş, 37 °C’de %5 CO₂’li etüvde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Referans (NAMPT inhibitörü FK866: 1 μ M; SIRT1 aktivatörü resveratrol: 50 μ M, SIRT1 inhibitörü EX-527: 50 μ M) ve test bileşiklerinin (10 μ M, 25 μ M, 100 μ M) insan Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal, Hep3B karaciğer kanseri ve insan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan) hücre hatlarında 24 saat sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca, bileşiklerin zamana bağlı etkilerini değerlendirmek amacıyla, insan HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanseri hücrelerinde 10 μ M konsantrasyonda 48 saatlik uygulama da gerçekleştirilmiştir. Belirtilen inkübasyon sürelerin sonunda hücreler PBS ile yıkandıktan sonra %10’luk MTS [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum] çözeltisi (Katalog no: G3581, Promega) eklenmiştir. Hücreler 1-4 saat inkübe edildikten sonra oluşan formazan kristallerinin 490 nm dalga boyundaki absorbans değerleri, Thermo marka cihaz ile kaydedilmiştir. Elde edilen değerler ile test bileşiklerinin % hücre canlılığı değerleri hesaplanmış, verilerin kıyaslanması için GraphPad Prism 10.0 programı kullanılarak one-way ANOVA testi uygulanmıştır. Her deney üç kez tekrarlanmıştır. Ayrıca, hücrelerin test bileşikleriyle 24 saatlik inkübasyonu sonrasında elde edilen morfolojik değişiklikler SOIF marka invert floresan mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir.

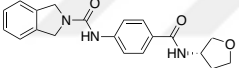
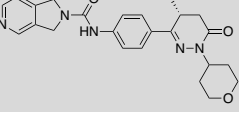
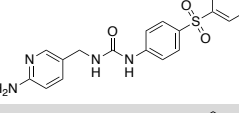
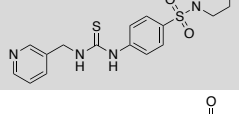
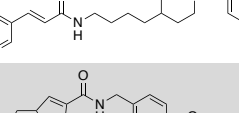
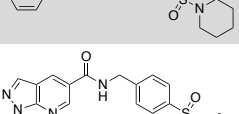
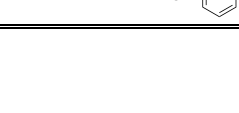
4. BULGULAR

4.1. Moleküler Modelleme Bulguları

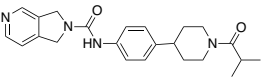
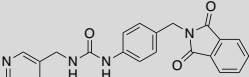
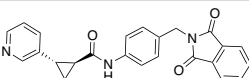
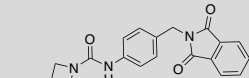
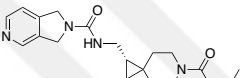
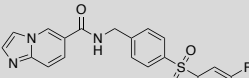
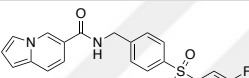
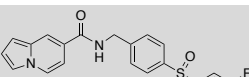
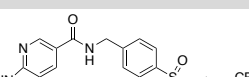
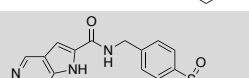
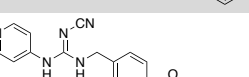
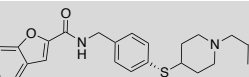
4.1.1. Farmakofor Modelleme

Sanal tarama basamağında kullanmak üzere, hedeflenen etkilerden sorumlu farmakoforik grupların belirlenmesi için bilinen 31 adet NAMPT inhibitörü (**N1-N31**) [65-69, 93, 95, 100, 109, 111, 112, 114, 339-341] ve 13 adet SIRT1 aktivatörü (**S1-S13**) [306, 342, 343] derlenmiş, her hedef için veri seti oluşturulmuştur. NAMPT veri seti pIC₅₀ değerlerine göre aktif (26 bileşik) ve inaktif (5 bileşik) şeklinde gruplandırılırken (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2); SIRT1 veri seti için herhangi bir gruplama yapılmamıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.1. Veri setinde yer alan biyoaktif konformasyonu bilinen NAMPT inhibitörleri

Kod	Kimyasal yapı	PDB kodu	pIC ₅₀	Farmakofor uyum puanı
N1		5U2M	7,08 (Aktif)	1,494
N2		7PPE	8,72 (Aktif)	1,526
N3		4JNM	8,52 (Aktif)	0,980
N4		4JR5	4,95 (inaktif)	1,553
N5		2GVJ	8,04 (Aktif)	1,544
N6		4KFN	8,04 (Aktif)	3,000
N7		4M6P	7,26 (Aktif)	1,932

Çizelge 4.1. (Devam) Veri setinde yer alan biyoaktif konformasyonu bilinen NAMPT inhibitörleri

Kod	Kimyasal yapı	PDB kodu	pIC ₅₀	Farmakofofor uyum puanı
N8		5U2N	6,95 (Aktif)	1,359
N9		6ATB	8,50 (Aktif)	-
N10		6AZJ	6,00 (Aktif)	-
N11		6PEB	8,56 (Aktif)	-
N12		5KIT	7,88 (Aktif)	-
N13		4KFO	8,30 (Aktif)	2,043
N14		4O0Z	7,24 (Aktif)	1,106
N15		4O10	8,10 (Aktif)	1,946
N16		4O13	8,21 (Aktif)	2,024
N17		4LWW	8,53 (Aktif)	1,886
N18		4LTS	7,35 (Aktif)	2,023
N19		4WQ6	8,09 (Aktif)	-

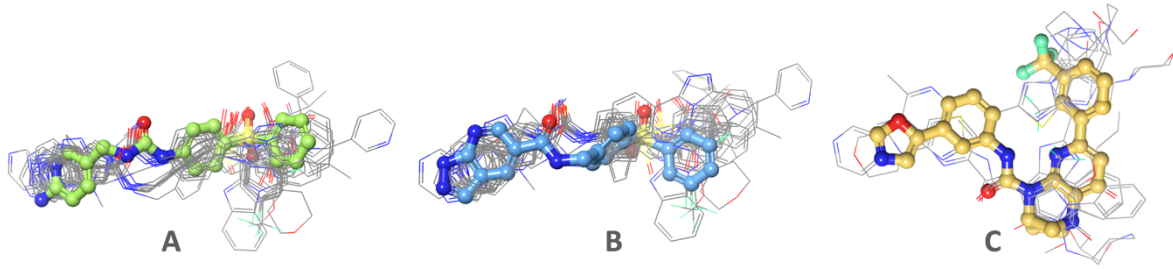
Çizelge 4.2. Veri setinde yer alan ve biyoaktif konformasyonu bilinmeyen NAMPT inhibitörleri

Kod	Kimyasal yapı	Referans*	pIC ₅₀	Farmakofor uyum puanı
N20		N1	7,25 (Aktif)	1,442
N21		N2	8,79 (Aktif)	1,576
N22		N3	7,32 (Aktif)	1,012
N23		N3	<5,00 (İnaktif)	-
N24		N4	<5,00 (İnaktif)	-
N25		N4	8,00 (Aktif)	0,196
N26		N5	<5,00 (İnaktif)	-
N27		N5	6,17 (Aktif)	0,212
N28		N6	<5,00 (İnaktif)	1,537
N29		N6	8,30 (Aktif)	0,530
N30		N7	6,25 (Aktif)	0,490
N31		N7	<5,00 (İnaktif)	1,086

*Veri setinde yer alan bileşiklerin hizalanmasında kullanılan referans bileşikler

NAMPT inhibisyonu için farmakofor hipotezin oluşturulması öncesinde, biyoaktif konformasyonu bilinmeyen NAMPT inhibitörleri (N20-N31) (Çizelge 4.2), veri setinde yer alan insan NAMPT X-ışını yapısındaki yedi adet koligandın (N1-N7) (Şekil 4.1) biyoaktif

konformasyonları referans alınarak hizalanmıştır. Referans olarak kullanılan koligand seçiminde ise hizalanacak bileşiğin kimyasal yapı benzerliği dikkate alınmıştır. SIRT1 aktivasyonu için ise, ortak yapıların üst üste gelmesini sağlamak amacıyla allosterik SIRT1 aktivatörlerinden oluşan veri seti, insan SIRT1 X-ışını yapısında (PDB: 4ZZJ) [303] yer alan STAC-11 adlı koligandın (**S1**) (Çizelge 4.3) biyoaktif konformasyonu referans alınarak hizalanmıştır (Şekil 4.1). Hizalı bileşiklerden oluşan veri seti farmakofor hipotezlerinin oluşturulmasında kullanılmıştır [306, 342, 343].

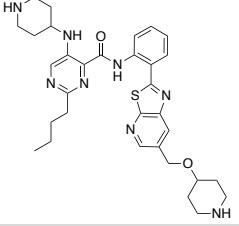
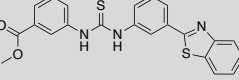
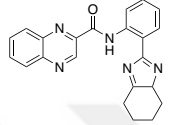
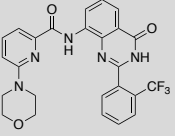
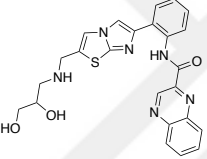
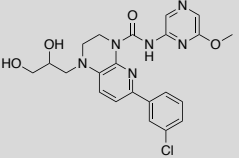
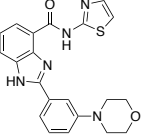
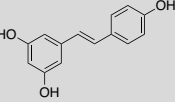
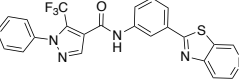


Şekil 4.1. NAMPT veri setinin (A) N3 ve (B) N6 bileşiklerinin referansıyla; (C) SIRT1 veri setinin S1 (STAC-11) bileşiğinin referansıyla hizalanması

Çizelge 4.3. Veri setinde yer alan SIRT1 aktivatörleri

Kod	Kimyasal yapı	EC ₅₀ (μM)	Farmakofor uyum puanı
S1		0,30	1,632
S2		0,48	1,643
S3		21,90	2,744
S4		1,80	3,000

Çizelge 4.3. (Devam) Veri setinde yer alan SIRT1 aktivatörleri

Kod	Kimyasal yapı	EC ₅₀ (μM)	Farmakofor uyum puanı
S5		1,00	2,353
S6		<5,00	1,636
S7		<5,00	1,910
S8		0,44	1,526
S9		<5,00	2,670
S10		1,04	1,627
S11		1,53	1,529
S12		46,20	-
S13		<5,00	-

Hizalanan veri setlerinden üretilen farmakofor hipotezler, NAMPT için veri setinde yer alan aktif ve inaktif bileşiklerin, SIRT1 için ise tüm bileşiklerin hipotez eldesine olan katkısı ve istenilen farmakofor özellik sayısını karşılaması gibi kriterlere göre sıralanarak (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3); idame, bölge, vektör, hacim ve inaktif skorlarına göre değerlendirilmiştir. En iyi

skorlara sahip NAMPT ve SIRT1 hipotezleri, validasyon basamağı için seçilmiştir (Çizelge 4.4).

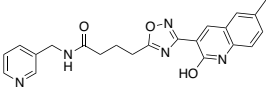
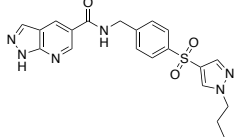
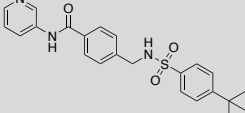
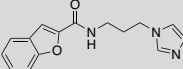
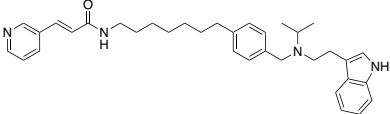
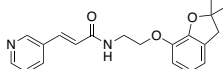
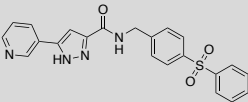
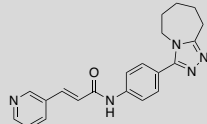
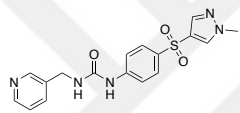
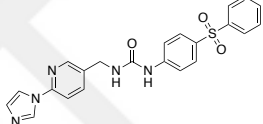
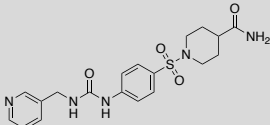
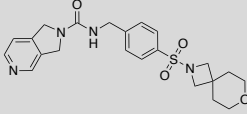
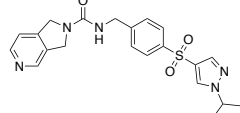
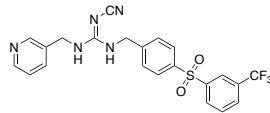
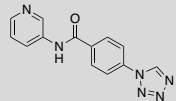
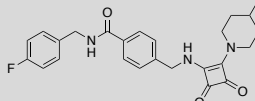
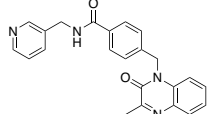
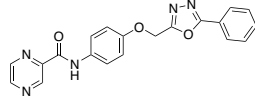
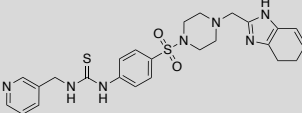
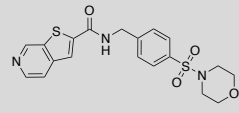
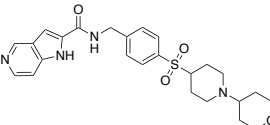
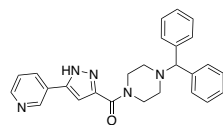
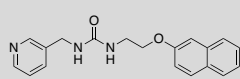
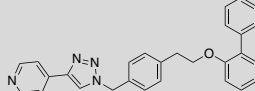
Çizelge 4.4. Farmakofor model belirlemede kullanılan skorlar

Puan türleri	Farmakofor Hipotezleri	
	NAMPT	SIRT1
İdame skoru (survival score)	3,83	4,60
Bölge skoru (site score)	0,12	0,41
Vektör skoru (vector score)	0,89	0,93
Hacim skoru (volume score)	0,63	0,57
İnaktif skoru (inactive score)	0,82	-

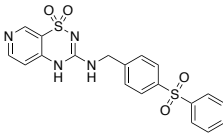
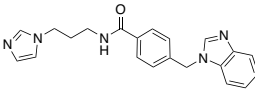
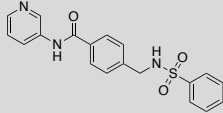
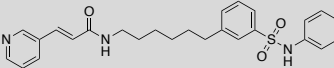
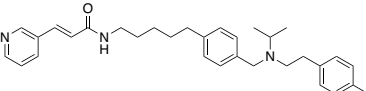
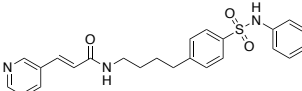
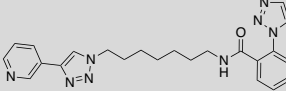
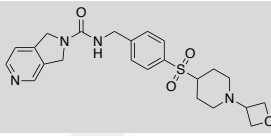
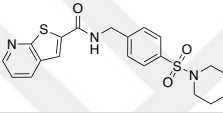
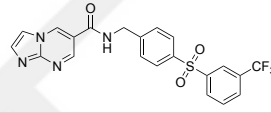
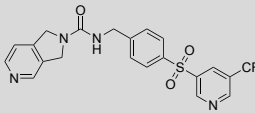
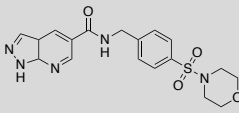
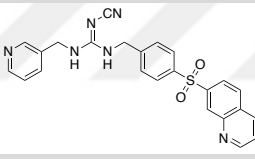
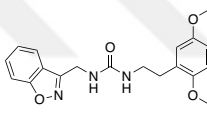
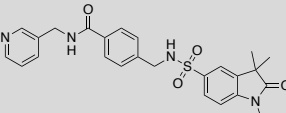
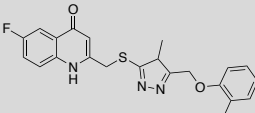
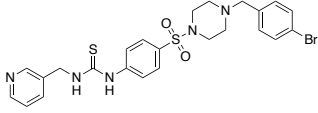
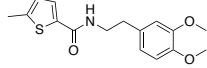
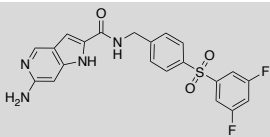
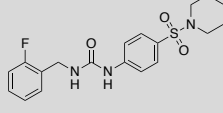
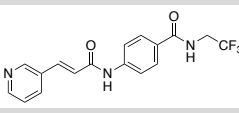
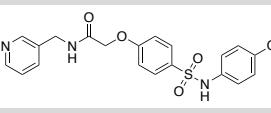
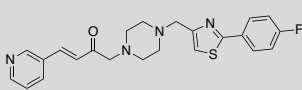
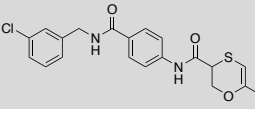
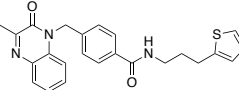
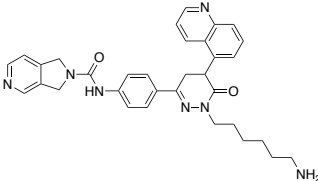
Seçilen farmakofor hipotezlerin, tarama basamağından önce doğrulanması gerekmektedir. NAMPT hipotezinin doğrulanması için literatürde insan NAMPT inhibitör aktivitesi bildirilen ve veri setine dahil edilmeyen 50 adet NAMPT inhibitörü (**ND1-ND50**) [65-67, 90, 95, 98, 101, 109, 111-113, 115, 116, 340, 344, 358] (Çizelge 4.5) ve 1250 adet NAMPT inhibisyon aktivitesi göstermeyen decoy bileşikten oluşan doğrulama seti oluşturulmuştur. SIRT1 hipotezinin doğrulanması için ise literatürde insan SIRT1 aktivatör aktivitesi bildirilen ve veri setine dahil edilmeyen 90 adet allosterik SIRT1 aktivatörü (**SD1-SD90**) [303, 306, 307, 321-323, 333, 335, 359, 360] (Çizelge 4.6) ile 910 adet decoy bileşikten oluşan doğrulama seti oluşturulmuştur. Devamında, oluşturulan NAMPT doğrulama seti (1300 bileşik) ve SIRT1 doğrulama seti (1000 bileşik) ilgili hipotezlere karşı taranmış, tarama sonucunda bileşikler farmakofor uyum puanına göre sıralanmış, üst sıralarda aktif bileşiklerin yer alıp almadığı değerlendirilmiştir.

Doğrulama setlerinin ilgili farmakofor hipoteze karşı taranması sonucu, hipotezlerin performansını belirleyen istatistiksel parametreler hesaplanmış, hipotezin kabul edilebilir değerlere sahip hali, her bir hedef için farmakofor model olarak tanımlanmıştır. (Çizelge 4.7). Ulaşılan farmakofor modeller (Çizelge 4.8) için ROC ve % tarama grafikleri (Şekil 4.2) incelenerek, “model yorulma noktaları” belirlenmiştir.

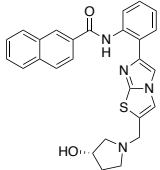
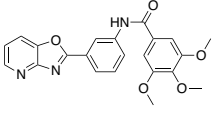
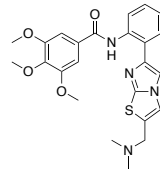
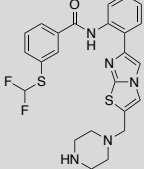
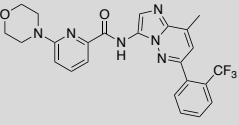
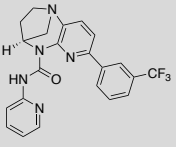
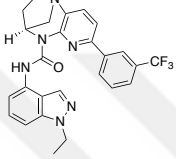
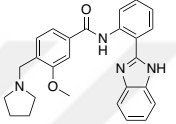
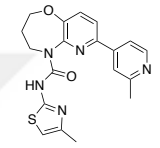
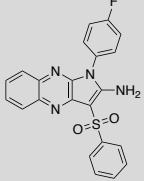
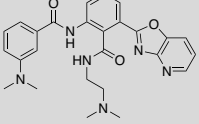
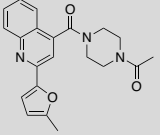
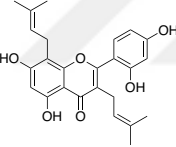
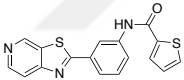
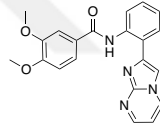
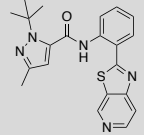
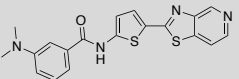
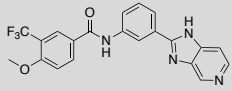
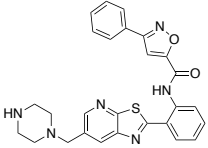
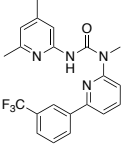
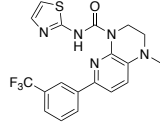
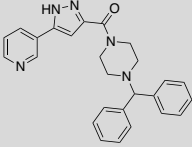
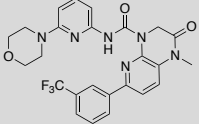
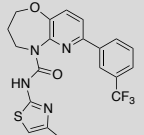
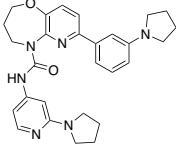
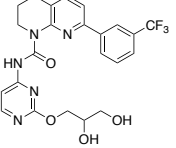
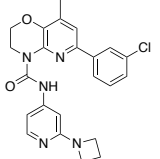
Çizelge 4.5. NAMPT doğrulama setinde yer alan aktif bileşikler

Kod	Kimyasal Yapı	Kod	Kimyasal Yapı
ND1		ND2	
ND3		ND4	
ND5		ND6	
ND7		ND8	
ND9		ND10	
ND11		ND12	
ND13		ND14	
ND15		ND16	
ND17		ND18	
ND19		ND20	
ND21		ND22	
ND23		ND24	

Çizelge 4.5. (Devam) NAMPT doğrulama setinde yer alan aktif bileşikler

Kod	Kimyasal Yapı	Kod	Kimyasal Yapı
ND25		ND26	
ND27		ND28	
ND29		ND30	
ND31		ND32	
ND33		ND34	
ND35		ND36	
ND37		ND38	
ND39		ND40	
ND41		ND42	
ND43		ND44	
ND45		ND46	
ND47		ND48	
ND49		ND50	

Çizelge 4.6. SIRT1 doğrulama setinde yer alan aktif bileşikler

Kod	Kimyasal yapı	Kod	Kimyasal yapı	Kod	Kimyasal yapı
SD1		SD2		SD3	
SD4		SD5		SD6	
SD7		SD8		SD9	
SD10		SD11		SD12	
SD13		SD14		SD15	
SD16		SD17		SD18	
SD19		SD20		SD21	
SD22		SD23		SD24	
SD25		SD26		SD27	

Çizelge 4.6. (Devam) SIRT1 doğrulama setinde yer alan aktif bileşikler

Kod	Kimyasal yapı	Kod	Kimyasal yapı	Kod	Kimyasal yapı
SD28		SD29		SD30	
SD31		SD32		SD33	
SD34		SD35		SD36	
SD37		SD38		SD39	
SD40		SD41		SD42	
SD43		SD44		SD45	
SD46		SD47		SD48	
SD49		SD50		SD51	
SD52		SD53		SD54	

Çizelge 4.6. (Devam) SIRT1 doğrulama setinde yer alan aktif bileşikler

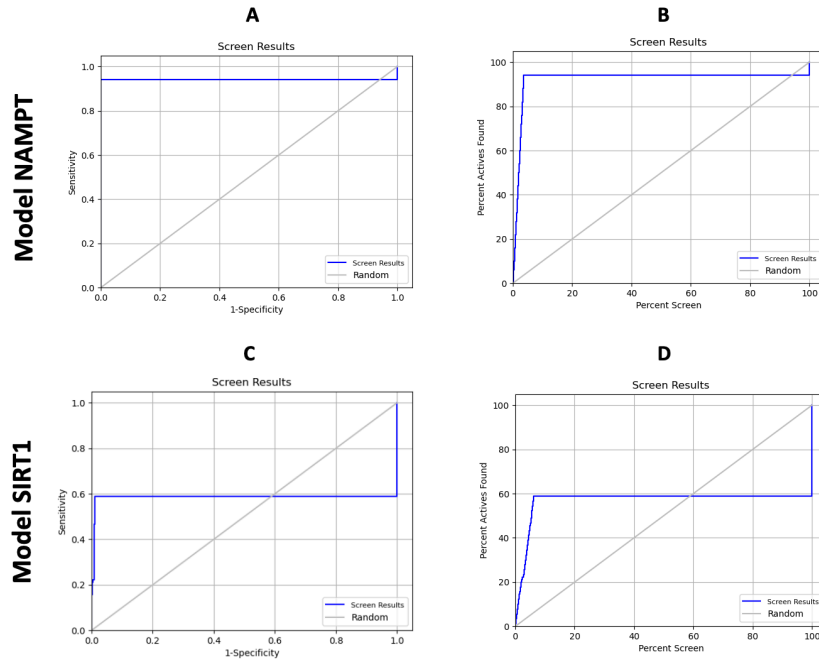
Kod	Kimyasal yapı	Kod	Kimyasal yapı	Kod	Kimyasal yapı
SD55		SD56		SD57	
SD58		SD59		SD60	
SD61		SD62		SD63	
SD64		SD65		SD66	
SD67		SD68		SD69	
SD70		SD71		SD72	
SD73		SD74		SD75	
SD76		SD77		SD78	
SD79		SD80		SD81	

Çizelge 4.6. (Devam) SIRT1 doğrulama setinde yer alan aktif bileşikler

Kod	Kimyasal yapı	Kod	Kimyasal yapı	Kod	Kimyasal yapı
SD82		SD83		SD84	
SD85		SD86		SD87	
SD88		SD89		SD90	

Çizelge 4.7. Farmakofor model performansını belirleyen parametreler

Parametre	Farmakofor Model		Parametre tanımı
	NAMPT	SIRT1	
D	1300	1000	D: Veri tabanındaki toplam bileşik sayısı
A	50	90	A: Veri tabanındaki toplam aktif bileşik sayısı
H	47	63	H: Veri tabanının taranması sonucu ulaşılan çıktı bileşik sayısı
TP	20	53	TP (true positive): Aktif çıktı bileşiklerin sayısı
FN	3	37	FN (false negative): Veri tabanındaki çıktı olarak verilmeyen aktif bileşik sayısı
FP	0	10	FP (false positive): Veri tabanındaki çıktı olarak görülen inaktif bileşik sayısı
TN	1250	900	TN (true negative): Veri tabanındaki çıktı olarak verilmeyen inaktif bileşik sayısı
% Aktif verim	100	84	% Aktif verim: $[(TP/H) \times 100]$
% Aktif oran	94	59	% Aktif oran: $[(TP/A) \times 100]$
Se	0,94	0,59	Se (sensitivity): $[TP/(TP+FN)]$
Sp	1,00	0,96	Sp (specificity): $[TN/(TN+FP)]$
Doğruluk	1,00	0,95	Doğruluk: $[(TP+TN)/D]$
Kesinlik	1,00	0,84	Kesinlik: $[TP/(TP+FP)]$
GH	0,99	0,77	GH (Goodness of hit score): $[(TP/4HA)(3A+H)(1-((H-TP)/(D-A))]$
ROC	0,94	0,58	ROC: Receiver operating characteristic
BEDROC ($\alpha=20$)	0,96	0,71	BEDROC: Boltzmann-geliştirilmiş ROC ayrımı
BEDROC ($\alpha=160$)	0,88	0,82	
RIE	13,18	6,56	RIE: Robust initial enhancement
AUAC	0,95	0,76	AUAC: Kümelenmiş eğri altında kalan alan
EF (manuel)	26	9,35	EF (Enrichment factor): $[(TP/H)/(A/D)]$
EF (%1)	24	11	
EF (%2)	25	10	
EF (%5)	19	9,1	



Şekil 4.2. Model NAMPT ve Model SIRT1 için oluşturulan ROC grafikleri (A ve C) ve % tarama grafikleri (B ve D)

Çizelge 4.8. Elde edilen farmakofor modeller

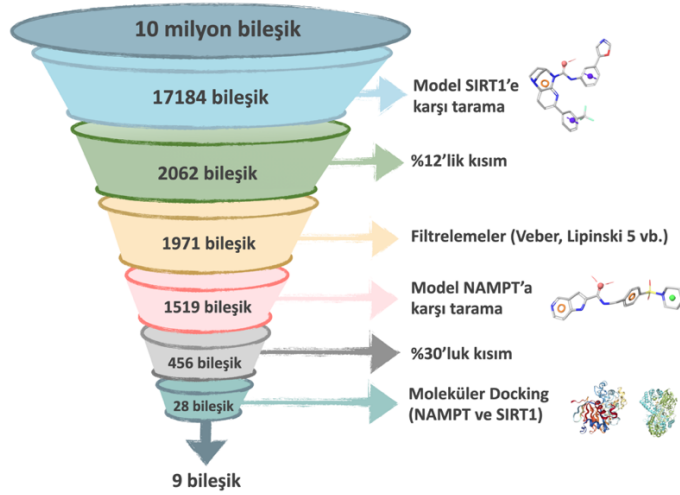
Farmakofor model	Bileşen*	Referans bileşik ile gösterimi**	Referans bileşik ve sınırlayıcı hacimleri (eV) ile gösterimi**
Model NAMPT	ADRRH		
Model SIRT1	ADRXX		

*Hidrojen bağı akseptörü (A) kırmızı; hidrojen bağı donörü (D) mavi; aromatik halka (R) turuncu; hidrofobik (H) yeşil; aromatik vektör/alani (X) mor renk ile gösterilmiştir. **Model NAMPT-N6 ve Model SIRT1-S1

4.1.2. Sanal tarama

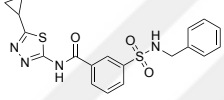
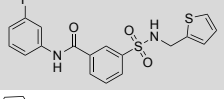
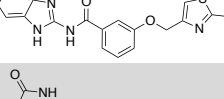
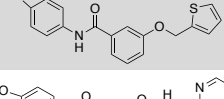
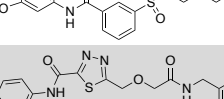
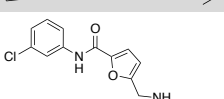
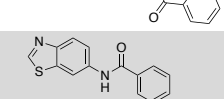
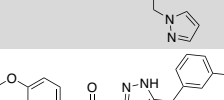
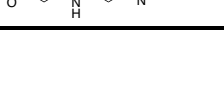
Sanal tarama basamağının ilk aşamasında, yaklaşık 10 milyon bileşikden meydana gelen ZINC “drug-like” sanal kütüphanesi Model SIRT1’e karşı Schrödinger programının Phase modülü kullanılarak taranmıştır [361]. Model SIRT1 ile yapılan tarama sonunda farmakofor modele uyum gösteren 17184 adet bileşik elde edilmiştir. Modelin ROC eğrisinde belirlenen “model yorulma noktası” ve en iyi % aktif oranı veren yüzdelik dilim birlikte değerlendirilerek Model SIRT1 ile ulaşılan 17184 adet çıktı bileşiğin ilk %12’lik kısmı seçilerek [350] bileşik sayısı 2062’ye düşürülmüştür. Devamında bileşikler, Lipinski 5 ve Veber kurallarının (molekül ağırlığı ≤ 500 Da, LogP ≤ 5 , hidrojen bağ donörü sayısı ≤ 5 , hidrojen bağ akseptörü sayısı ≤ 10 , dönen bağ sayısı ≤ 10 , polar yüzey alanı ≤ 140 Å²) [351, 352] yanında kiralite (kiral atom sayısı ≤ 1), ADMET özellikleri, reaktif grup taşıma durumu, sentezlenebilirlik gibi kriterler de değerlendirilmiş, uygun olmayan bileşikler elenmiştir. Uygulanan filtrelemeler sonucunda bir sonraki basamağa geçen bileşik sayısı 1971 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Sanal taramanın ikinci aşamasında Model SIRT1 ile uyumlu olan 1971 bileşik, Model NAMPT’a karşı taranmış, bu bileşiklerden 1519 adetinin NAMPT modeline uyum gösterdiği belirlenmiştir. Ancak bu bileşiklerin ilk %30’luk kısmının bir sonraki basamağa geçmesine Model NAMPT için elde edilen ROC eğrisinde (Şekil 4.2A) tespit edilen “model yorulma noktası” ve en iyi % aktif oranı veren yüzdelik dilim birlikte değerlendirilerek karar verilmiş, böylece, 456 bileşik moleküler docking adımına geçmiştir. Bileşikler insan SIRT1 ve insan NAMPT enzimlerinin aktif bölgelerine ayrı ayrı yerleştirildikten sonra XP GScore puanları ile sıralanmış, bileşiklere ait bağlantı modları, aktif bölgede gerçekleşmesi beklenen etkileşimler açısından değerlendirilmiştir. Moleküler docking çalışmaları sonucunda her iki enzim için de uygun kriterlere sahip olan 28 adet ortak bileşiğe ulaşılmış, kimyasal yapı çeşitliliği göz önüne alınarak 9 bileşik (**F1-F9**) sonuç sanal tarama çıktısı olarak satın alınmıştır (Şekil 4.3 ve Çizelge 4.9).



Şekil 4.3. Sanal tarama basamakları

Çizelge 4.9. Satın alınan final sanal tarama çıktısı bileşikler

Kod	Kimyasal yapı	ZINC kodu	XP Gscore (kkal/mol)		Farmakofor uyum puanı	
			NAMPT	SIRT1	NAMPT	SIRT1
F1		ZINC12736087	-7,119	-1,190	0,959	0,961
F2		ZINC8274800	-6,731	-1,238	0,626	1,310
F3		ZINC9318844	-7,508	-0,938	0,890	1,009
F4		ZINC32801450	-7,259	-1,270	0,838	0,828
F5		ZINC6238605	-7,357	-0,036	0,883	1,333
F6		ZINC32987633	-8,016	-1,238	0,645	1,317
F7		ZINC15868097	-7,687	-0,652	0,869	0,891
F8		ZINC828172311	-6,886	-0,875	1,359	0,912
F9		ZINC65232683	-6,490	-0,871	0,870	0,812

4.1.3. Moleküler Docking

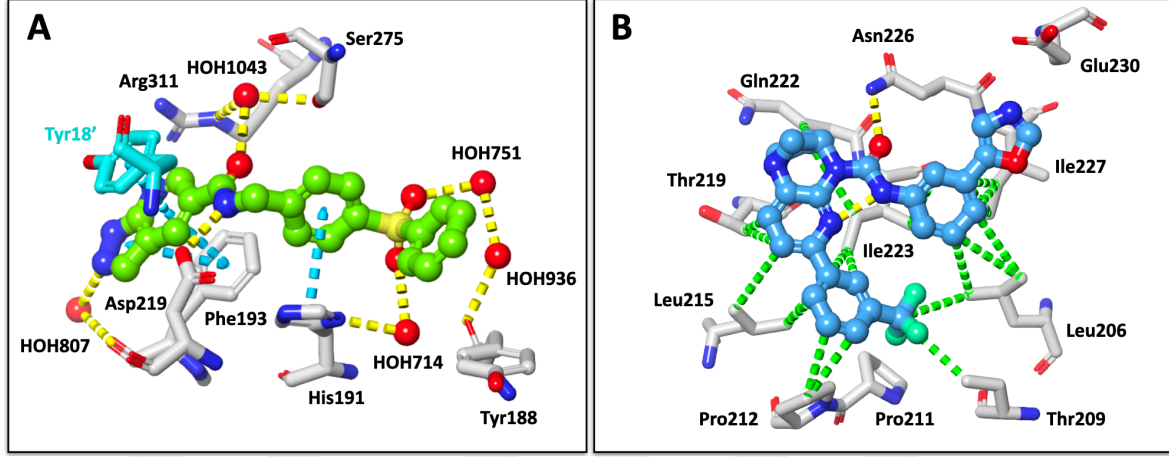
Sanal tarama çıktısı **F1-F9** kodlu bileşikler ve optimizasyon çalışması sonunda tasarlanan **STF1-STF12** kodlu bileşikler arasından, hem NAMPT inhibisyonu hem de SIRT1 aktivasyonu gösterdiği tespit edilen bileşiklerin (**F1, F2, F3, F5, STF2, STF6**) enzim aktif bölgelerindeki olası bağlantı modları ve meydana getirdikleri etkileşimler moleküler docking çalışmaları ile incelenmiştir.

Bileşiklerin insan NAMPT aktif bölgesi ve SIRT1 allosterik aktif bölgesindeki konformasyonları, NAMPT:N7 (PDB: 4M6P) ve SIRT1:STAC-11 (PDB: 4ZZJ) komplekslerine ait X-ışını kristal yapıları kullanılarak Schrödinger programının Glide modülü ile belirlenmiş, [67, 303] bileşiklerin NAMPT ve SIRT1 aktif bölgelerinde meydana getirdikleri etkileşimler ve hesaplanan bağlanma enerjileri Çizelge 4.10'da sunulmuştur.

NAMPT aktif bölgesinde **N7** kodlu bileşiğin biyoaktif konformasyonu incelendiğinde (Şekil 4.4A), baş grubu olarak nitelendirilen 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin halkasının NAM'a benzer şekilde nükleobaz cebine yerleşerek, bu bölgede inhibisyon için önemli olduğu bilinen Phe193 ve Tyr18' amino asitleri ile π - π etkileşimleri ve yapısal su molekülü (HOH807) aracılığıyla Asp219 ve Arg392 amino asitleriyle hidrojen bağı meydana getirdiği gözlenmiştir [16]. Aktif bölgede bağlayıcı birim olarak görev alan amit fonksiyonel grubu ise, eşik bölgesinde Arg311 ve Ser275 ile yapısal su molekülü (HOH1043) aracılı; Asp219 ile doğrudan hidrojen bağları oluşturmaktadır [362]. Ayrıca, **N7** kodlu bileşik, merkezi fenil halkası üzerinden His191 ile π - π etkileşimleri oluştururken; sülfon grubuna bağlı uç fenil halkası arka kanalda His191 ve Tyr188 ile yapısal su molekülleri (HOH751, HOH936 ve HOH714) aracılı hidrojen bağları meydana getirmektedir.

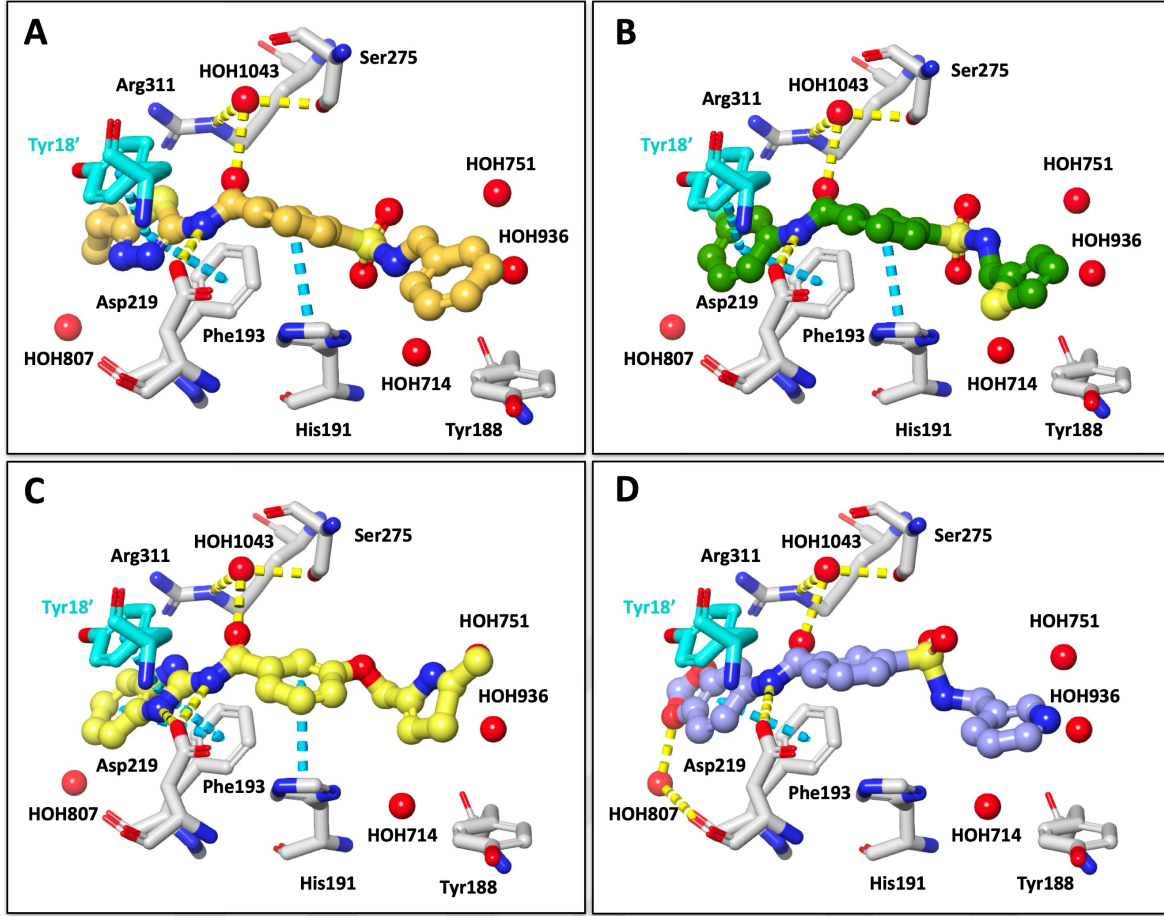
SIRT1 allosterik aktif bölgesinde konumlanan STAC-11 kodlu bileşiğin biyoaktif konformasyonu incelendiğinde (Şekil 4.4B), bileşiğin hidrofobik özellikteki bölgeye intramoleküler hidrojen bağının yardımıyla düzlemsel bir konformasyonda yerleştiği ve Leu206, Thr209, Pro211, Pro212, Leu215, Thr219, Ile223 ve Ile227 amino asitleriyle hidrofobik etkileşimler, Asn226 ile de hidrojen bağı üzerinden etkileşim kurduğu

gözenmiştir. Bunun yanında, Ile223 ve Glu230 ile oluşturulan etkileşimlerin SIRT1 enzim aktivasyonu için önemli olduğu bildirilmiştir [303].



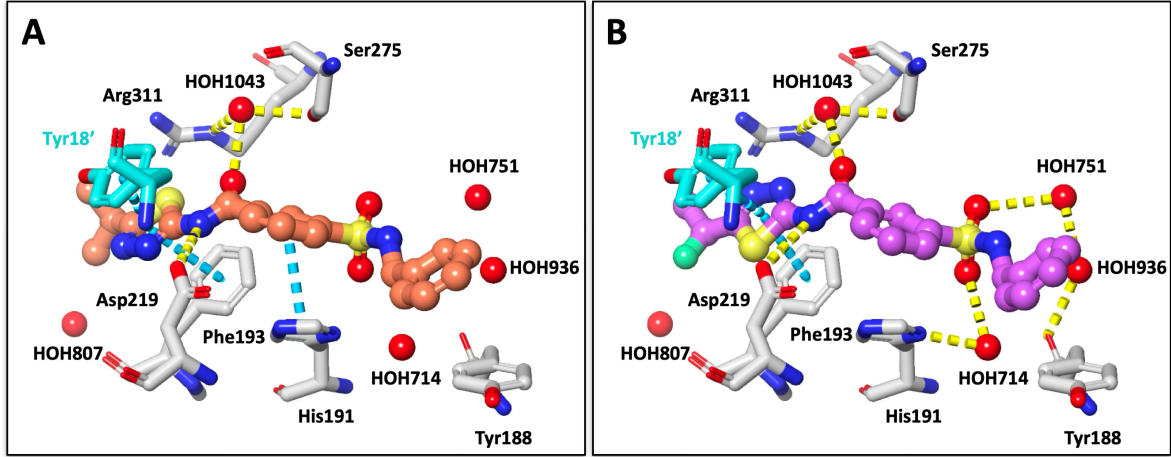
Şekil 4.4. (A) İnsan NAMPT:N7 kompleksi (PDB: 4M6P); (B) İnsan SIRT1:STAC-11 kompleksi (PDB: 4ZZJ). Hidrojen bağları, π - π etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler sırasıyla sarı, turkuaz ve yeşil renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

Moleküler docking sonuçlarına göre (Şekil 4.5), NAMPT inhibisyonu gerçekleştiren **F1**, **F2**, **F3** ve **F5** kodlu bileşikler, NAMPT aktif bölgesinde nükleobaz cebinde yer alan ve aktivite için kritik öneme sahip olan Tyr18' ve Phe193 amino asitleriyle π - π etkileşimleri oluşturmaktadır. Bu bileşikler arasında benzodioksol halkası taşıyan **F5**, farklı olarak halkada bulunan oksijen atomu ile yapısal su molekülü (HOH807) aracılığıyla Phe193 ve Arg392 amino asitleri ile hidrojen bağı meydana getirmiştir. Amit fonksiyonel grubu taşıyan **F1**, **F2**, **F3** ve **F5** kodlu bileşiklerin, X-ışını kristal yapısında yer alan NAMPT inhibitörü koligand ile benzer bir şekilde eşik bölgesinde yer alan Ser275 ve Arg311 ile yapısal su molekülü (HOH1043) aracılı, Asp219 ile de doğrudan hidrojen bağı oluşturdıkları belirlenmiştir. Bu etkileşimlere ek olarak, **F3** kodlu bileşikte benzimidazol halka azotu üzerinden Asp219 ile ek bir hidrojen bağı meydana getirdiği görülmüştür. **F1**, **F2** ve **F3** kodlu bileşikler **F5**'ten farklı olarak His191 ile π - π etkileşimleri üzerinden etkileşim kurmuştur. Aktif bölgenin hidrofobik karakterdeki arka kanalında ise bileşiklerin sülfonamid (**F1**, **F2** ve **F5**) veya eter köprüsü taşıyan (**F3**) aromatik halkalarının konumlandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



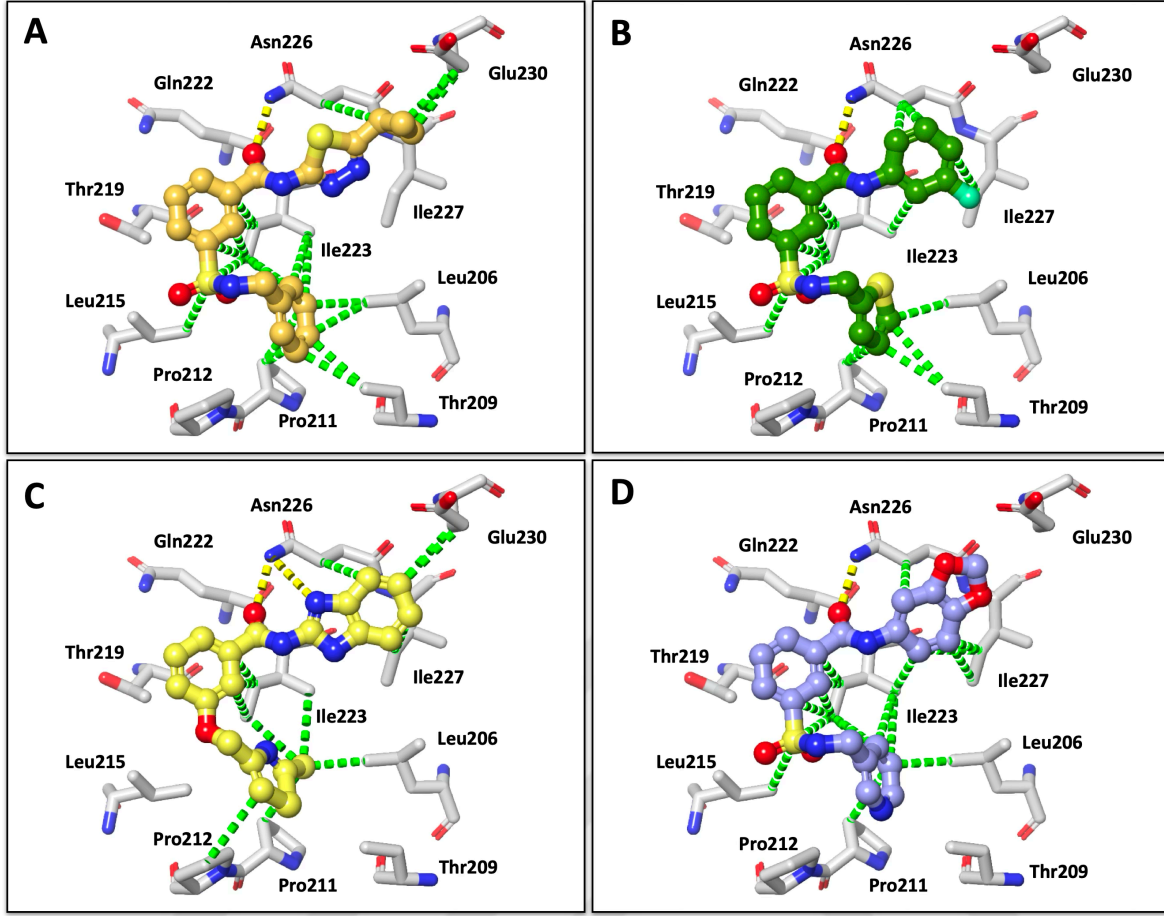
Şekil 4.5. İnsan NAMPT aktif bölgesinde (PDB: 4M6P) (A) F1; (B) F2; (C) F3; (D) F5 kodlu bileşiklerin olası bağlantı modları. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

Öncü bileşik **F1** üzerinden gerçekleştirilen optimizasyon çalışması ile tasarlanan **STF** kodlu bileşikler içerisinde dual NAMPT inhibitörü/SIRT1 aktivatörü olduğu tespit edilen **STF2** ve **STF6** kodlu bileşiklerin NAMPT aktif bölgesinde öncü bileşik **F1** ile benzer bağlanma modunda yerleştikleri belirlenmiştir. Bileşiklerin tiyadiazol halkası üzerinden nükleobaz cebinde Tyr18' ve Phe193 amino asitleriyle π - π etkileşimleri; amit grubu üzerinden ise Ser275 ve Arg311 ile HOH1043 aracılı ve Asp219 ile doğrudan hidrojen bağları oluşturdıkları belirlenmiştir. **STF6** kodlu bileşik **STF2'**den farklı olarak His191 ile π - π etkileşimleri meydana getirmemiş; fakat sülfonamit grubu üzerinden Tyr188 ve His191 ile yapısal su molekülleri (HOH751, HOH936 ve HOH714) aracılı hidrojen bağı oluşturmuştur (Şekil 4.6).



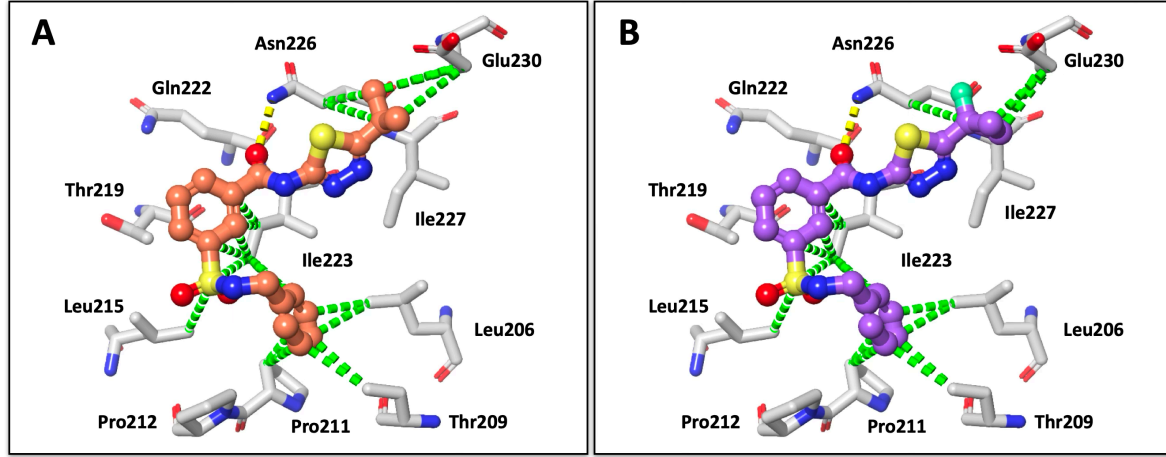
Şekil 4.6. İnsan NAMPT aktif bölgesinde (PDB: 4M6P) (A) STF2; (B) STF6 kodlu bileşiklerin olası bağlantı modları. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

F1, **F2**, **F3** ve **F5** kodlu bileşiklerin insan SIRT1 enziminin (PDB: 4ZZJ) [303] N-terminalindeki allosterik bölgesinde moleküler docking ile elde edilen olası bağlantı modları (Şekil 4.7) incelendiğinde; bileşiklerin aktif bölgede koliganda (STAC-11) benzer bir şekilde düzlemsel bir konformasyon sergileyerek konumlandığı gözlenmiştir. Tüm bileşiklerde ortak olan *m*-sübstitüe fenil halkasının aktivite için önemi vurgulanan Ile223 ile hidrofobik etkileşimlere katıldığı, amit karbonilinin de Asn226 ile hidrojen bağı oluşturduğu görülmüştür. Buna ek olarak **F3**'ün benzimidazol halkası aracılığıyla Asn226 ile bir hidrojen bağı meydana getirdiği görülmüştür. **F1**'in siklopropan ve **F3**'ün benzimidazol halkaları aracılığıyla aktivite için önemli olduğu bilinen Glu230 amino asidi ile hidrofobik etkileşimler oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, tüm bileşiklerin Asn226, Leu206, Leu215, Thr209, Pro211, Pro212, Ile227 amino asitleriyle kurdukları hidrofobik etkileşimlerin enzim-ligand kompleksinin stabilitesine katkı sağladığı belirlenmiştir.



Şekil 4.7. İnsan SIRT1 enzim allosterik bölgesinde (PDB: 4ZZJ) (A) F1; (B) F2; (C) F3; (D) F5 kodlu bileşiklerin olası bağlantı modları. Hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler sırasıyla sarı ve yeşil renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

Öncü bileşik **F1**'den hareketle tasarlanan **STF** kodlu bileşiklerden hem NAMPT inhibisyonu hem de SIRT1 aktivasyonu gerçekleştiren **STF2** ve **STF6** kodlu bileşiklerin, SIRT1 allosterik aktif bölgesinde **F1** ile benzer bağlanma moduna sahip olduğu görülmüştür. **STF2** ve **STF6**'nın hidrofobik karakterdeki izopropil ve 1-florosiklopropil gruplarının Glu230 ile hidrofobik etkileşimler oluşturabildiği; *m*-süstitüe fenil ve uç fenil halkalarının Ile223 ile hidrofobik etkileşimler kurduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, bileşiklerin Leu206, Leu215, Thr209, Pro211 ve Asn226 amino asitleriyle meydana getirdikleri hidrofobik etkileşimlerin enzim-ligand kompleksinin stabilitesine katkı sağladığı belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. İnsan SIRT1 enzim allosterik bölgesinde (PDB: 4ZZJ) (A) STF2; (B) STF6 kodlu bileşiklerin olası bağlantı modları. Hidrojen bağları ve hidrofobik sırasıyla sarı ve yeşil renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

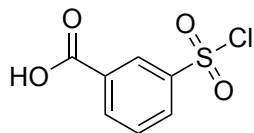
Çizelge 4.10. Bileşiklerin NAMPT ve SIRT1 aktif bölgelerindeki etkileşimleri

Kod	NAMPT (PDB: 4M6P)		SIRT1 (PDB: 4ZZJ)	
	Bağlanma enerjisi ^a	Etkileşim türü	Bağlanma enerjisi ^a	Etkileşim türü
F1	-6,60	Asp219, Ser275, Arg311 (Hidrojen bağı) His191, Phe193, Tyr18' (π-π etkileşimi)	-1,47	Asn226 (Hidrojen bağı) Leu206, Thr209, Pro211, Leu215, Ile223, Asn226, Glu230 (Hidrofobik etkileşim)
F2	-6,56	Asp219, Ser275, Arg311 (Hidrojen bağı) His191, Phe193, Tyr18' (π-π etkileşimi)	-0,74	Asn226 (Hidrojen bağı) Leu206, Thr209, Pro211, Leu215, Ile223, Ile227, Asn226 (Hidrofobik etkileşim)
F3	-7,21	Asp219, Ser275, Arg311 (Hidrojen bağı) His191, Phe193, Tyr18' (π-π etkileşimi)	-0,56	Asn226 (Hidrojen bağı) Leu206, Pro211, Pro212, Ile223, Ile227, Asn226, Glu230 (Hidrofobik etkileşim)
F5	-7,21	Phe193, Asp219, Ser275, Arg311 (Hidrojen bağı) Phe193, Tyr18' (π-π etkileşimi)	-0,42	Asn226 (Hidrojen bağı) Leu206, Pro211, Leu215, Ile223, Ile227, Asn226 (Hidrofobik etkileşim)
STF2	-6,60	Asp219, Ser275, Arg311 (Hidrojen bağı) His191, Phe193, Tyr18' (π-π etkileşimi)	-0,16	Asn226 (Hidrojen bağı) Leu206, Thr209, Pro211, Leu215, Ile223, Asn226, Glu230 (Hidrofobik etkileşim)
STF6	-6,85	Tyr188, His191, Asp219, Ser275, Arg311 (Hidrojen bağı) Phe193, Tyr18' (π-π etkileşimi)	-1,08	Asn226 (Hidrojen bağı) Leu206, Thr209, Pro211, Leu215, Ile223, Asn226, Glu230 (Hidrofobik etkileşim)

^aBağlanma enerjileri kkal/mol cinsinden verilmiştir.

4.2. Kimyasal Bulgular

3-(Klorosülfonil)benzoik asit



Benzoik asit (611 mg; 5 mmol) üzerine 0 °C'de damla damla klorosülfonik asit (4 ml) eklenmiş, ısı kademeli olarak arttırılarak 80 °C'de 5 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtılmıştır. Süre sonunda reaksiyon karışımı soğutularak buzlu su içerisine boşaltılmıştır. Çöken katı süzülerek ayrılmış ve herhangi bir ileri saflaştırma işlemi uygulanmadan bir sonraki basamakta kullanılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

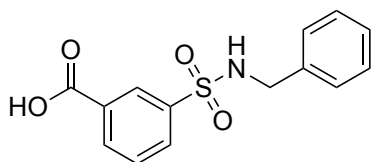
Verim: 666 mg, %61

CAS: 4025-64-3

Erime noktası: 110-110,3 °C (127-131 °C [363])

C₇H₄ClO₄S için HRMS (*m/z*) [M-H]⁺ Hesaplanan: 218,9519; Bulunan: 218,9516

3-(N-Benzilsülfamoil)benzoik asit (1a)



3-(Klorosülfonil)benzoik asit (1066 mg; 4,84 mmol) ve benzilaminden (794 µl; 7,26 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiştir. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

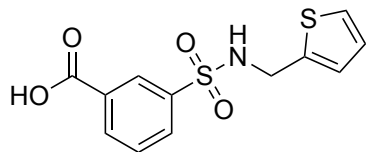
Verim: 807 mg, %57

CAS: 7326-77-4

Erime noktası: 226,3-226,8 °C

C₁₄H₁₂NO₄S için HRMS (*m/z*) [M-H]⁺ Hesaplanan: 290,0487; Bulunan: 290,0486

3-[N-(Tiyofen-2-ilmetil)sülfamoil]benzoik asit (**1b**)



3-(Klorosülfonil)benzoik asit (300 mg; 1,36 mmol) ve tiyofen-2-ilmetanaminden (209 µl; 2,04 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiştir. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

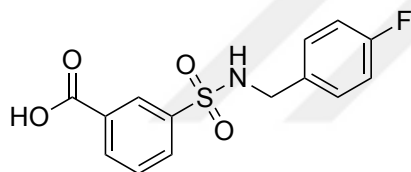
Verim: 228 mg, %56

CAS: 603118-17-8

Erime noktası: 220,7-220,9 °C

C₁₂H₁₀NO₄S₂ için HRMS (*m/z*) [M-H]⁺ Hesaplanan: 296,0051; Bulunan: 296,0051

3-[N-(Tiyofen-2-ilmetil)sülfamoil]benzoik asit (**1c**)



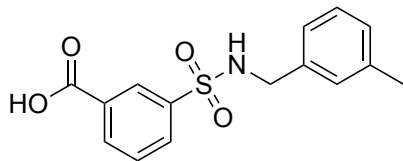
3-(Klorosülfonil)benzoik asit (250 mg; 1,13 mmol) ve 4-florobenzilaminden (194 µl; 1,70 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiştir. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 223 mg, %64

CAS: 1036489-47-0

Erime noktası: 227,1-227,6 °C

C₁₄H₁₁FNO₄S için HRMS (*m/z*) [M-H]⁺ Hesaplanan: 308,0393; Bulunan: 308,0398

3-[N-(3-Metilbenzil)sülfamoil]benzoik asit (**1d**)

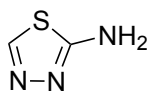
3-(Klorosülfonil)benzoik asit (250 mg; 1,13 mmol) ve 3-metilbenzilamin (213 µl; 1,70 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiştir. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 254 mg, %74

CAS: 1184269-30-4

Erime noktası: 220,1-220,4 °C

C₁₅H₁₄NO₄S için HRMS (*m/z*) [M-H]⁺ Hesaplanan: 304,0644; Bulunan: 304,0653

1,3,4-Tiyadiazol-2-amin (**2a**)

Formik asit (207 µl; 5,5 mmol) ve tiyosemikarbazitten (457 mg; 5 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş ve ileri saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamakta kullanılmıştır. Pembe renkte katı bir bileşiktir.

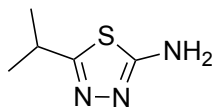
Verim: 80 mg, %15

CAS: 4005-51-0

Erime noktası: 220,7-220,9 °C (187-192 °C [364])

C₂H₄N₃S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 102,0126; Bulunan: 102,0125

5-İzopropil-1,3,4-tiyadiazol-2-amin (**2b**)



2-Metilpropanoik asit (305 μ l; 3,3 mmol) ve tiyosemikarbazitten (274 mg; 3 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş ve ileri saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamakta kullanılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

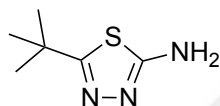
Verim: 372 mg, %87

CAS: 27115-74-8

Erime noktası: 178,9-179,6 °C (189-190 °C [365])

C₅H₁₀N₃S için HRMS (m/z) [M+H]⁺ Hesaplanan: 144,0595; Bulunan: 144,0602

5-(*ter*-Bütil)-1,3,4-tiyadiazol-2-amin (**2c**)



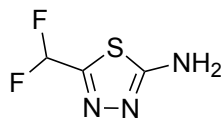
2,2-Dimetilpropanoik asit (224 mg; 2,2 mmol) ve tiyosemikarbazitten (182 mg; 2 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş ve ileri saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamakta kullanılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 246 mg, %78

CAS: 39222-73-6

Erime noktası: 179-179,9 °C (180-181 °C [366])

C₆H₁₂N₃S için HRMS (m/z) [M+H]⁺ Hesaplanan: 158,0752; Bulunan: 158,0745

5-(Diflorometil)-1,3,4-tiyadiazol-2-amin (2d)

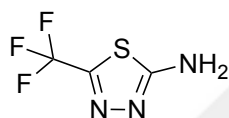
Difloroasetik asit (81 μ l; 2,2 mmol) ve tiyosemikarbazitten (182 mg; 2 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş ve ileri saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamakta kullanılmıştır. Beyaz renkte katı bir bileşiktir.

Verim: 237 mg, %78

CAS: 25306-15-4

Erime noktası: 184-185 °C (182-183 °C [367])

C₃H₄F₂N₃S için HRMS (m/z) [M+H]⁺ Hesaplanan: 152,0094; Bulunan: 152,0098

5-(Triflorometil)-1,3,4-tiyadiazol-2-amin (2e)

Trifloroasetik asit (168 μ l; 2,2 mmol) ve tiyosemikarbazitten (182 mg; 2 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş ve ileri saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamakta kullanılmıştır. Beyaz-pembe renkte katı bir bileşiktir.

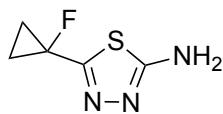
Verim: 196 mg, %58

CAS: 10444-89-0

Erime noktası: 214,8-215,3 °C (215,9-217,9 °C [368])

C₃H₃F₃N₃S için HRMS (m/z) [M+H]⁺ Hesaplanan: 170,0000; Bulunan: 170,0006

5-(1-Florosiklopropil)-1,3,4-tiyadiazol-2-amin (2f)



1-Florosiklopropankarboksilik asit (229 mg; 2,2 mmol) ve tiyosemikarbazitten (182 mg; 2 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş ve ileri saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamakta kullanılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

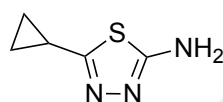
Verim: 141mg, %44

CAS: 2924114-85-0

Erime noktası: 223,7-224,5 °C

C₅H₇FN₃S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 160,0345; Bulunan: 160,0347

5-Siklopropil-1,3,4-tiyadiazol-2-amin (2g)



Siklopropankarboksilik asit (463 µl; 5,8 mmol) ve tiyosemikarbazitten (795 mg; 8,7 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş ve ileri saflaştırma işlemi yapılmadan bir sonraki basamakta kullanılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

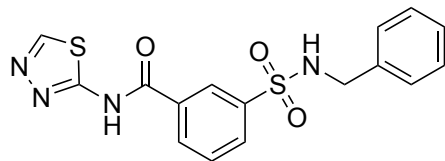
Verim: 649 mg, %79

CAS: 57235-50-4

Erime noktası: 210,9-211,4 °C (214–216 °C [369])

C₅H₈N₃S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 142,0439; Bulunan: 142,0439

3-(*N*-Benzilsülfamoil)-*N*-(1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (**STF1**)



3-(*N*-Benzilsülfamoil)benzoik asit (**1a**) (131 mg; 0,45 mmol) ve 1,3,4-tiyadiazol-2-aminden (**2a**) (46 mg; 0,45 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (50:50) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 119 mg, %70

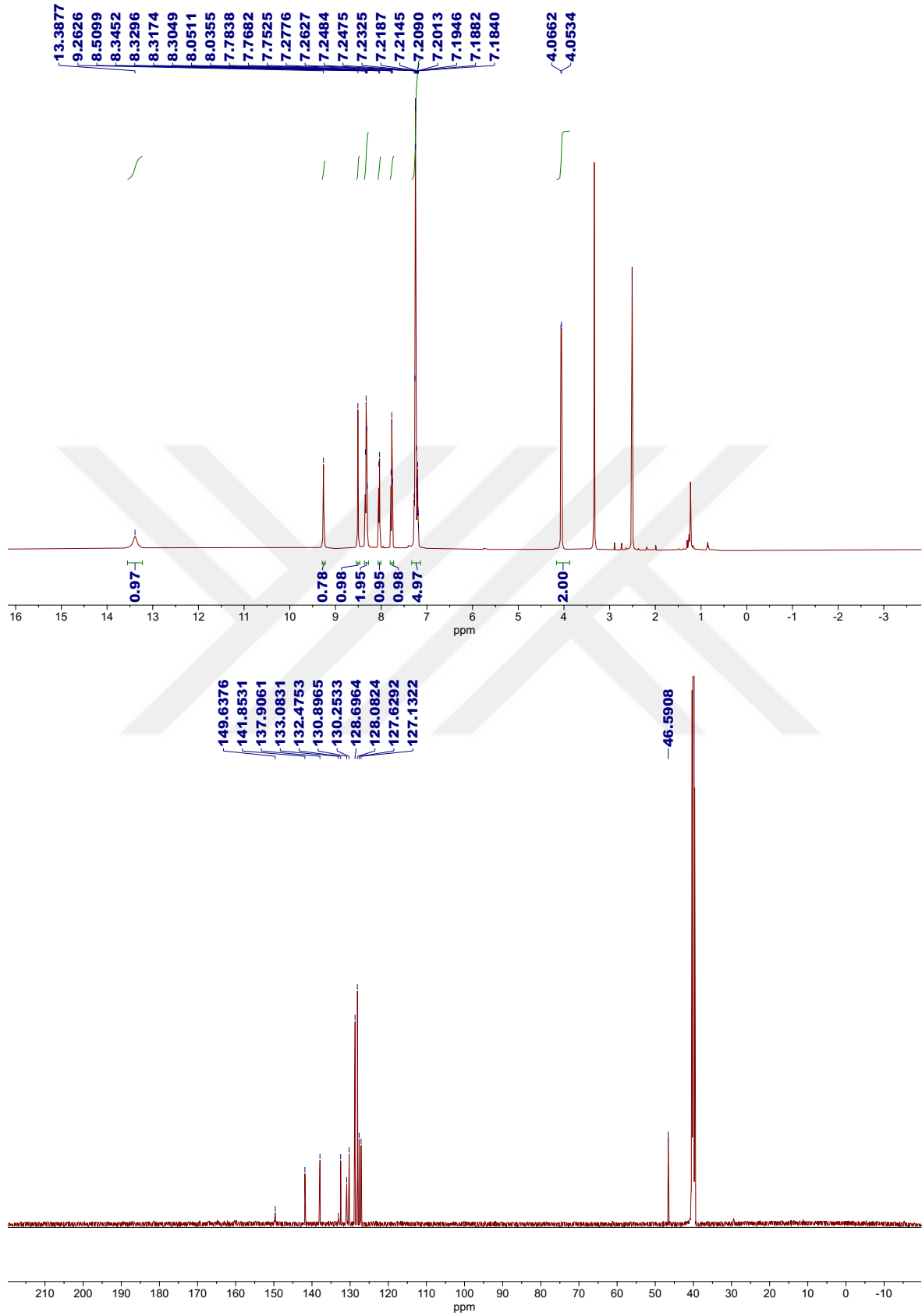
CAS: 1208486-48-9

Erime noktası: 187,3-188,6 °C

C₁₈H₁₈N₅O₃S₂ için HRMS (*m/z*) [M+H+ACN]⁺ Hesaplanan: 416,0851; Bulunan: 416,0851

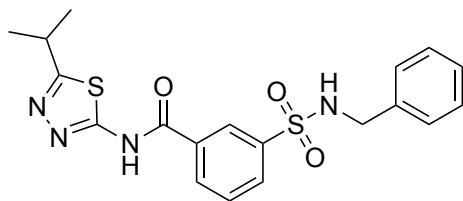
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 4,06 (2H, d, *J*=6,4 Hz, -CH₂-); 7,18-7,28 (5H, m, Ar-H); 7,77 (1H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 8,04 (1H, d, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 8,31-8,35 (2H, m, Ar-H ve -SO₂NH-); 8,51 (1H, s, Ar-H); 9,26 (1H, s, Ar-H); 13,39 (1H, br s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 46,59; 127,13; 127,63; 128,08; 128,70; 130,25; 130,90; 132,48; 133,08; 137,91; 141,85; 149,64.



Şekil 4.9. Bileşik STF1'in ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

3-(*N*-Benzilsülfamoil)-*N*-(5-izopropil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (**STF2**)



3-(*N*-Benzilsülfamoil)benzoik asit (**1a**) (166 mg; 0,57 mmol) ve 5-izopropil-1,3,4-tiyadiazol-2-aminden (**2b**) (82 mg; 0,57 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (60:40) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 202 mg, %85

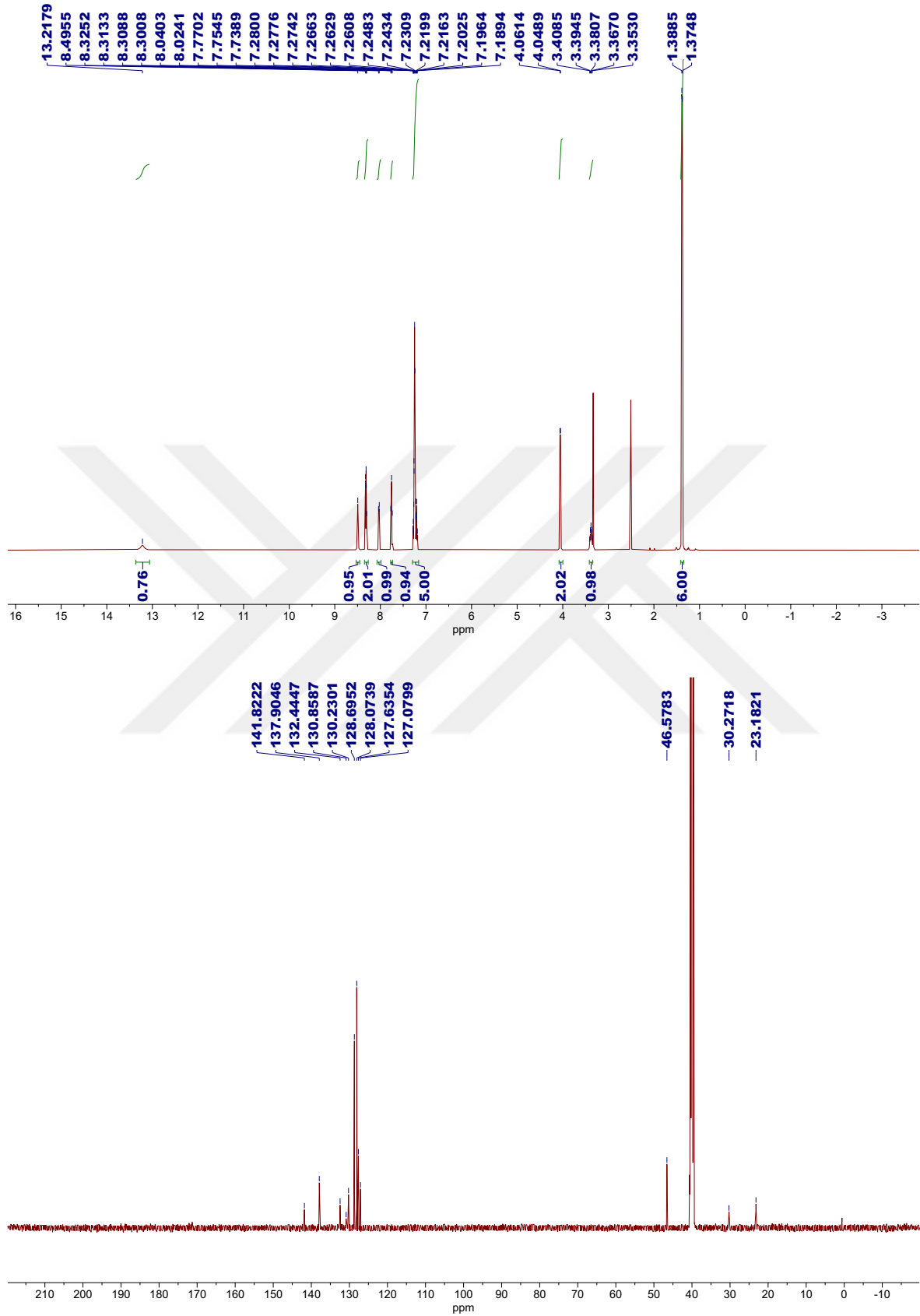
CAS: 1031033-20-1

Erime noktası: 199-199,4 °C

C₁₉H₂₁N₄O₃S₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 417,1055; Bulunan: 417,1055

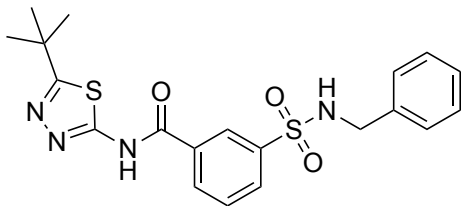
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 1,38 (6H, d, *J*=6,9 Hz, (CH₃)₂-); 3,35-3,41 (1H, m, -CH-); 4,06 (2H, d, *J*=6,3 Hz, -CH₂-); 7,19-7,28 (5H, m, Ar-H); 7,76 (1H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 8,03 (1H, d, *J*=8,1 Hz, Ar-H); 8,30-8,33 (2H, m, Ar-H ve -SO₂NH-); 8,50 (1H, s, Ar-H); 13,22 (1H, br s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 23,18; 30,27; 46,58; 127,08; 127,64; 128,07; 128,70; 130,23; 130,86; 132,45; 137,91; 141,82.



Şekil 4.10. Bileşik STF2'nin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

3-(*N*-Benzilsülfamoil)-*N*-[5-(*ter*-bütil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il]benzamid (**STF3**)



3-(*N*-Benzilsülfamoil)benzoik asit (**1a**) (122 mg; 0,42 mmol) ve 5-(*ter*-bütil)-1,3,4-tiyadiazol-2-amin (**2c**) (66 mg; 0,42 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş ve sırasıyla eter ve aseton ile yıkanarak saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

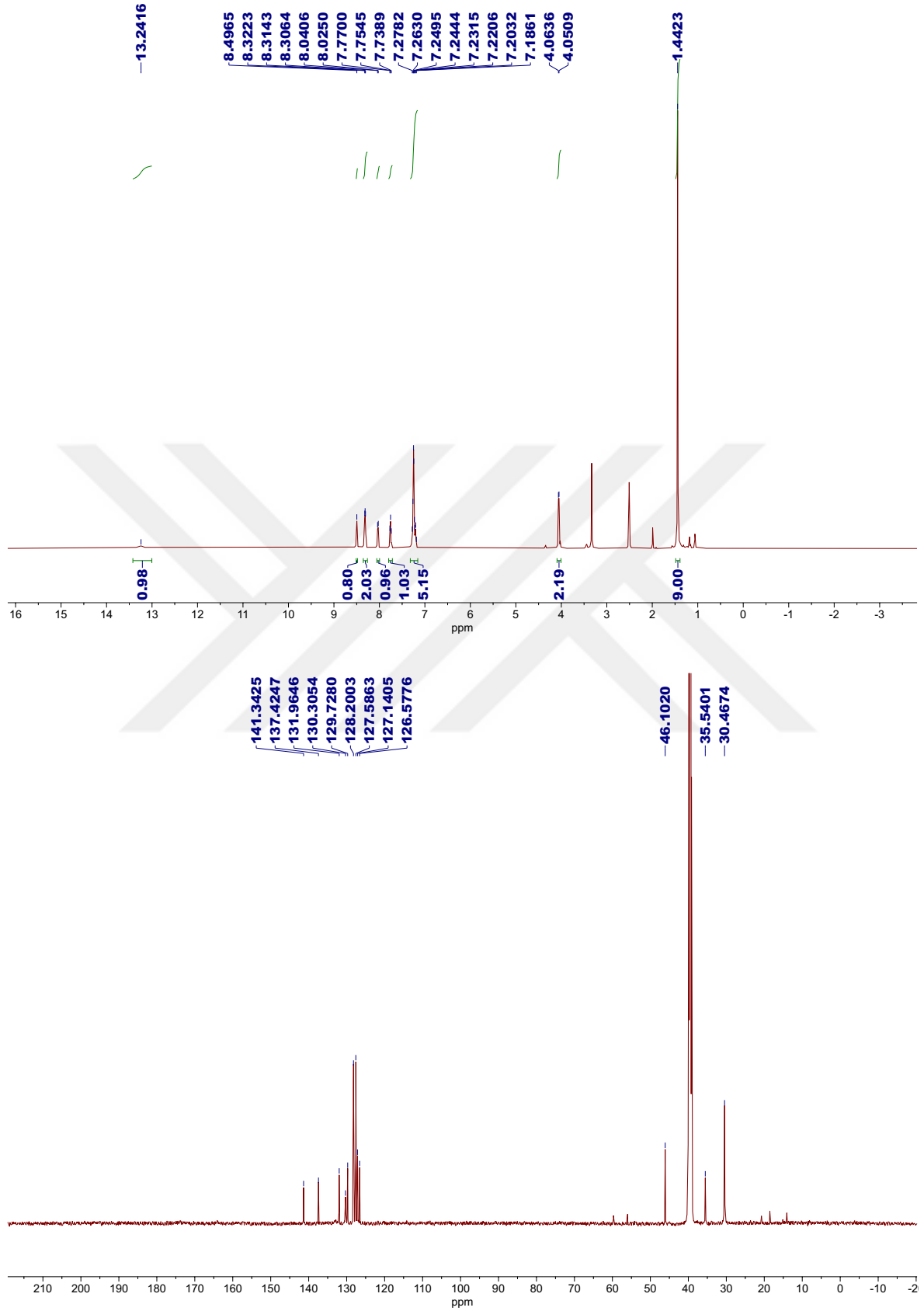
Verim: 144 mg, %80

Erime noktası: 217,7-218,3 °C

C₂₀H₂₃N₄O₃S₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 431,1212; Bulunan: 431,1233

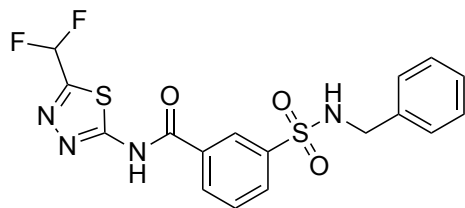
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 1,44 (9H, s, (CH₃)₃C-); 4,06 (2H, d, *J*=6,4 Hz, -CH₂-); 7,19-7,28 (5H, m, Ar-H); 7,76 (1H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 8,03 (1H, d, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 8,31-8,32 (2H, m, Ar-H ve -SO₂NH-); 8,50 (1H, s, Ar-H); 13,24 (1H, br s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 30,47; 35,54; 46,10; 126,58; 127,14; 127,59; 128,20; 129,73; 130,31; 131,97; 137,43; 141,34.



Şekil 4.11. Bileşik STF3'ün ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

3-(*N*-Benzilsülfamoil)-*N*-[5-(diflorometil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il]benzamid (**STF4**)



3-(*N*-Benzilsülfamoil)benzoik asit (**1a**) (189 mg; 0,65 mmol) ve 5-(diflorometil)-1,3,4-tiyadiazol-2-amin (**2d**) (102 mg; 0,65 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş ve *n*-hekzan:etilasetat (60:40) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

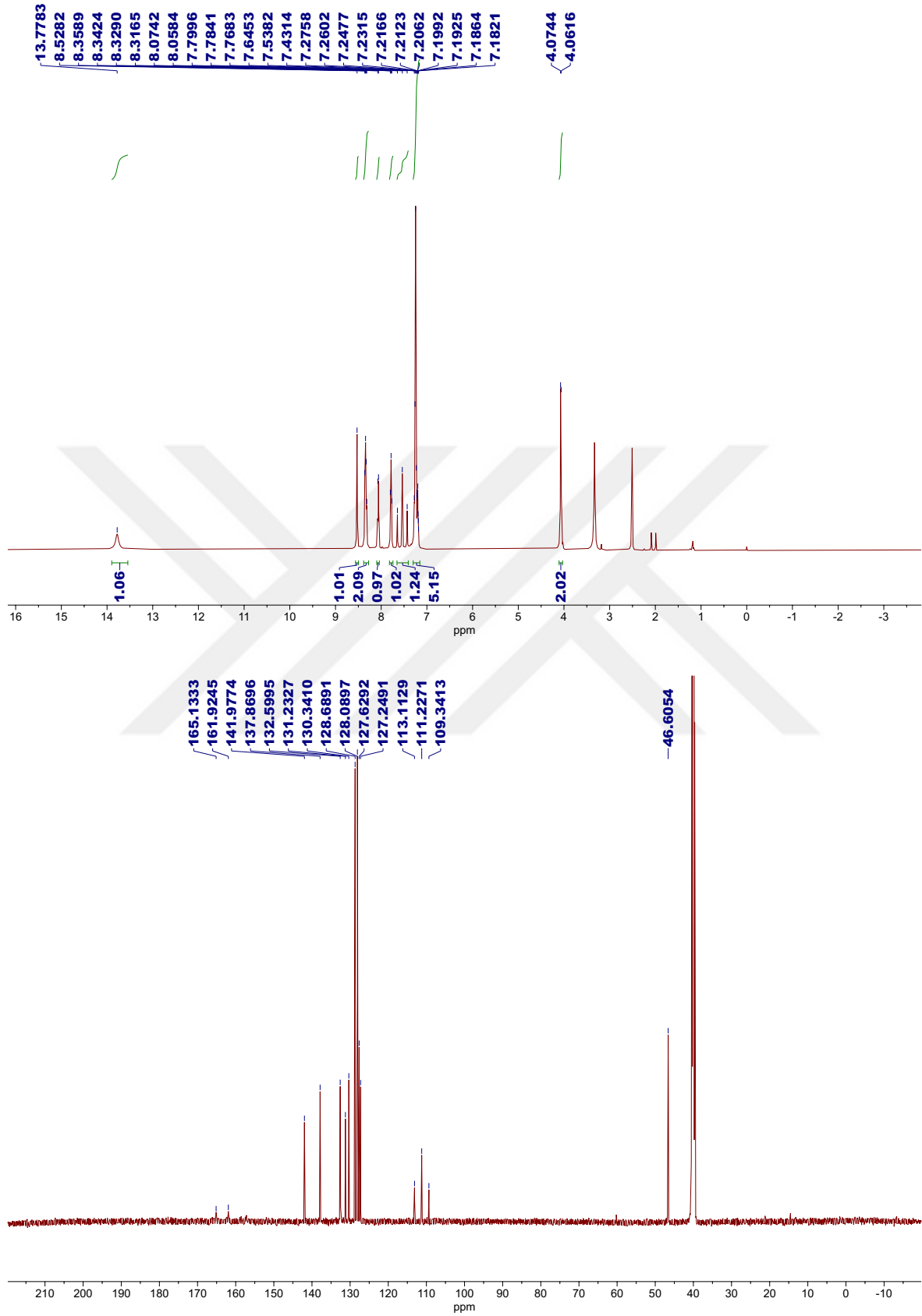
Verim: 50 mg, %28

Erime noktası: 196,9-197,3 °C

C₁₉H₁₈F₂N₅O₃S₂ için HRMS (*m/z*) [M+H+ACN]⁺ Hesaplanan: 466,0819; Bulunan: 466,0824

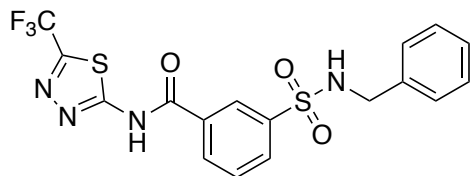
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 4,07 (2H, d, *J*=6,4 Hz, -CH₂-); 7,18-7,28 (5H, m, Ar-H); 7,54 (1H, t, ¹*J*_{HF}=53,5 Hz, CF₂H-); 7,78 (1H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 8,07 (1H, d, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 8,32-8,36 (2H, m, Ar-H ve -SO₂NH-); 8,53 (1H, s, Ar-H); 13,78 (1H, br s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 46,61; 111,23 (t, ¹*J*_{CF}=235,7 Hz); 127,25; 127,63; 128,09; 128,69; 130,34; 131,23; 132,60; 137,87; 141,97; 161,93; 165,13.



Şekil 4.12. Bileşik STF4'ün ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

3-(*N*-Benzilsülfamoil)-*N*-[5-(triflorometil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il]benzamid (**STF5**)



3-(*N*-Benzilsülfamoil)benzoik asit (**1a**) (111 mg; 0,38 mmol) ve 5-(triflorometil)-1,3,4-tiyadiazol-2-amin (**2e**) (65 mg; 0,38 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (70:30) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 120 mg, %71

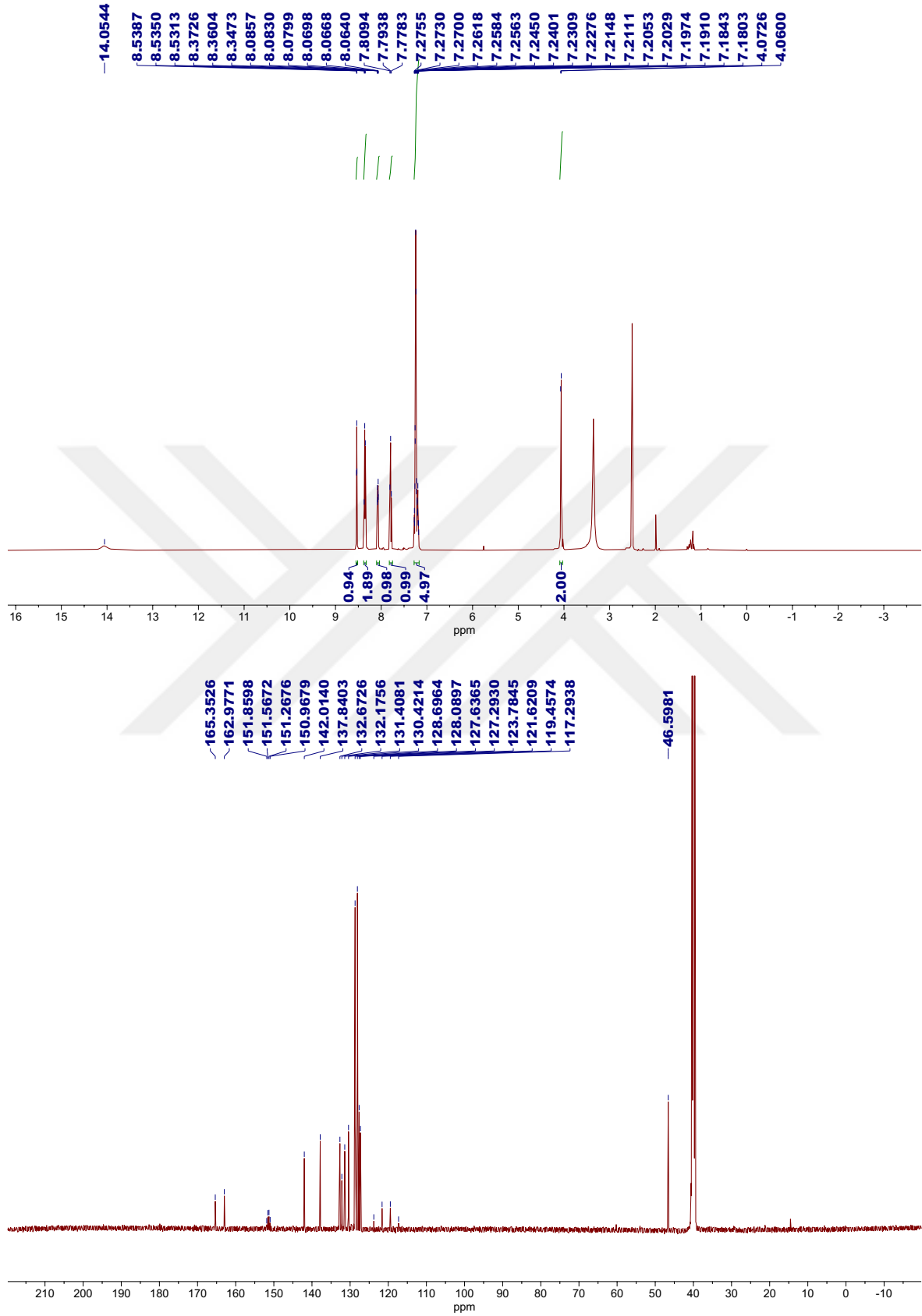
CAS: 1387030-73-0

Erime noktası: 196-196,5 °C

C₁₉H₁₇F₃N₅O₃S₂ için HRMS (*m/z*) [M+H+ACN]⁺ Hesaplanan: 484,0725; Bulunan: 484,0734

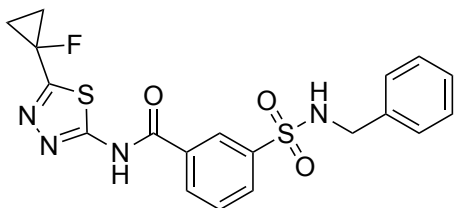
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 4,07 (2H, d, *J*=6,3 Hz, -CH₂-); 7,18-7,28 (5H, m, Ar-H); 7,79 (1H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 8,07 (1H, dt, *J*=8,1 Hz ve 1,4 Hz, Ar-H); 8,35-8,37 (2H, m, Ar-H ve -SO₂NH-); 8,54 (1H, t, *J*=1,8 Hz, Ar-H); 14,05 (1H, br s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 49,60; 120,54 (q, ¹*J*_{CF}=270,5 Hz); 127,29; 127,64; 128,09; 128,70; 130,42; 131,41; 132,18; 132,67; 137,84; 142,01; 151,41 (q, ²*J*_{CF}=37,5 Hz); 162,98; 165,35.



Şekil 4.13. Bileşik STF5'in ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

3-(*N*-Benzilsülfamoil)-*N*-[5-(1-florosiklopropil)-1,3,4-tiyadiazol-2-il]benzamid (**STF6**)



3-(*N*-Benzilsülfamoil)benzoik asit (**1a**) (82 mg; 0,28 mmol) ve 5-(1-florosiklopropil)-1,3,4-tiyadiazol-2-amin (**2f**) (45 mg; 0,28 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (60:40) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

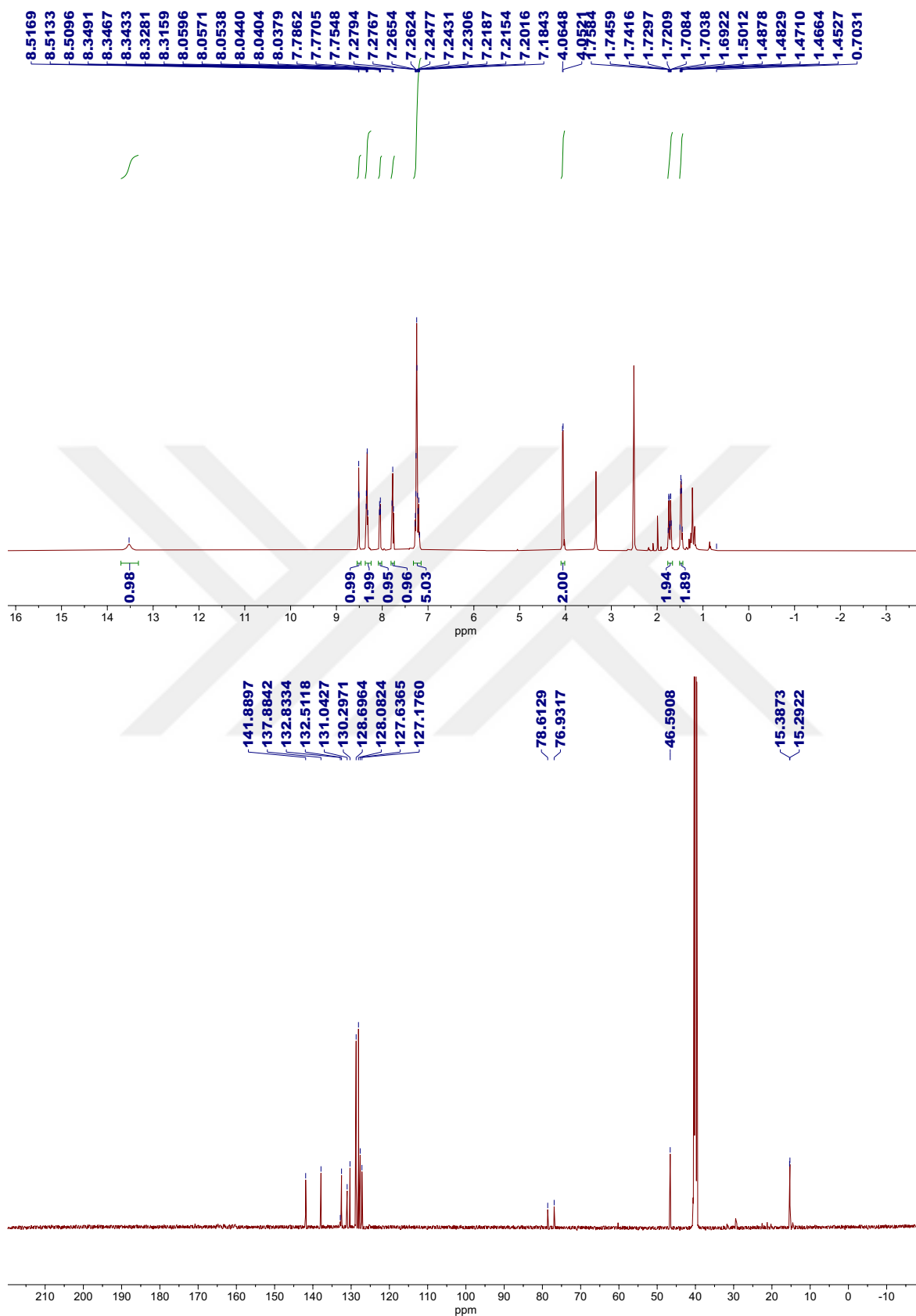
Verim: 43 mg, %35

Erime noktası: 210-210,9 °C

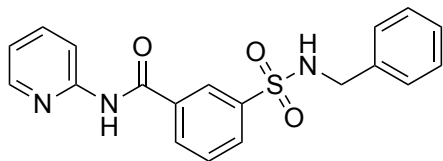
C₁₉H₁₈FN₄O₃S₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 433,0804; Bulunan: 433,0792

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 1,45-1,50 (2H, m, siklopropan -CH₂-); 1,69-1,76 (2H, m, siklopropan -CH₂-); 4,06 (2H, d, *J*=6,4 Hz, -CH₂-); 7,18-7,28 (5H, m, Ar-H); 7,77 (1H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 8,05 (1H, dt, *J*=7,9 Hz ve 1,2 Hz, Ar-H); 8,32-8,35 (2H, m, Ar-H ve -SO₂NH-); 8,51 (1H, t, *J*=1,8 Hz, Ar-H); 13,53 (1H, br s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 15,34 (d, ²*J*_{CF}=11,9 Hz); 46,59; 77,77 (d, ¹*J*_{CF}=210,2 Hz); 127,18; 127,64; 128,08; 128,70; 130,30; 131,04; 132,51; 132,83; 137,88; 141,89.



Şekil 4.14. Bileşik STF6'nın ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları

3-(*N*-Benzilsülfamoil)-*N*-(piridin-2-il)benzamid (STF7)

3-(*N*-Benzilsülfamoil)benzoik asit (**1a**) (122 mg; 0,42 mmol) ve 2-aminopiridinden (39 mg; 0,42 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:aseton (80:20) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 65 mg, %42

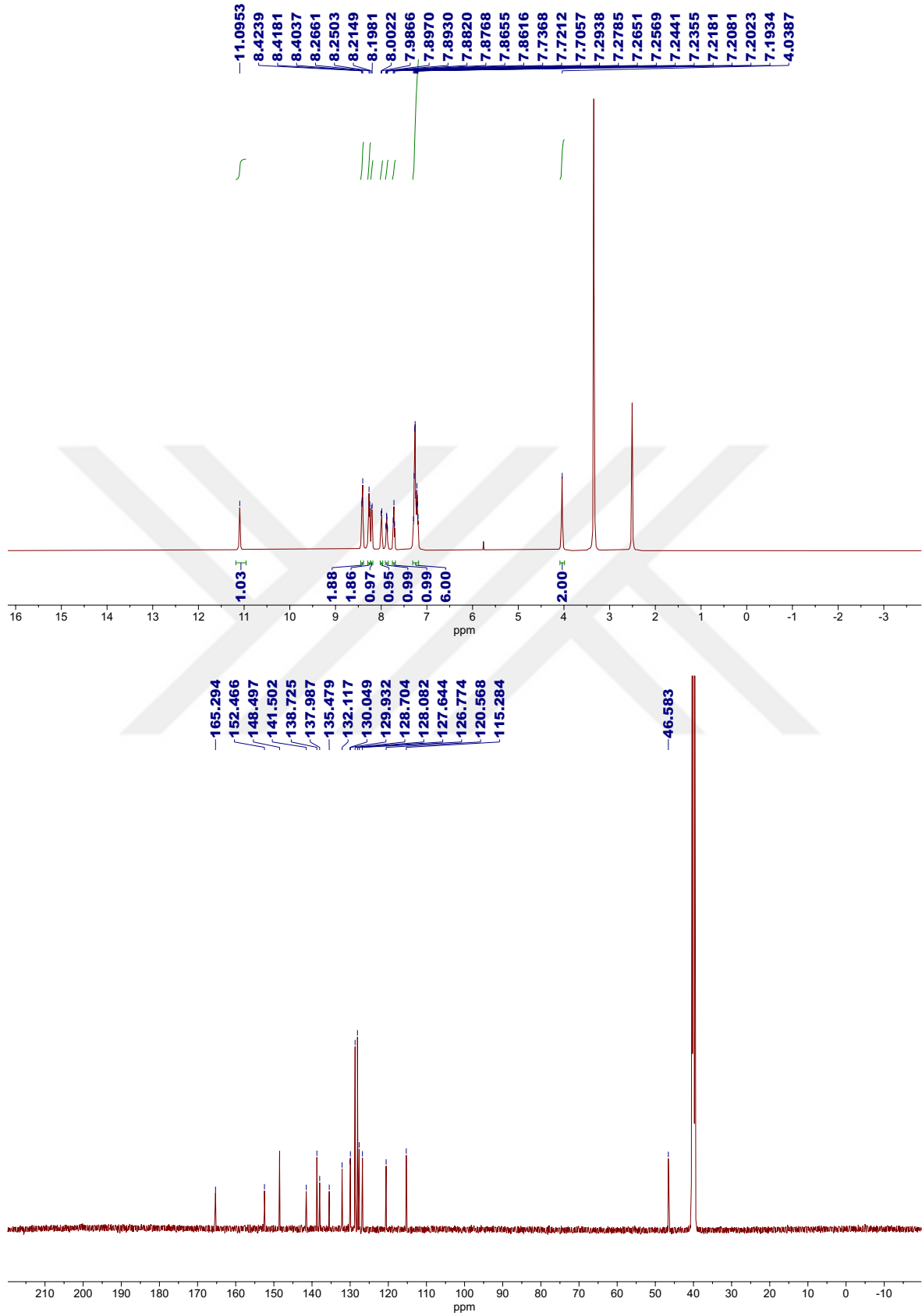
CAS: 1287062-44-5

Erime noktası: 157,8-159 °C

C₁₉H₁₈N₃O₃S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 368,1069; Bulunan: 368,1065

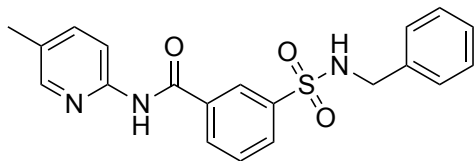
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 4,04 (2H, s, -CH₂-); 7,19-7,29 (6H, m, Ar-H); 7,72 (1H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 7,86-7,90 (1H, m, Ar-H); 7,99 (1H, d, *J*=7,8 Hz, Ar-H); 8,21 (1H, d, *J*=8,3 Hz, Ar-H); 8,25-8,27 (2H, m, Ar-H ve -SO₂NH-); 8,40-8,42 (2H, m, Ar-H); 11,10 (1H, s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 46,58; 115,28; 120,57; 126,77; 127,64; 128,08; 128,70; 129,93; 130,05; 132,12; 135,48; 137,99; 138,73; 141,50; 148,50; 152,47; 165,29.



Şekil 4.15. Bileşik STF7'nin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

3-(*N*-Benzilsülfamoil)-*N*-(5-metilpiridin-2-il)benzamid (STF8)



3-(*N*-Benzilsülfamoil)benzoik asit (**1a**) (84 mg; 0,29 mmol) ve 2-amino-5-metilpiridinden (31 mg; 0,29 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan:etil asetat (50:50) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

Verim: 24 mg, %22

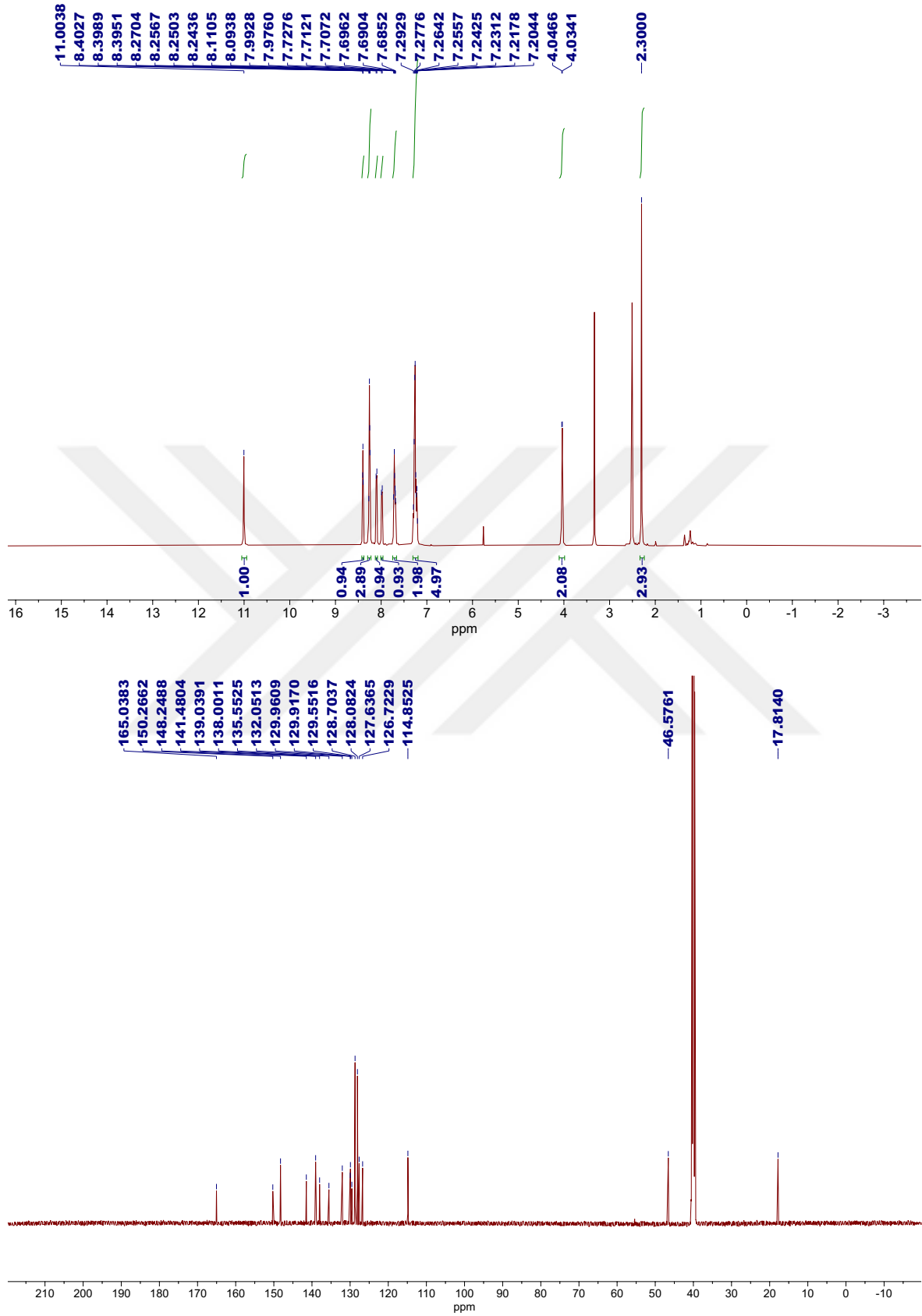
CAS: 1031085-88-7

Erime noktası: 166,2-166,8 °C

C₂₀H₂₀N₃O₃S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 382,1225; Bulunan: 382,1238

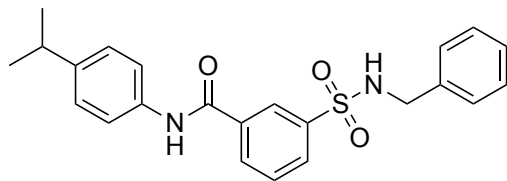
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 2,30 (3H, s); 4,04 (2H, d, *J*=6,3 Hz, -CH₂-); 7,20-7,29 (5H, m, Ar-H); 7,69-7,73 (2H, m, Ar-H); 7,98 (1H, d, *J*=8,4 Hz, Ar-H); 8,10 (1H, d, *J*=8,4 Hz, Ar-H); 8,24-8,27 (3H, m, Ar-H ve -SO₂NH-); 8,40 (1H, t, *J*=1,9 Hz, Ar-H); 11,00 (1H, s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 17,81; 46,58; 114,85; 126,72; 127,64; 128,08; 128,70; 129,55; 129,92; 129,96; 132,05; 135,55; 138,00; 139,04; 141,48; 148,25; 150,27; 165,04.



Şekil 4.16. Bileşik STF8'in ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

3-(*N*-Benzilsülfamoil)-*N*-(4-izopropilfenil)benzamid (STF9)



3-(*N*-Benzilsülfamoil)benzoik asit (**1a**) (82 mg; 0,28 mmol) ve 4-izopropilanilinden (38 µl; 0,28 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, *n*-hekzan ve diklorometan ile yıkanarak saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

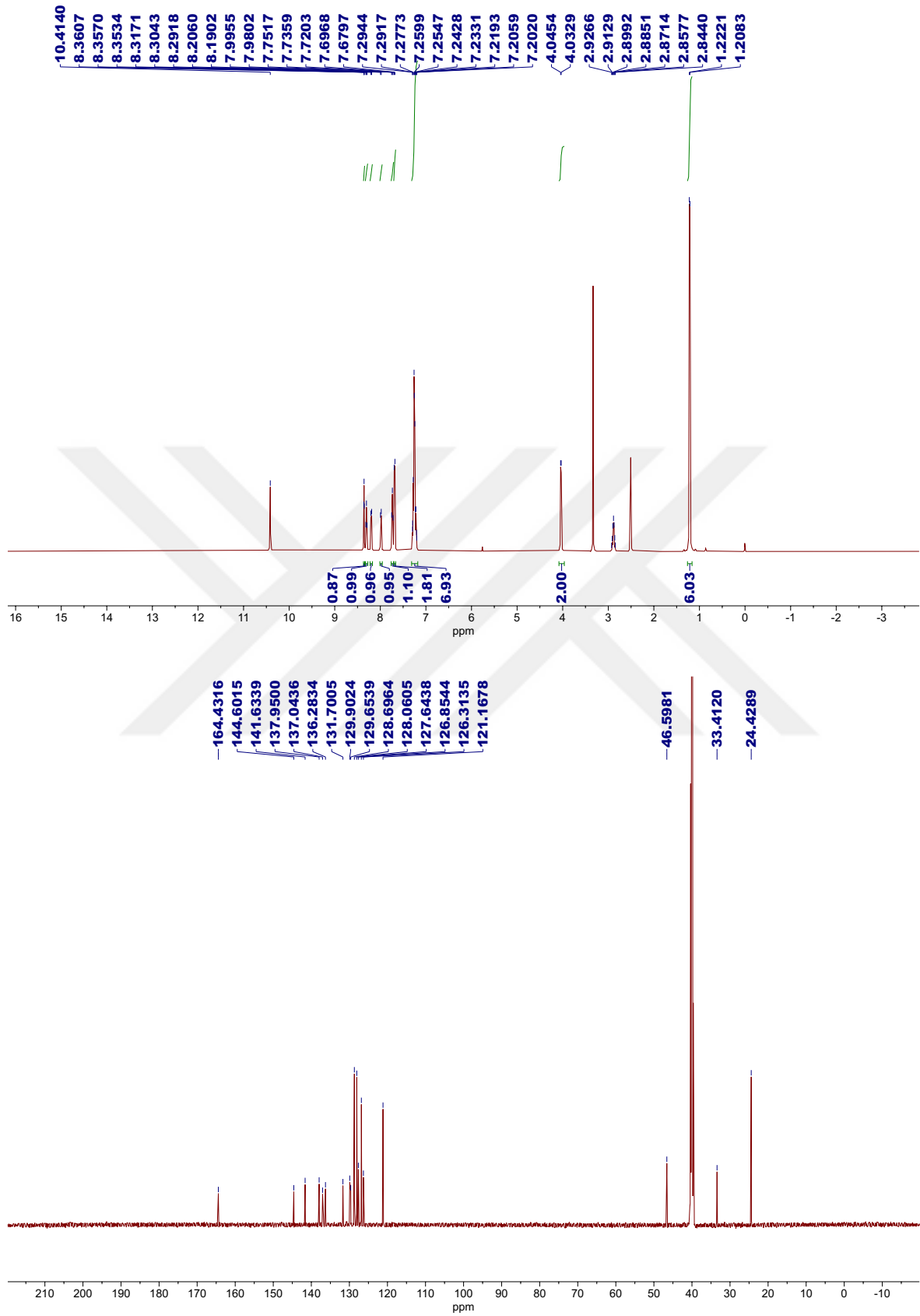
Verim: 82 mg, %72

Erime noktası: 141,8-142,2 °C

C₂₃H₂₅N₂O₃S için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 409,1586; Bulunan: 409,1593

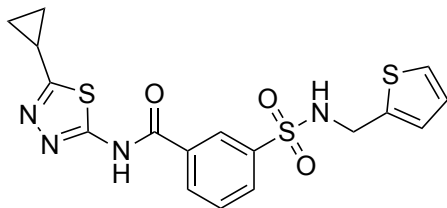
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 1,22 (6H, d, *J*=6,9 Hz, (CH₃)₂-); 2,84-2,93 (1H, m, -CH-); 4,04 (2H, d, *J*=6,3 Hz, -CH₂-); 7,20-7,29 (7H, m, Ar-H); 7,69 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H); 7,74 (1H, t, *J*=7,9 Hz, Ar-H); 7,99 (1H, d, *J*=7,7 Hz, Ar-H); 8,20 (1H, d, *J*=7,9 Hz, Ar-H); 8,30 (1H, t, *J*=6,3 Hz, -SO₂NH-); 8,36 (1H, t, *J*=1,8 Hz, Ar-H); 10,41 (1H, s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ ppm: 24,43; 33,41; 46,60; 121,17; 126,31; 126,85; 127,64; 128,06; 128,70; 129,65; 129,90; 131,70; 136,28; 137,04; 137,95; 141,63; 144,60; 164,43.



Şekil 4.17. Bileşik STF9'un ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

3-[N-(Tiyofen-2-ilmetil)sülfamoil]-N-(5-siklopropil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (STF10)



3-[N-(Tiyofen-2-ilmetil)sülfamoil]benzoik asit (**1b**) (80 mg; 0,27 mmol) ve 5-siklopropil-1,3,4-tiyadiazol-2-aminden (**2g**) (38 mg; 0,27 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, aseton ve petrol eteri ile yıkanarak saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

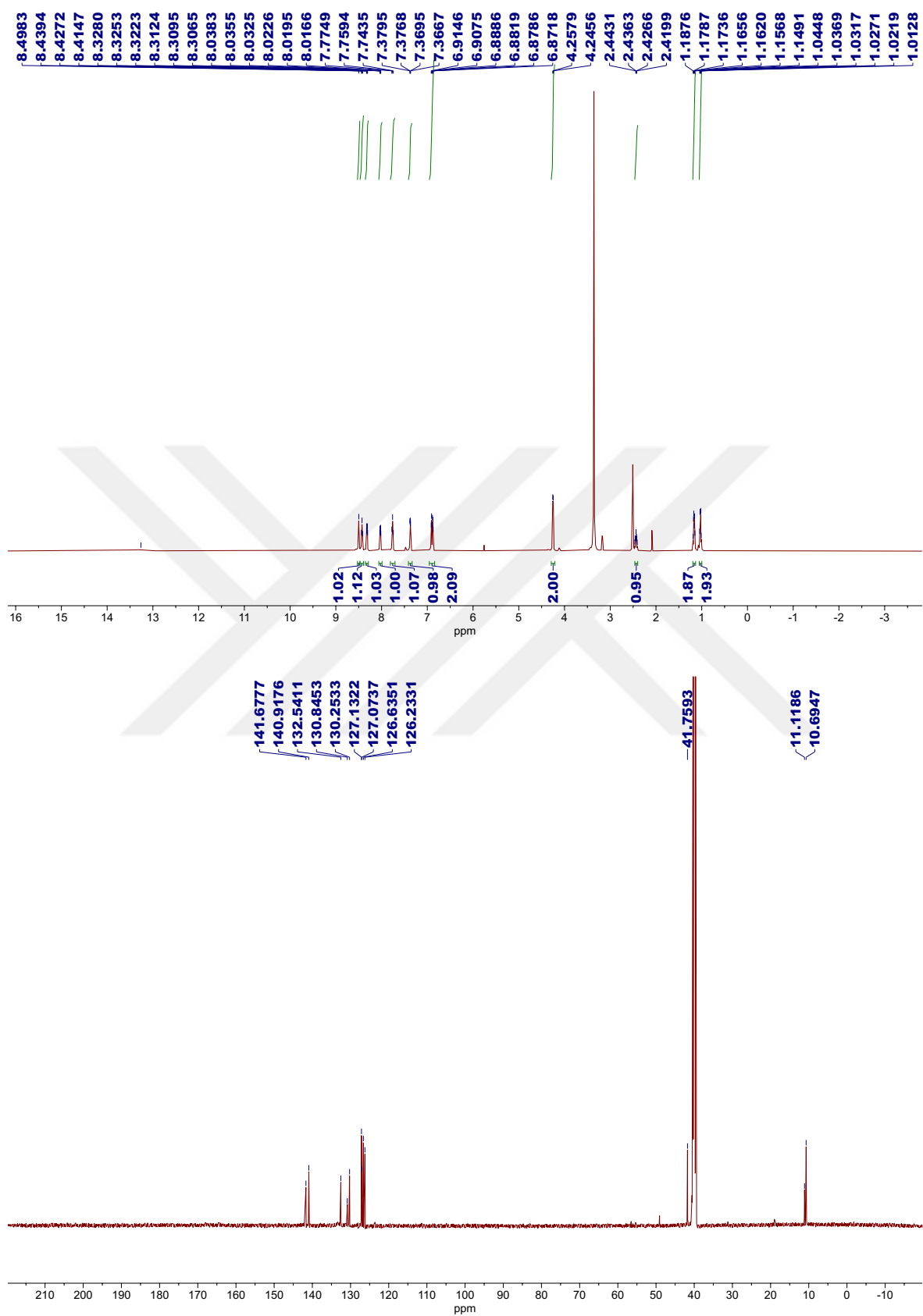
Verim: 30 mg, %26

Erime noktası: 203,2-204 °C

C₁₇H₁₇N₄O₃S₃ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 421,0463; Bulunan: 421,0479

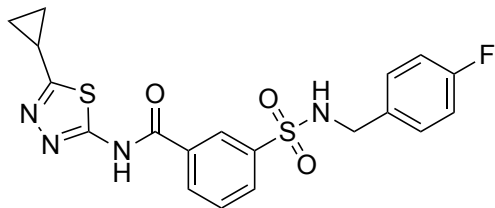
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 1,01-1,05 (2H, m, siklopropan -CH₂-), 1,15-1,19 (2H, m, siklopropan -CH₂-); 2,41-2,46 (1H, m, siklopropan -CH-); 4,25 (2H, d, *J*=6,2 Hz, -CH₂-); 6,87-6,91 (2H, m, Ar-H); 7,37 (1H, dd, *J*=5 Hz ve 1,4 Hz); 7,76 (1H, t, *J*=7,9 Hz, Ar-H); 8,03 (1H, dt, *J*=8 Hz ve 1,4 Hz, Ar-H); 8,32 (1H, dt, *J*=7,9 Hz ve 1,4 Hz, Ar-H); 8,43 (1H, t, *J*=6,2 Hz, -SO₂NH-); 8,50 (1H, s, Ar-H); 13,26 (1H, br s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 10,70; 11,12; 41,76; 126,23; 126,64; 127,07; 127,13; 130,25; 130,85; 132,54; 140,92; 141,68.



Şekil 4.18. Bileşik STF10'un ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

3-[N-(4-Florobenzil)sülfamoil]-N-(5-siklopropil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (STF11)



3-[N-(4-Florobenzil)sülfamoil]benzoik asit (**1c**) (84 mg; 0,27 mmol) ve 5-siklopropil-1,3,4-tiyadiazol-2-aminden (**2g**) (38 mg; 0,27 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol (98,5:1,5) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

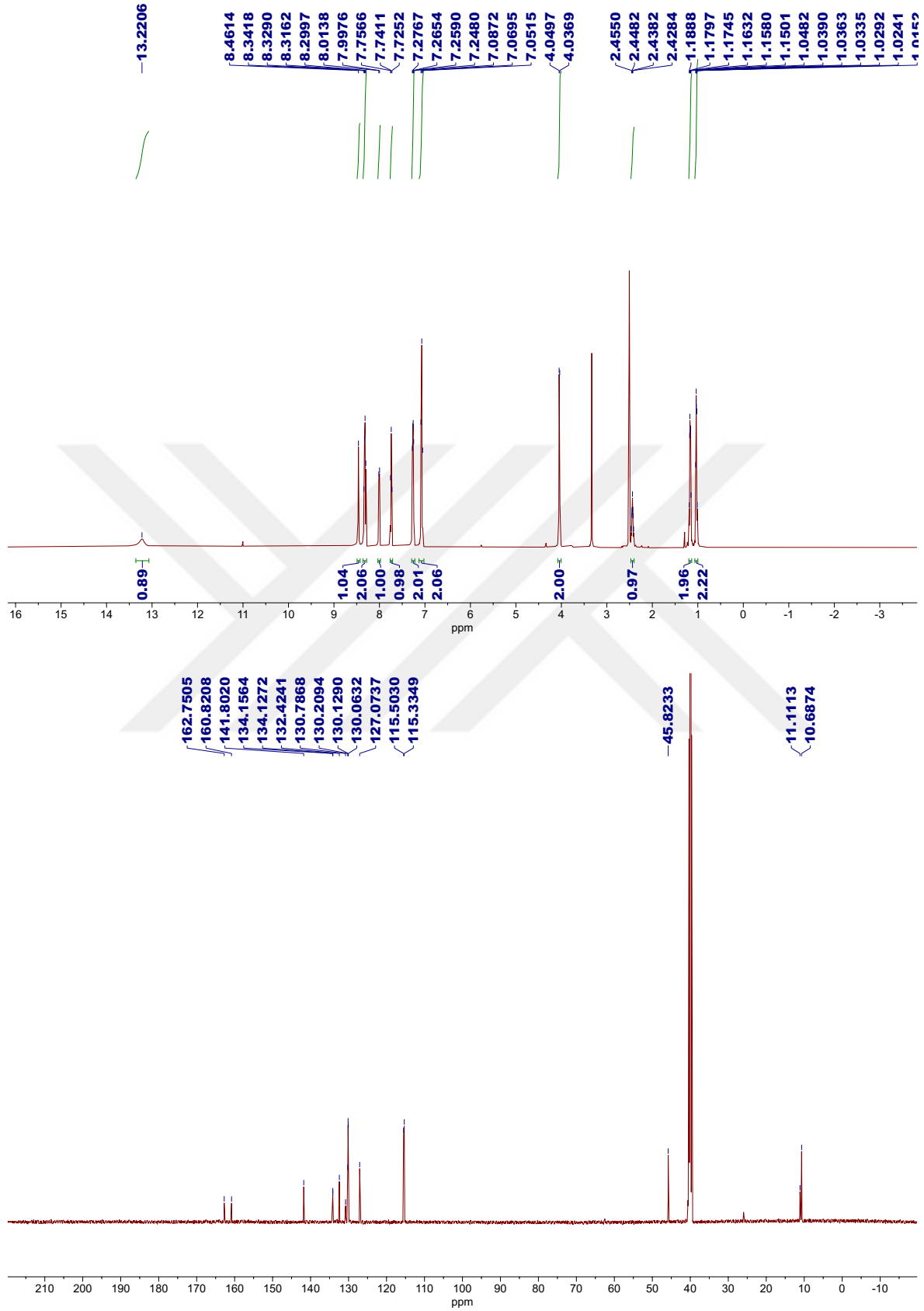
Verim: 65 mg, %55

Erime noktası: 202-202,5 °C

C₁₉H₁₈FN₄O₃S₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 433,0804; Bulunan: 433,0792

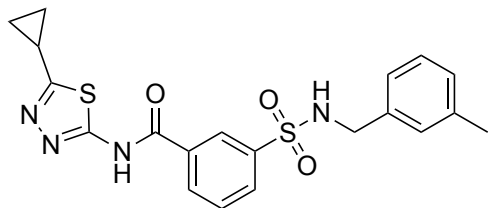
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 1,02-1,05 (2H, m, siklopropan -CH₂-); 1,15-1,19 (2H, m, siklopropan -CH₂-); 2,41-2,47 (1H, m, siklopropan -CH-); 4,04 (2H, d, *J*=6,4 Hz, -CH₂-); 7,07 (2H, t, *J*=8,9 Hz, Ar-H,); 7,25-7,28 (2H, m, Ar-H); 7,74 (1H, t, *J*=7,9 Hz, Ar-H); 8,01 (1H, d, *J*=8,1 Hz, Ar-H); 8,30-8,34 (2H, m, Ar-H ve -SO₂NH-); 8,46 (1H, s, Ar-H); 13,22 (1H, br s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 10,69; 11,11; 45,82; 115,42 (d, ²*J*_{CF}=21,0 Hz); 127,07; 130,10 (d, ³*J*_{CF}=8,2 Hz); 130,21; 132,42; 132,83; 134,14 (d, ⁴*J*_{CF}=3,7 Hz); 141,80; 161,79 (d, ¹*J*_{CF}=241,2 Hz).



Şekil 4.19. Bileşik STF11'in ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

3-[N-(3-Metilbenzil)sülfamoil]-N-(5-siklopropil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)benzamid (STF12)



3-[N-(3-Metilbenzil)sülfamoil]benzoik asit (**1d**) (95 mg; 0,31 mmol) ve 5-siklopropil-1,3,4-tiyadiazol-2-aminden (**2g**) (44 mg; 0,31 mmol) hareketle genel sentez yöntemine göre sentezlenmiş, diklorometan:metanol (99:1) çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Beyaz katı bir bileşiktir.

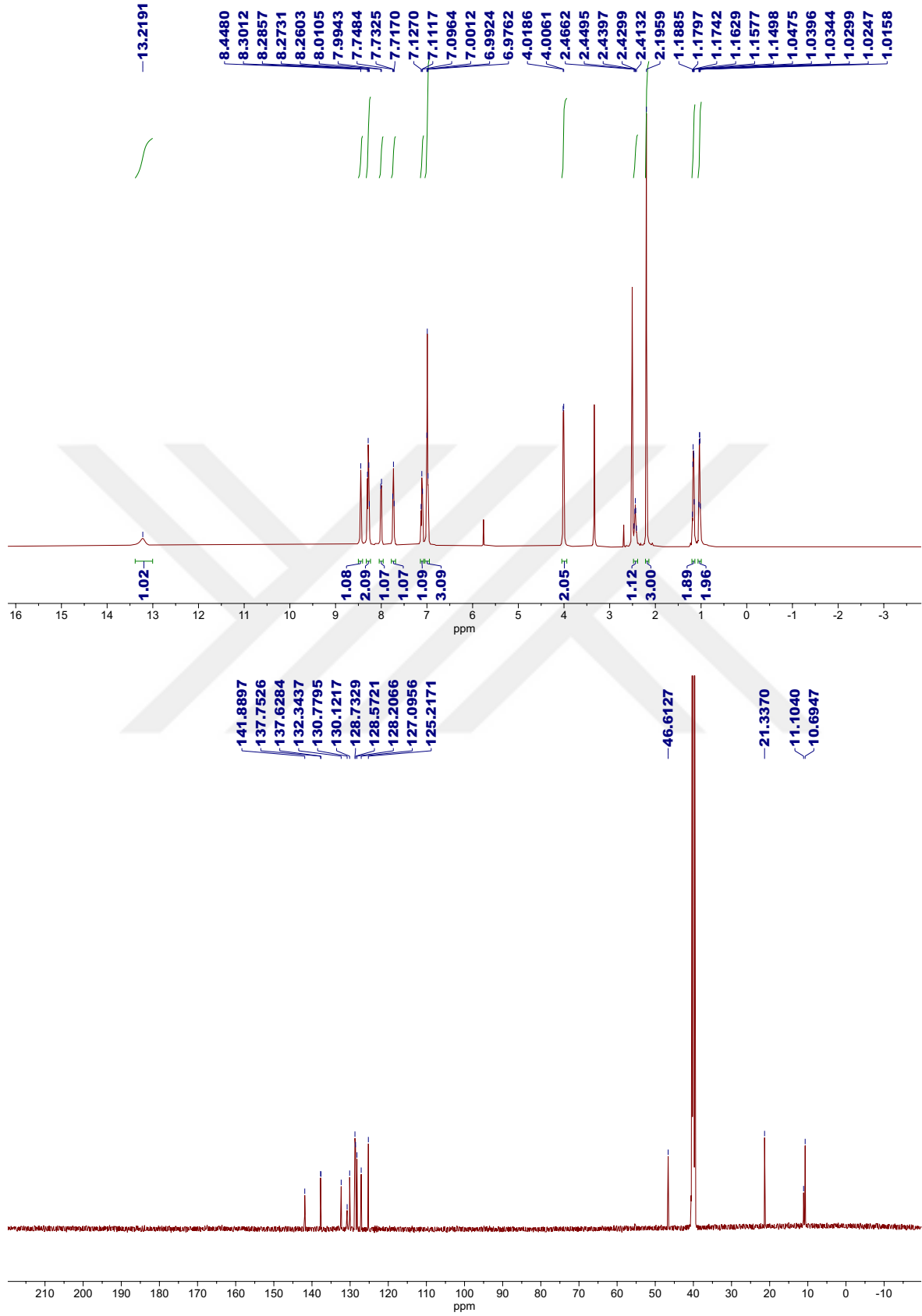
Verim: 60 mg, %45

Erime noktası: 194,2-194,6 °C

C₂₀H₂₁N₄O₃S₂ için HRMS (*m/z*) [M+H]⁺ Hesaplanan: 429,1055; Bulunan: 429,1046

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 1,02-1,05 (2H, m, siklopropan -CH₂-), 1,15-1,19 (2H, m, siklopropan -CH₂-); 2,20 (3H, s); 2,41-2,47 (1H, m, siklopropan -CH-); 4,01 (2H, d, *J*=6,3 Hz, -CH₂-); 6,98-7,01 (3H, m, Ar-H); 7,11 (1H, t, *J*=7,7 Hz, Ar-H); 7,73 (1H, t, *J*=7,9 Hz, Ar-H); 8,00 (1H, d, *J*=8,1 Hz, Ar-H); 8,26-8,30 (2H, m, Ar-H ve -SO₂NH-); 8,44 (1H, s, Ar-H); 13,22 (1H, br s, -NHCO-).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ ppm: 10,70; 11,10; 21,34; 46,61; 125,21; 127,10; 128,21; 128,57; 128,73; 130,12; 130,78; 132,34; 137,63; 137,75; 141,89.



Şekil 4.20. Bileşik STF12'nin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

4.3. Biyolojik Bulgular

4.3.1. NAMPT ve SIRT1-SIRT3 enzim aktivitesi

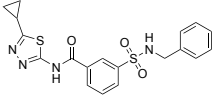
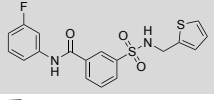
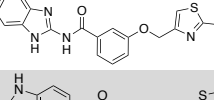
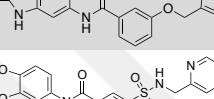
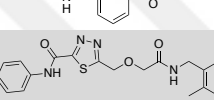
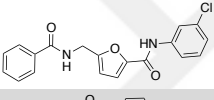
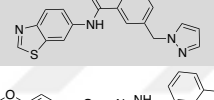
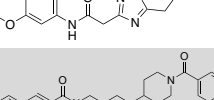
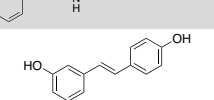
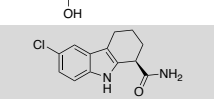
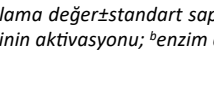
Sanal tarama çıktısı olarak satın alınan (**F1-F9**) ve sentez ve yapı aydınlatma çalışmaları tamamlanan final bileşiklerin (**STF1-STF12**) 100 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlardaki *in vitro* NAMPT ve SIRT1 aktiviteleri, fluorimetrik yöntemle NAMPT ve SIRT1 enzim kitleri kullanılarak belirlenmiştir. Sanal tarama çıktısı bileşiklerin 50 μ M konsantrasyonda SIRT2 ve SIRT3 enzimleri üzerindeki etkileri de belirlenerek izoform selektiviteleri araştırılmıştır. Deneylerde referans madde olarak NAMPT inhibitörü FK866 ($IC_{50}=3$ nM); SIRT1 aktivatörü resveratrol ($EC_{1,5}=23,6$ μ M) ve selektif SIRT1 inhibitörü EX-527 ($IC_{50}=38$ nM; SIRT2 $IC_{50}=19,6$ μ M; SIRT3 $IC_{50}=48,7$ μ M) kullanılmıştır. Test edilen bileşikler için NAMPT ve SIRT1 enzimlerine karşı belirlenen etkileri Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11’de sunulmuştur.

Sanal tarama çıktısı bileşiklerin 50 μ M tarama konsantrasyonunda NAMPT ve SIRT1 enzimleri üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, **F1**, **F2**, **F3** ve **F5**’in sırasıyla %93, %69, %41 ve %54 oranlarıyla NAMPT enzimini inhibe ettiği, %112, %49, %53 ve %45 oranlarıyla SIRT1 aktivasyonu sağladığı tespit edilmiştir. 100 μ M tarama konsantrasyonunda ise **F1**, **F2**, **F3** ve **F5** sırasıyla %93, %68, %50 ve %61 oranları ile NAMPT inhibisyon aktivitesi; %66, %55, %61, %27 SIRT1 aktivasyonu göstermiştir. **F6** kodlu bileşik NAMPT inhibisyonu yerine her iki konsantrasyonda da aktivasyon sağlamış ve %36 ve %16 aktivasyon değerleri ile düşük oranda SIRT1 aktivasyonu göstermiştir. **F8** ise NAMPT enzimi üzerinde etki göstermezken, 50 μ M konsantrasyonda %41 oranında SIRT1 enzimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu bileşikler dışında **F7** ve **F9** bileşiklerinin bu konsantrasyonlarda satüre değerlere ulaşılması nedeniyle NAMPT ve SIRT1 enzim aktiviteleri belirlenememiştir. Ayrıca 50 μ M konsantrasyonda bileşiklerin SIRT2 ve SIRT3 enzimleri üzerindeki etkileri belirlenerek izoenzim selektiviteleri tespit edilmiştir. Bileşiklerin **F6** dışında (%56 inhibisyon) SIRT2 enzimi üzerinde bir etkisi bulunmazken, **F2** (%59) ve **F3** (%64) kodlu bileşiklerin SIRT3 enzimi üzerinde inhibisyon etki gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 4.10).

Sanal tarama çıktısı bileşikler içerisinde, yüksek derecede NAMPT inhibisyonu ve SIRT1 aktivasyonu sağlayan ve aynı zamanda SIRT1 selektif **F1** kodlu bileşik optimizasyon çalışmaları için öncü bileşik olarak seçilmiş; **F1** temel alınarak 12 yeni bileşik (**STF1-STF12**) tasarlanmıştır. Tasarlanan bileşiklerin NAMPT ve SIRT1 enzimleri üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, **STF1-STF8** kodlu bileşiklerin 100 μ M ve 50 μ M konsantrasyonda sırasıyla %54-96 ve %37-93 oranları arasında NAMPT inhibisyonu, %22-70 ve %32-49 arasında SIRT1 aktivasyonu sağlayarak dual etkiyi sürdürebildiği belirlenmiştir. Bu bileşikler arasından **STF2** ve **STF6**'nın 100 μ M konsantrasyonda sırasıyla %86 ve %66 oranında NAMPT inhibisyonu ve %58 ve %70 oranında SIRT1 aktivasyonu, 50 μ M konsantrasyonda sırasıyla %70 ve %46 oranında NAMPT inhibisyonu ve %39 ve %46 oranında SIRT1 aktivasyonu göstererek hibrit bir aktivite profiline sahip oldukları görülmüştür. **STF9** kodlu bileşik ise %34 ve %46 oranlarıyla SIRT1 aktivasyonu sağlamasına rağmen düşük seviyede NAMPT inhibisyonu göstermiştir. **STF10-STF12** kodlu bileşiklerde ise her iki enzim üzerindeki aktivitenin kaybolduğu veya düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

NAMPT inhibitörü ve SIRT1 aktivatörü olarak yüksek etkinlik gösteren **F1**, **F2**, **STF2** ve **STF6** kodlu bileşiklerin NAMPT IC_{50} ve SIRT1 $EC_{1,5}$ değerleri ise 0,001-500 μ M arasında değişen tarama konsantrasyonlarındaki NAMPT % inhibisyon ve SIRT1 % aktivasyon değerleri normalize edilerek elde edilen doz-yanıt eğrileri ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.12 ve 4.13).

Çizelge 4.11. Sanal tarama çıktısı bileşiklerin NAMPT ve SIRT1-SIRT3 enzimlerine karşı etkileri

Kod	Kimyasal Yapı	NAMPT		SIRT1		SIRT2	SIRT3
		% inhibisyon*		% aktivasyon*		% inhibisyon*	% inhibisyon*
		100 μ M	50 μ M	100 μ M	50 μ M	50 μ M	50 μ M
F1		92,65 $\pm$ 10,02	92,93 $\pm$ 6,13	66,42 $\pm$ 3,11	111,56 $\pm$ 3,48	e.y.	e.y.
F2		67,75 $\pm$ 1,61	69,27 $\pm$ 1,60	55,30 $\pm$ 4,15	49,30 $\pm$ 0,95	e.y.	59.03 $\pm$ 2.84
F3		49,79 $\pm$ 4,07	41,28 $\pm$ 3,52	60,96 $\pm$ 4,37	53,36 $\pm$ 5,65	e.y.	63.67 $\pm$ 0.33
F4		e.y.	e.y.	73,56 $\pm$ 4,11	66,21 $\pm$ 2,86	e.y.	13.80 $\pm$ 3.35
F5		61,17 $\pm$ 2,46	53,52 $\pm$ 7,41	27,34 $\pm$ 3,20	44,80 $\pm$ 1,37	e.y.	22.11 $\pm$ 8.90
F6		-456 $\pm$ 13,48 ^a	-286 $\pm$ 9,79 ^a	36,23 $\pm$ 7,65	16,06 $\pm$ 3,88	56.28 $\pm$ 6.12	e.y.
F7		Tespit edilemedi (satüre)					
F8		28,41 $\pm$ 2,63	e.y.	e.y.	-40,86 $\pm$ 8,60 ^b	e.y.	e.y.
F9		Tespit edilemedi (satüre)					
FK866		101,96 $\pm$ 1,96	99,21 $\pm$ 2,14	-	-	-	-
Res		-	-	97,53 $\pm$ 0,36	93,77 $\pm$ 5,43	-	-
EX-527		-	-	-99,28 $\pm$ 1,07 ^b	-95,71 $\pm$ 7,75 ^b	-	-

*Değerler "ortalama değer $\pm$ standart sapma" olarak verilmiştir (n=3); e.y.: etki yok (<%10 inhibisyon/aktivasyon); Res: Resveratrol; ^aenzim aktivitesinin aktivasyonu; ^benzim aktivitesinin inhibisyonu

Çizelge 4.12. STF1-STF9 kodlu bileşiklerin NAMPT ve SIRT1-SIRT3 enzimlerine karşı etkileri

A O NH O S O NH B O C=O C1=CC=CC=C1 </					
---	--	--	--	--	--

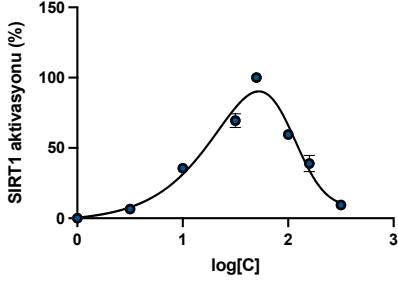
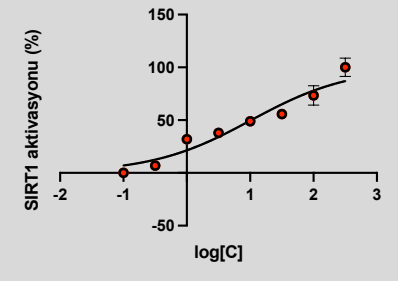
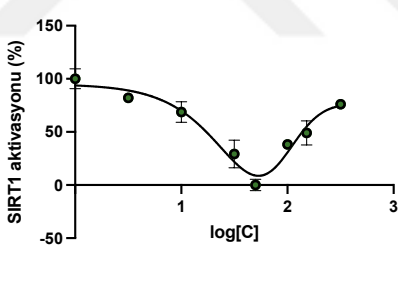
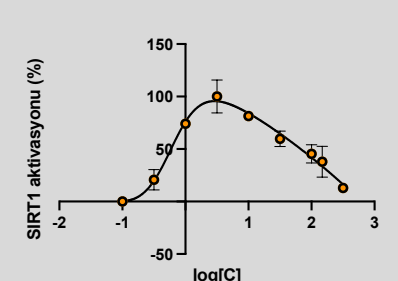
*Değerler "ortalama değer±standart sapma" olarak verilmiştir (n=3); e.y.: etki yok (<%10 inhibisyon/aktivasyon)

Çizelge 4.13. Bileşiklerin NAMPT IC₅₀ değerleri

Kod	[C] (μM)	% İnhibisyon*	IC ₅₀ (μM)	Doz-yanıt eğrileri (normalize)
F1	300	99,95±1,41	0,89	
	100	92,65±10,02		
	30	98,95±1,49		
	10	99,97±0,06		
	3	77,62±6,89		
	1	81,74±13,11		
	0,3	40,36±5,52		
	0,1	50,74±1,00		
	0,01	41,28±4,44		
	0,001	36,82±4,19		
F2	500	102,45±9,10	0,68	
	300	80,43±2,00		
	100	67,75±1,61		
	30	65,34±2,53		
	10	81,91±2,29		
	3	91,59±3,00		
	1	72,40±2,00		
	0,3	38,02±3,42		
	0,1	27,59±6,03		
STF2	100	86,43±7,25	11,24	
	50	84,39±5,85		
	30	72,71±9,60		
	10	50,68±7,48		
	3	18,84±3,56		
	1	16,64±5,66		
STF6	100	66,93±9,43	19,15	
	50	45,73±6,09		
	30	40,93±4,52		
	10	25,81±6,94		
	3	17,55±4,78		
	1	4,84±0,46		

*Değerler "ortalama değer±standart sapma" olarak verilmiştir (n=3)

Çizelge 4.14. Bileşiklerin SIRT1 EC_{1,5} değerleri

Kod	[C] (μM)	% Aktivasyon*	EC _{1,5} (μM)	Doz-yanıt eğrileri (normalize)
F1	300	10,55±1,65	16,45	
	150	43,43±6,45		
	100	66,42±3,11		
	50	111,56±3,48		
	30	77,41±5,44		
	10	39,72±1,45		
	3	7,30±2,22		
	1	2,33±0,94		
F2	300	94,56±7,79	10,39	
	150	70,93±8,12		
	100	55,30±4,15		
	50	49,30±0,95		
	30	37,04±3,95		
	10	35,63±2,07		
	3	12,09±0,74		
	1	5,91±2,37		
STF2	300	81,27±0,36	16,98	
	150	64,41±7,14		
	100	57,69±1,87		
	50	33,77±3,42		
	30	52,02±8,17		
	10	76,75±6,08		
	3	85,03±0,64		
	1	96,22±5,87		
STF6	300	45,38±1,23	0,59	
	150	59,89±8,47		
	100	64,22±5,01		
	30	72,52±4,22		
	10	85,13±2,60		
	3	95,85±9,14		
	1	80,83±1,17		
	0,3	49,93±5,60		
	0,1	37,91±0,93		

*Değerler "ortalama değer±standart sapma" olarak verilmiştir (n=3)

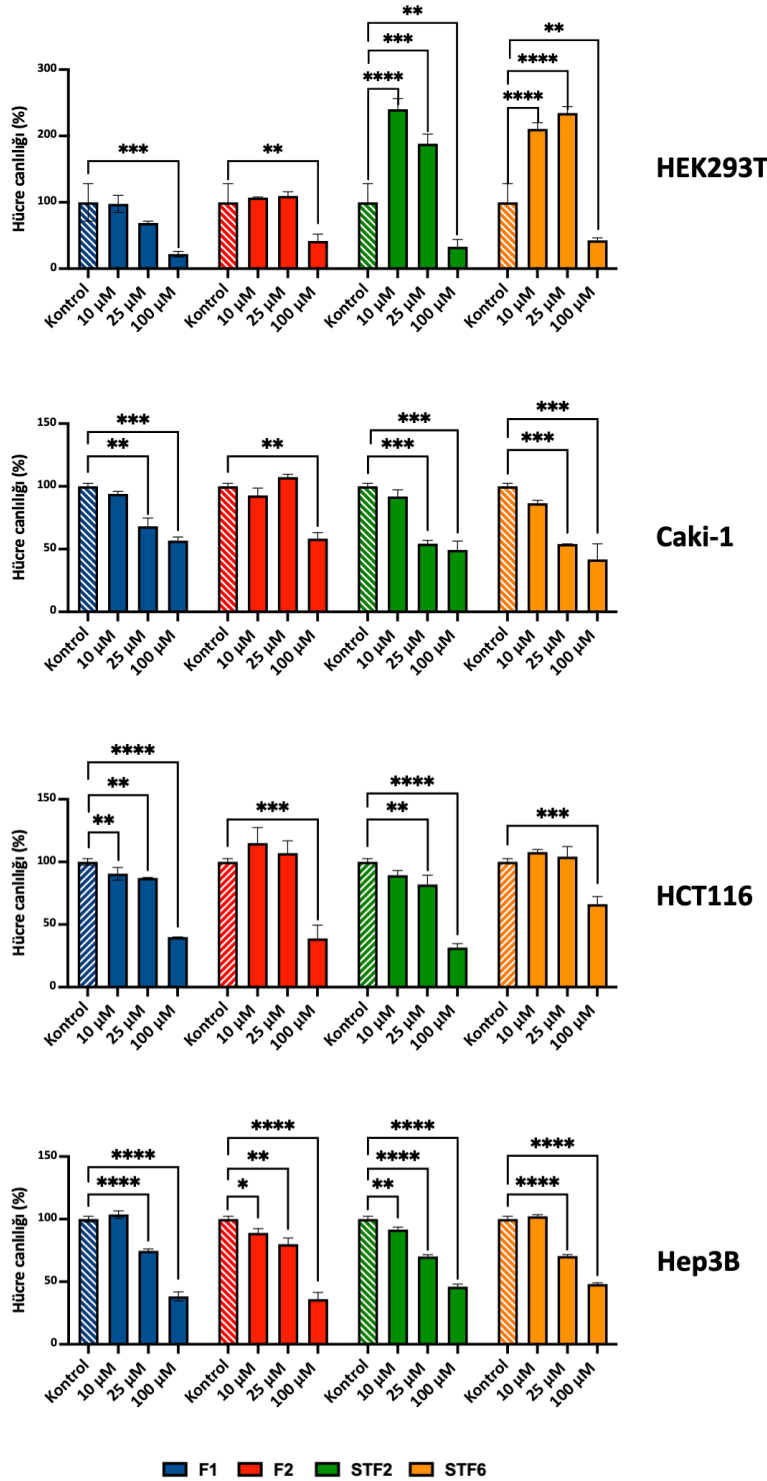
4.3.2. Antiproliferatif etki

NAMPT inhibitörü ve SIRT1 aktivatörü olarak ikili etki gösteren **F1**, **F2**, **STF2** ve **STF6** kodlu bileşiklerin, insan HEK293T embriyonik böbrek (kansere olmayan) hücrelerle karşılaştırmalı olarak insan Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri araştırılmıştır. Ön çalışma olarak, referans bileşikler (NAMPT inhibitörü FK866, SIRT1 aktivatörü resveratrol ve SIRT1 inhibitörü EX-527) için 24 saatlik süre sonunda insan Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B kanser hücrelerinde anlamlı antiproliferatif etki gösterebileceği konsantrasyonlar (FK866: 1 µM; resveratrol: 50 µM, EX-527: 50 µM) belirlenmiştir (Çizelge 4.14). **F1**, **F2**, **STF2** ve **STF6** kodlu bileşiklerin ise, 10, 25 ve 100 µM konsantrasyonlarda insan HEK293T embriyonik böbrek (kansere olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında 24 saat sonra meydana getirdikleri etkiler incelenmiş; elde edilen sonuçlar NAMPT ve SIRT1 enzim aktiviteleri ile ilişkilendirilmiştir (Çizelge 4.14, Şekil 4.21).

Çizelge 4.15. Bileşiklerin 24 saat sonunda test edilen hücreler üzerindeki etkileri

Kod	[C]	% Hücre canlılığı (24 saat)*			
		HEK293T	Caki-1	HCT116	Hep3B
Kontrol		-	99,92±2,08	100,05±2,79	99,97±3,44
FK866	1 µM	-	60,25±13,48	19,23±1,59	19,67±2,39
Res	50 µM	-	48,03±6,15	82,20±2,63	63,21±4,12
EX-527	50 µM	-	81,23±3,59	92,64±2,17	65,47±0,35
F1	Kontrol	100,00±28,37	100,00±2,43	100,00±2,63	100,00±2,50
	100 µM	21,88±4,19	56,71±2,90	40,02±0,11	38,24±3,67
	25 µM	68,97±2,76	68,21±6,57	87,206±0,30	74,64±1,62
	10 µM	97,55±12,97	93,99±2,05	90,56±5,05	103,66±2,93
F2	Kontrol	100,00±28,37	100,00±2,43	100,00±2,63	100,00±2,50
	100 µM	41,67±10,42	58,29±4,92	38,84±10,58	36,01±5,37
	25 µM	109,66±6,21	107,42±2,21	106,95±9,92	80,00±5,02
	10 µM	107,04±1,09	92,73±5,87	114,98±12,47	88,99±2,50
STF2	Kontrol	100,00±28,37	100,00±2,43	100,00±2,63	100,00±2,50
	100 µM	32,94±15,89	49,37±6,96	31,53±3,18	46,02±2,03
	25 µM	188,28±14,49	54,35±2,69	81,97±7,33	70,17±1,37
	10 µM	240,25±11,01	91,89±5,37	89,32±3,85	91,71±1,88
STF6	Kontrol	100,00±28,37	100,00±2,43	100,00±2,63	100,00±2,50
	100 µM	42,71±3,71	41,80±12,39	66,28±6,08	48,06±1,04
	25 µM	234,48±9,66	54,08±0,09	104,16±8,12	70,41±1,28
	10 µM	210,68±9,37	86,59±2,27	107,87±2,09	102,28±1,29

*Değerler "ortalama değer±standart sapma" olarak verilmiştir (n=3); Res: Resveratrol



Şekil 4.21. İnsan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında 24 saat bileşiklerle muamele sonucu belirlenen % hücre canlılığı (değerler ortalama±SS şeklinde verilmiştir). Her deney üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$ olarak sunulmuştur.

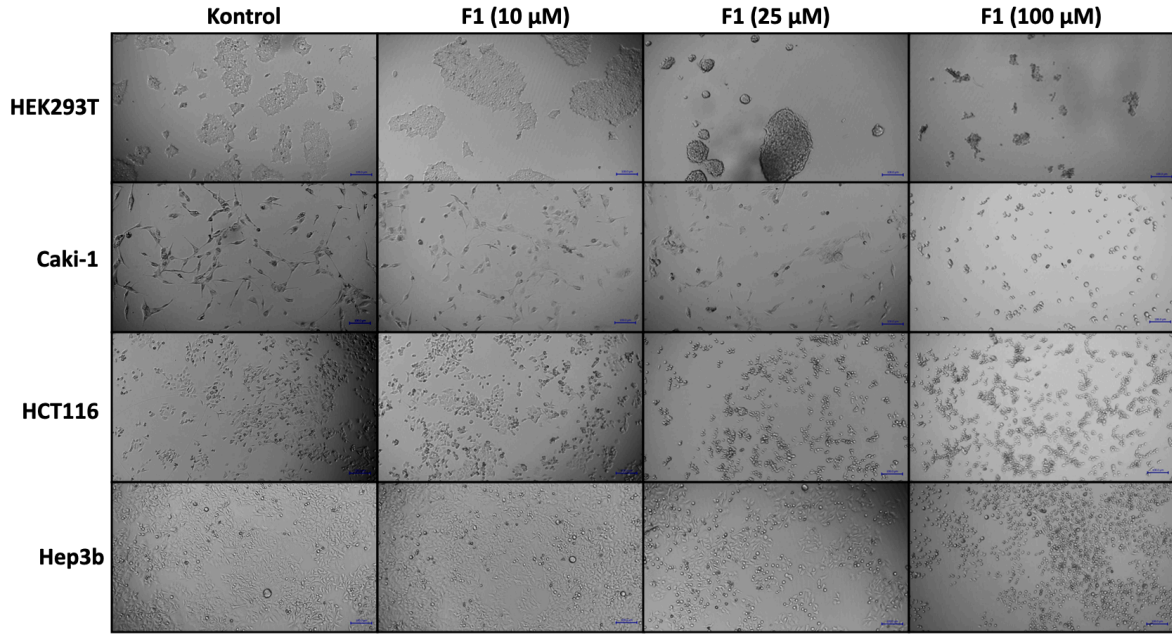
İnsan Caki-1 böbrek kanseri hücrelerinde bileşikler 10 μ M konsantrasyonda anlamlı bir değişim göstermezken, 25 μ M konsantrasyonda **F1**, **STF2** ve **STF6** kodlu bileşiklerin %54-68 aralığında hücre canlılığı ile istatistiksel olarak anlamlı sitotoksiste oluşturduğu belirlenmiştir. 100 μ M konsantrasyonda ise tüm bileşiklerin hücre canlılığını %42-58 seviyelerine düşürdüğü ve ilgili hücrede sitotoksik etkinin doza bağımlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.

İnsan HCT116 kolorektal kanseri hücrelerinde; düşük konsantrasyonda (10 μ M) yalnızca **F1**'in anlamlı sitotoksik etki oluştururken; 25 μ M konsantrasyonda ise bileşiklerden **F1** ve **STF2**'nin hücre canlılığını anlamlı bir şekilde %82-87 seviyelerine düşürdükleri görülmüştür. 100 μ M konsantrasyonda ise tüm bileşiklerin canlı hücre oranını %32-66 seviyelerine indirerek belirgin bir antiproliferatif etki sergiledikleri tespit edilmiştir.

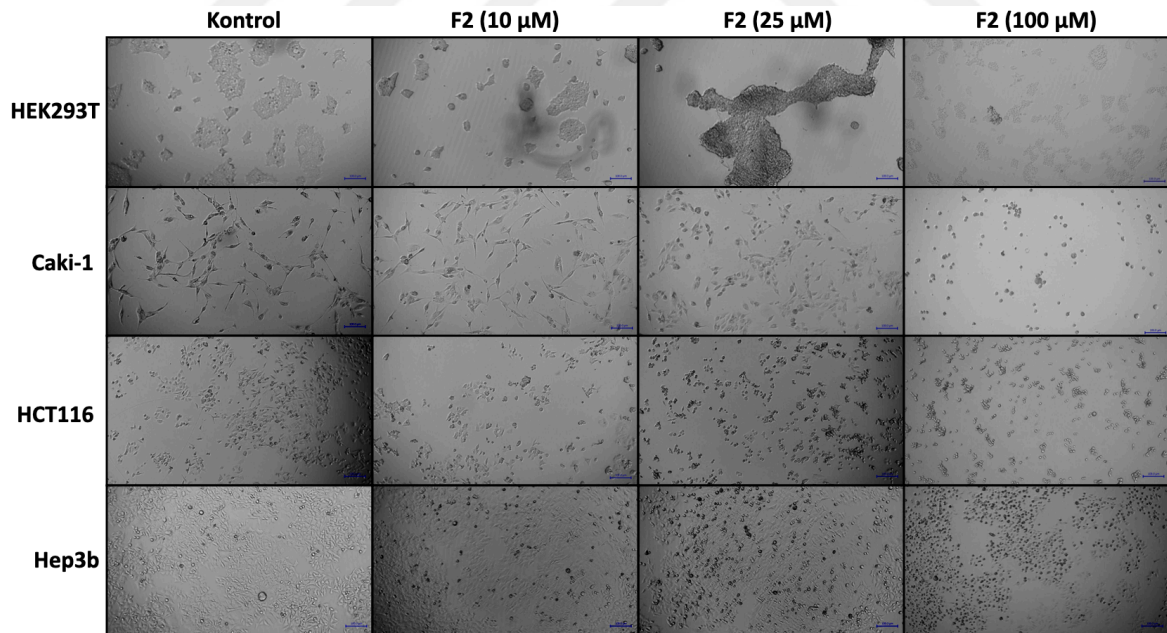
Bileşiklerin insan Hep3B karaciğer kanser hücrelerinde; 10 μ M konsantrasyonda yalnızca **F2** ve **STF2**'nin düşük düzeyde antiproliferatif etki gösterdiği görülmüştür. Bileşiklerin ilgili kanser hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri 25 μ M'da başlamış; 100 μ M'da hücre canlılığını seviyeleri %38-48 olarak gözlenmiştir.

Kanser olmayan insan HEK293T embriyonik böbrek hücre hattında 25 μ M konsantrasyonlarda **F2**, **STF2** ve **STF6**'nın; 10 μ M konsantrasyonlarda hiçbir bileşiğin sitotoksik etki göstermediği, ancak yüksek konsantrasyonda (100 μ M) tüm bileşiklerin hücre canlılığını %22-43 seviyelerine düşürerek belirgin sitotoksiste sergilediği görülmüştür.

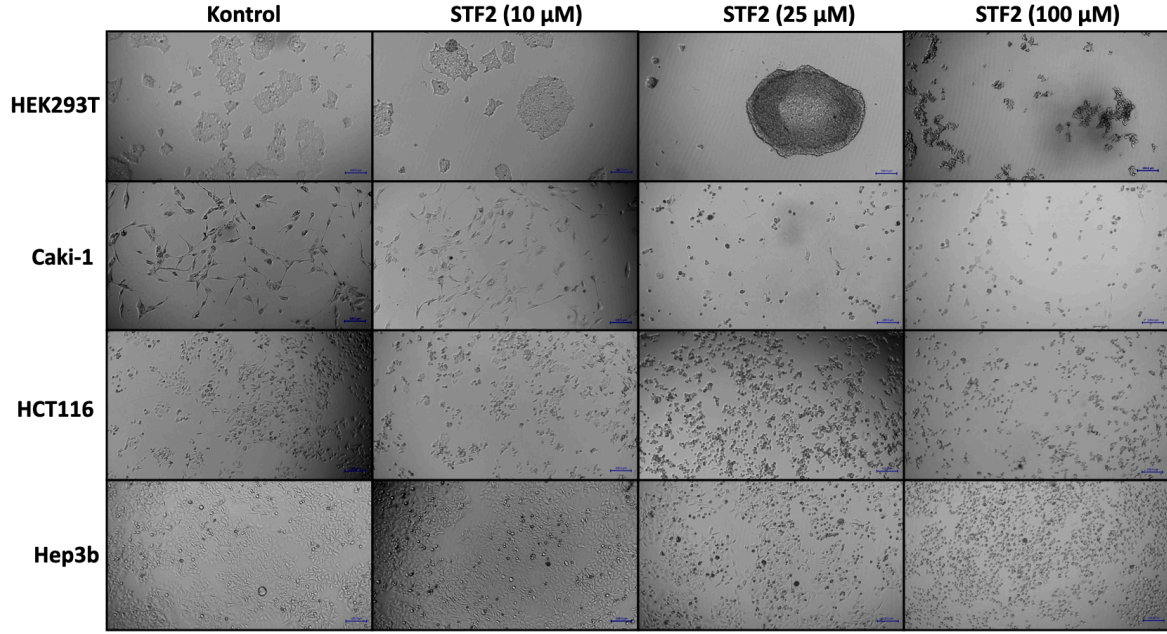
Bileşiklerin seçilen hücrelerdeki etkileri incelenirken, % hücre canlılık oranlarının yanında hücrelerin mikroskop görüntüleri de değerlendirilmiştir (Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24). Elde edilen görüntülere göre, 25 ve 100 μ M konsantrasyonlarda genellikle tüm kanser hücrelerinde hücre tabakasının bozulduğu görülmüş; buna bağlı olarak da ortamda hücre kalıntıları tespit edilmiştir. Diğer yandan, 10 ve 25 μ M konsantrasyonlarda insan HEK293T kanser olmayan hücrelerin genel morfolojisi büyük oranda korumuş, hücre sayısında belirgin bir azalma gözlenmemiştir.



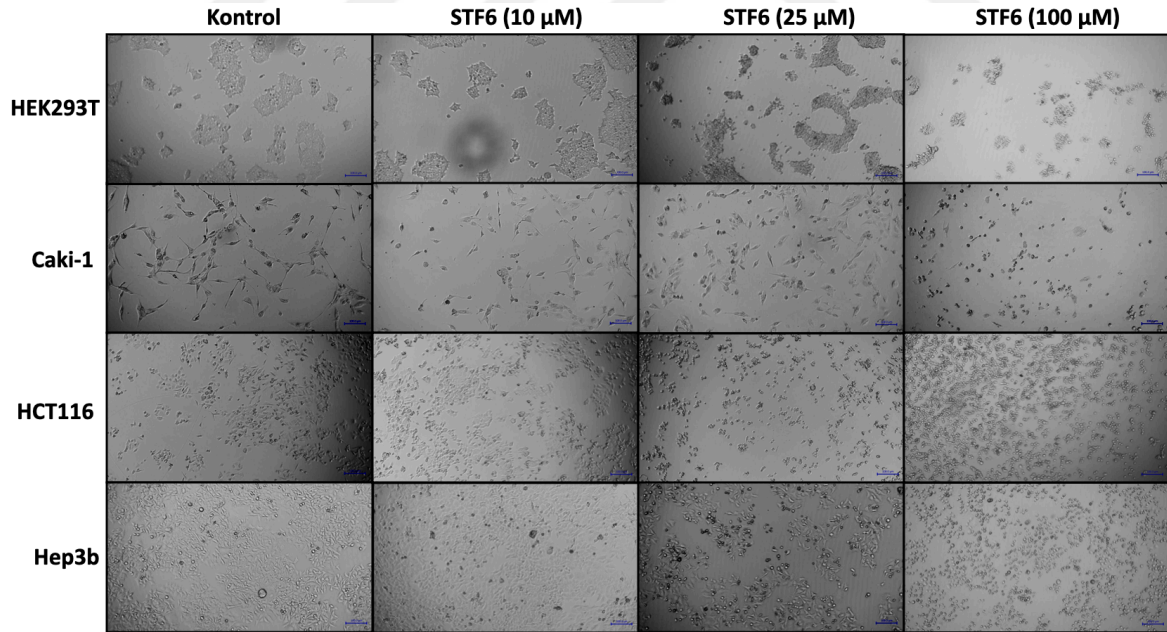
Şekil 4.22. F1 kodlu bileşiğin 24 saat sonunda insan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında oluşturduğu etkileri gösteren mikrograflar



Şekil 4.23. F2 kodlu bileşiğin 24 saat sonunda insan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında oluşturduğu etkileri gösteren mikrograflar



Şekil 4.24. STF2 kodlu bileşiğin 24 saat sonunda insan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında oluşturduğu etkileri gösteren mikrograflar



Şekil 4.25. STF6 kodlu bileşiğin 24 saat sonunda insan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında oluşturduğu etkileri gösteren mikrograflar

Bileşiklerin 10 μ M konsantrasyonda insan HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücreleri üzerinde 48 saat sonunda meydana getirdikleri etkiler de incelenmiş; 24 saatlik uygulama sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.16. Bileşiklerin 10 μ M konsantrasyonda 48 saat sonunda insan HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücreleri üzerindeki etkileri

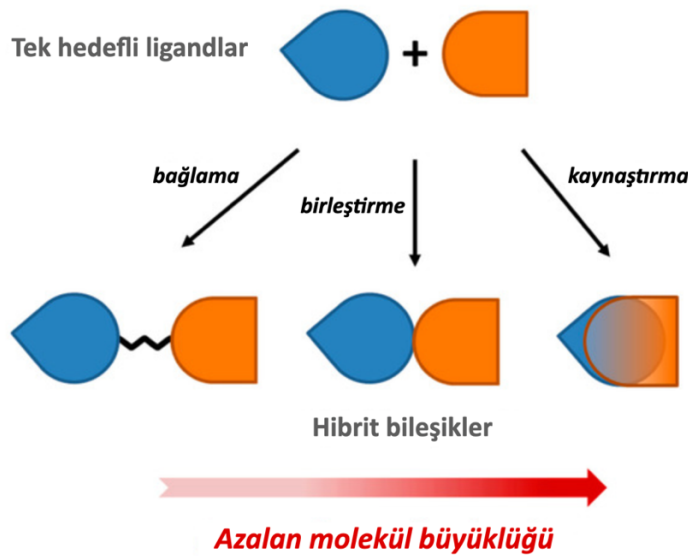
Hücre hattı	% Hücre canlılığı*				
	Kontrol	F1	F2	STF2	STF6
HCT116	100,00 $\pm$ 2,43	78,61 $\pm$ 1,10	68,64 $\pm$ 1,03	71,42 $\pm$ 3,90	93,04 $\pm$ 4,11
Hep3B	100,00 $\pm$ 2,25	80,46 $\pm$ 0,39	71,96 $\pm$ 0,88	77,16 $\pm$ 1,20	78,24 $\pm$ 1,21

*Değerler "ortalama değer $\pm$ standart sapma" olarak verilmiştir (n=3)



5. TARTIŞMA

Çok hedefli ilaç keşfi amacıyla çeşitli rasyonel ilaç tasarım yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak birden fazla biyolojik hedefle eşzamanlı etkileşim sağlayabilecek kimyasal yapıların tek bir bileşikte toplanması tasarım sürecini zorlaştırmaktadır. Çok hedefli bir bileşik; farklı hedefler üzerinde etkili olan bileşiklerin veya etkiden sorumlu farmakoforik grupların bağlayıcı aracılığıyla veya doğrudan birleştirilmesi veya farmakoforik grupların kaynaştırılmasıyla tasarlanabilmektedir (Şekil 5.1). Farmakoforik grupların kimyasal bir bağlayıcı ile birleştirilmesi, ayrı bağlanma bölgelerini aynı anda hedefleme olanağı sağlamakta; bu bağlayıcılar bağlanma bölgesindeki hareketlere uyum gösterecek şekilde esnek olarak veya farmakoforik grupları istenilen bağlanma yönünde sabitleyecek şekilde tasarlanabilmektedir [349]. Ancak farmakoforların birleştirilmesiyle elde edilen hibrit bileşikler genellikle yüksek molekül ağırlığı ve yüksek lipofiliteye sahip olduklarından oral biyoyararlanımları düşük olabilmektedir [370]. Bu nedenle çok hedefli bileşik tasarımında, ortak farmakoforik özellikler taşıyan iki farklı bileşiğe ait farmakofor grupların kaynaştırılması yaklaşımı öne çıkmaktadır; bu strateji biyoyararlanım sorunlarını azaltırken daha dengeli farmakokinetik özelliklere sahip bileşiklerin geliştirilmesine olanak tanıyabilmektedir [371].



Şekil 5.1. Çok hedefli ilaç tasarım stratejileri

Çok hedefli ilaç tasarımı klasik stratejilere ek olarak, ligand ve yapı temelli moleküler modelleme teknikleri de yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu tekniklerden biri olan ortak farmakofor modellemeye dayalı sanal tarama yöntemi, farklı hedef proteinler arasında paylaşılan farmakoforik özellikler temel alınarak oluşturulan tek bir model aracılığıyla, bu özellikleri taşıyan çok hedefli aday bileşiklerin keşfine olanak tanıyabilmektedir. Ancak bir bileşiğin farklı hedef proteinlerde farklı bağlanma konformasyonları sergilemesi, bu yöntemin etkinliğini kısıtlayan önemli bir faktör olarak öne çıkmaktadır [349, 372]. Bu sınırlamayı aşmaya yönelik olarak, her bir hedef protein için ayrı ayrı oluşturulan farmakofor modellerinin kullanıldığı sıralı veya paralel sanal tarama yaklaşımları geliştirilmiştir. Paralel sanal tarama yönteminde sanal bileşik kütüphanesi her bir hedefe özgü farmakofor modeliyle eşzamanlı olarak taranmakta, ardından tüm modellerle uyumlu bileşikler seçilmektedir. Sıralı sanal tarama yönteminde ise kütüphane öncelikle bir hedefin farmakofor modeline göre taranmakta, ilk elemeyen geçen bileşikler daha sonraki hedefin farmakofor modeline uygulanarak çok hedefli adayların adım adım filtrelmesi sağlanmaktadır [349].

Tez çalışmamız kapsamında, eşzamanlı olarak NAMPT inhibisyonu ve SIRT1 aktivasyonu sağlayan dual etkiye sahip bileşiklerin keşfedilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla ortak farmakofor temelli bir sanal tarama çalışması planlanmıştır. Bu doğrultuda her iki hedef için de ayrı ayrı hazırlanan veri setlerinden SIRT1 ve NAMPT farmakofor modelleri oluşturulmuştur. Devamında, bu iki model üst üste karşılaştırılmış ve ortak farmakoforik gruplar korunacak şekilde kaynaştırılıp tek bir ortak modele geçilmiştir. Bu modelin doğrulanması için NAMPT inhibitörü (50 bileşik), SIRT1 aktivatörü (90 bileşik) ve decoy bileşiklerden (2160 bileşik) oluşturulan bir veri seti (2300 bileşik) kullanılarak modelin performansı değerlendirilmiştir (Çizelge 5.1).

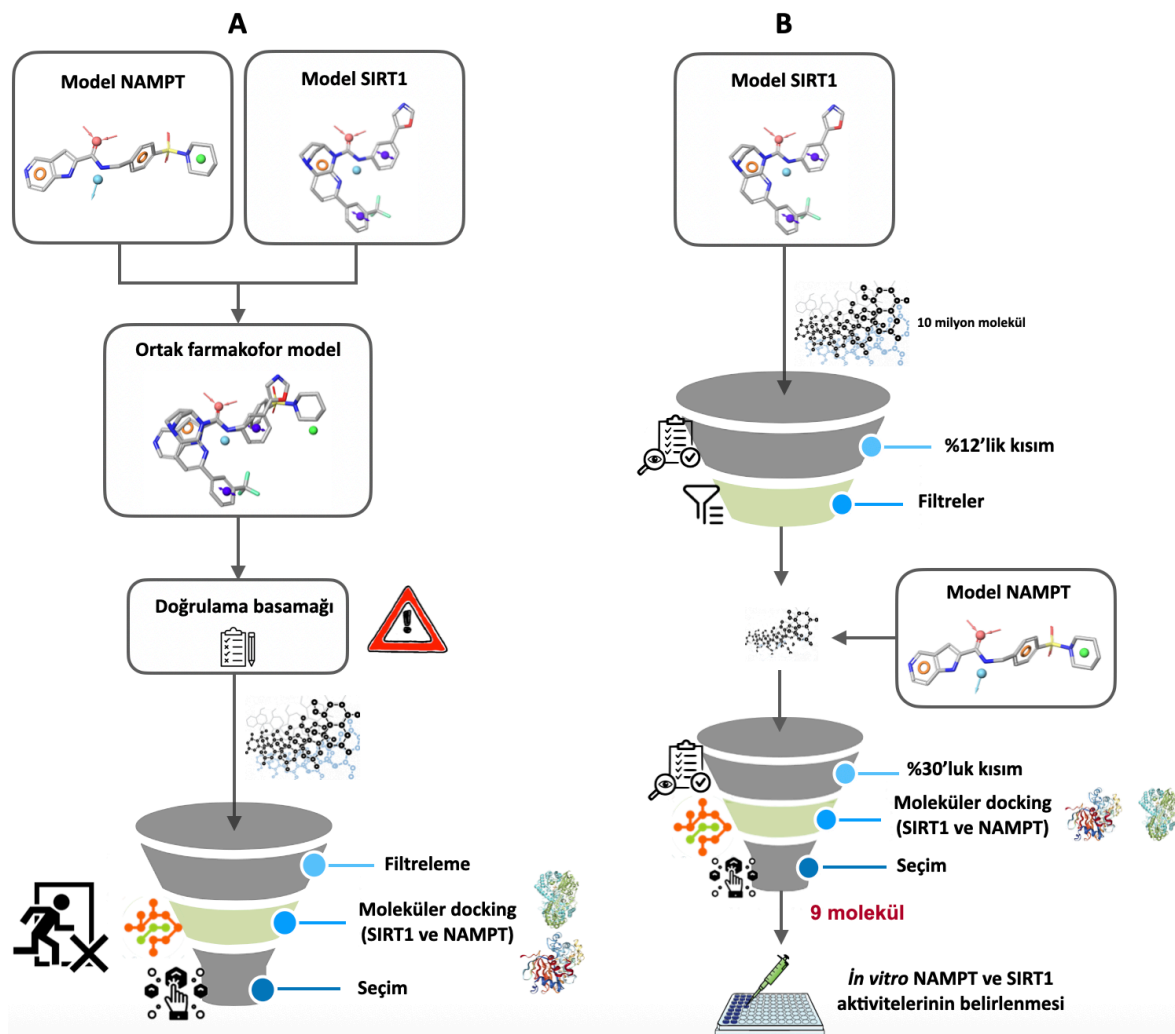
Çizelge 5.1. Doğrulama yapılamayan ortak farmakofor modelin parametreleri

Parametre	Ortak Model	Parametre tanımı
D	2300	D: Veri tabanındaki toplam bileşik sayısı
A	140	A: Veri tabanındaki toplam aktif bileşik sayısı
H	362	H: Veri tabanının taranması sonucu ulaşılan çıktı bileşik sayısı
TP	68	TP (true positive): Aktif çıktı bileşiklerin sayısı
FN	72	FN (false negative): Veri tabanındaki çıktı olarak verilmeyen aktif bileşik sayısı
FP	294	FP (false positive): Veri tabanındaki çıktı olarak görülen inaktif bileşik sayısı
TN	1866	TN (true negative): Veri tabanındaki çıktı olarak verilmeyen inaktif bileşik sayısı
% Aktif verim	18,78	% Aktif verim: $[(TP/H) \times 100]$
% Aktif oran	48,57	% Aktif oran: $[(TP/A) \times 100]$
Se	0,49	Se (sensitivity): $[TP/(TP+FN)]$
Sp	0,96	Sp (specifity): $[TN/(TN+FP)]$
Doğruluk	0,84	Doğruluk: $[(TP+TN)/D]$
Kesinlik	0,19	Kesinlik: $[TP/(TP+FP)]$
GH	0,23	GH (Goodness of hit score): $[(TP/4HA)(3A+H)(1-((H-TP)/(D-A)))]$
ROC	0,46	ROC: Receiver operating characteristic
BEDROC ($\alpha=20$)	0,27	BEDROC: Boltzmann-geliştirilmiş ROC ayrımı
BEDROC ($\alpha=160$)	0,49	
RIE	3,17	RIE: Robust initial enhancement
AUAC	0,67	AUAC: Kümelenmiş eğri altında kalan alan
EF (manuel)	3,09	EF (Enrichment factor): $[(TP/H)/(A/D)]$
EF (%1)	13	
EF (%2)	14	
EF (%5)	18	

Elde edilen NAMPT-SIRT1 ortak farmakofor modelinin, tarama sırasında aktif ve inaktif bileşikleri ayırma başarısının kabul edilebilir düzeyde olmamasının yanı sıra, modele ait diğer istatistiksel parametrelerin de yetersiz kaldığı görülmüştür. Model performansını iyileştirmek amacıyla farmakofor özelliklerinde değişiklik yapılması, modele sınırlayıcı hacimlerin (excluded volume; eV) eklenmesi ve taramalar sırasında özelliklerde bağ açısı sınırlandırması gibi yaklaşımlar uygulanmış olsa da uygun düzeyde sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle, alternatif bir yöntem olarak, ortak farmakofor model yaklaşımı yerine, tek başlarına iyi performans gösterdiği istatistiksel olarak da kanıtlanmış NAMPT ve SIRT1 farmakofor modellerinin ayrı ayrı kullanıldığı sıralı sanal tarama yaklaşımının uygulanmasına karar verilmiştir.

Bu amaçla, 10 milyon bileşikten oluşan ZINC “drug-like” kütüphanesi önce Model SIRT1’e karşı taranmış; uyumlu bileşikler genel filtreleme basamakları (model yorulma noktası, % aktif oran, Lipinski 5 ve Veber kuralları, kiralite, reaktivite vb.) ile süzölmüş ve ardından

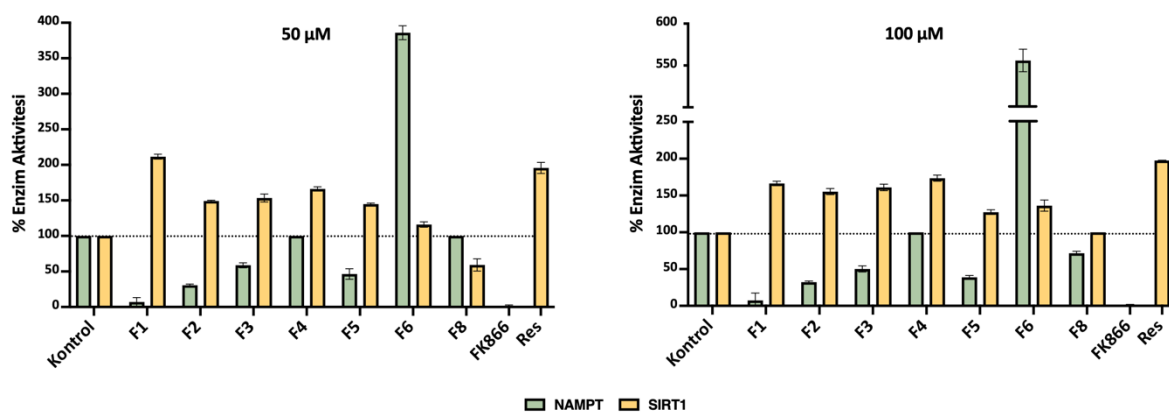
Model NAMPT ile taranmıştır. Bu aşamadan geçen bileşiklerin hem SIRT1 hem de NAMPT aktif bölgelerinde olası bağlantı modları ve aktif bölge amino asitleriyle etkileşimleri moleküler docking çalışmaları ile incelenmiştir. Bu basamaklardan sonunda, her iki hedefte istenen etkileşimleri sağlayan ve aynı zamanda uygun farmakoforik özellikleri taşıyan 28 bileşik belirlenmiş; en son adımda ise kimyasal çeşitliliği koruyacak şekilde 9 bileşiğe indirilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Uygulanan sanal tarama prosedürlerine ait iş akış şemaları. (A) Ortak farmakofor model kullanılarak yapılması planlanan sanal tarama prosedürü; (B) Sıralı tarama yöntemi ile yapılan sanal tarama prosedürü.

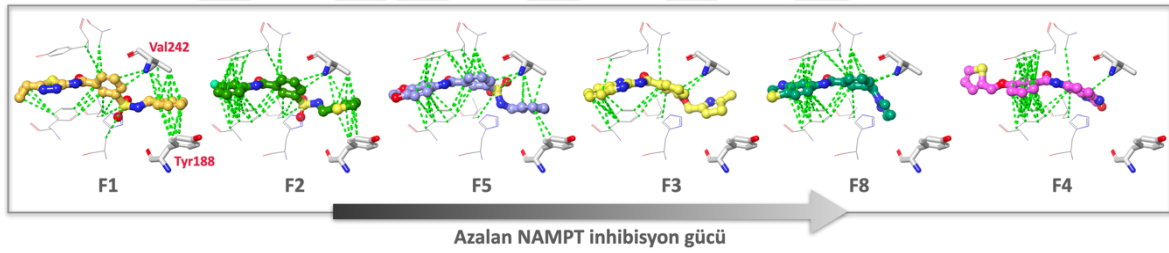
Sanal tarama çıktısı olarak belirlenen dokuz bileşik (**F1-F9**) satın alınarak, öncelikle *in vitro* NAMPT ve SIRT1 aktiviteleri 100 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarda fluorimetrik yöntemle taranmıştır (Şekil 5.3). Çalışma öncesi, deneyde kullanılan konsantrasyonlarda ve dalga

boylarında bileşiklerin enzimsiz ortamda yaptığı ışıma ölçülmüş, **F7** ve **F9**'un intrinsik floresans sergilediği görülmüştür. Bu nedenle, söz konusu bileşiklerin, kullanılacak fluorimetrik teste uygun olmadığına, bu nedenle kolorimetrik ölçüme dayalı enzim kitleri ile yeniden değerlendirilmesine karar verilmiştir. Fluoresans girişimi göstermeyen bileşiklerden **F2**, **F3** ve **F5**'in 50 μ M tarama konsantrasyonunda NAMPT enzim aktivitesini %41-69 arasında inhibe ettiği; SIRT1 enzimini ise %45-53 oranlarında aktive ettiği belirlenmiştir. Diğer yandan, **F1** bileşiği %93 NAMPT inhibisyonu ve %112 SIRT1 aktivasyonu sağlamıştır. 100 μ M konsantrasyonda; **F1**, **F2**, **F3** ve **F5** kodlu bileşiklerin NAMPT inhibitör aktiviteleri korunmuş; SIRT1 aktivasyon potansiyeli **F2** ve **F3** için değişiklik göstermezken, **F1** ve **F5** kodlu bileşiklerde yaklaşık %50 oranında bir azalma gözlenmiştir. Bunun yanında, her iki tarama konsantrasyonunda da **F4** ve **F8** kodlu bileşiklerin NAMPT enzime karşı etkisiz olduğu tespit edilmiştir. **F4**, SIRT1 enzim aktivitesini %66 (50 μ M) ve %74 (100 μ M) oranlarında artırmış; **F8** ise 50 μ M'da SIRT1 aktivitesini %40 oranında inhibe etmiş, ancak 100 μ M'da bu etkinin kaybolduğu görülmüştür. İlginç bir şekilde, elde edilen veriler **F6** bileşiğinin öngörülenden farklı olarak dual NAMPT/SIRT1 aktivatörü potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Bu durum, NAMPT inhibitör ve aktivatörlerinin yüksek yapısal benzerlikleri ile ilişkilendirilmiştir [373] (Şekil 5.3).



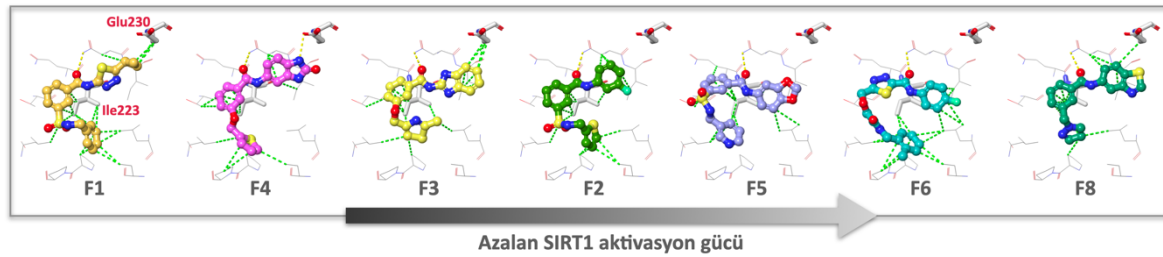
Şekil 5.3. Sanal tarama çıktısı bileşiklerin *in vitro* NAMPT ve SIRT1 enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri

Sanal tarama çıktısı bileşiklerin NAMPT enzim aktivitesi üzerine etkileri, moleküler docking bulguları ile değerlendirilmiştir. Buna göre, hidrofobik etkileşimin baskın olduğu NAMPT aktif bölgesinde, bileşiklerin kuyruk gruplarının (**F1**: fenil; **F2**: tiyofen; **F3**: 2-metiltiyazol; **F4**: tiyofen; **F5**: piridin; **F6**: 2-metilfenil; **F8**: pirazol) arka kanalda Tyr188 ve Val242 amino asitleri ile kurduğu hidrofobik etkileşimler ile NAMPT inhibitör potansiyeli arasında bir korelasyon gözlenmiştir. Ayrıca, NAMPT inhibitörlerinin baş bölgesindeki hacimli grupların nükleobaz cebine uyumu azalttığını gösteren çalışmalar [65, 67], **F1** ve **F2** kodlu bileşiklerin diğer bileşiklere kıyasla daha yüksek inhibitör etki sergilemesini destekler nitelikte bulunmuştur. Buna karşılık, **F4** bileşiği, NAMPT enzimine karşı etkisiz olup, aktif bölgede diğer bileşiklere göre ters bir bağlanma konformasyonu benimsemiş; nükleobaz cebinde konumlanması beklenen benzimidazolon halkası, arka kanala yönelmiştir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. İnsan NAMPT aktif bölgesinde (PDB: 4M6P) bileşiklerin oluşturduğu hidrofobik etkileşimler

Bileşiklerin SIRT1 enzimi üzerindeki etkinliklerini moleküler düzeyde değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen docking çalışmaları, bileşiklerin çoğunluğunun hidrofobik karaktere sahip aktif bölgeye aromatik halkaları aracılığıyla düzlemsel konformasyonlarla yerleştiğini göstermiştir. Enzim aktivasyonu açısından kritik öneme sahip olduğu belirlenen Ile223 ve Glu230 amino asitleri [303] ile kurulan etkileşimlerin, bileşiklerin etkinlik düzeyleriyle doğrudan ilişkili olduğu görülmüştür. Buna karşılık, göreceli olarak daha düşük seviyede SIRT1 aktivasyonu gösteren **F5** ve **F6** bileşiklerinde Glu230 ile herhangi bir etkileşim gözlenmemiştir (Şekil 5.5).



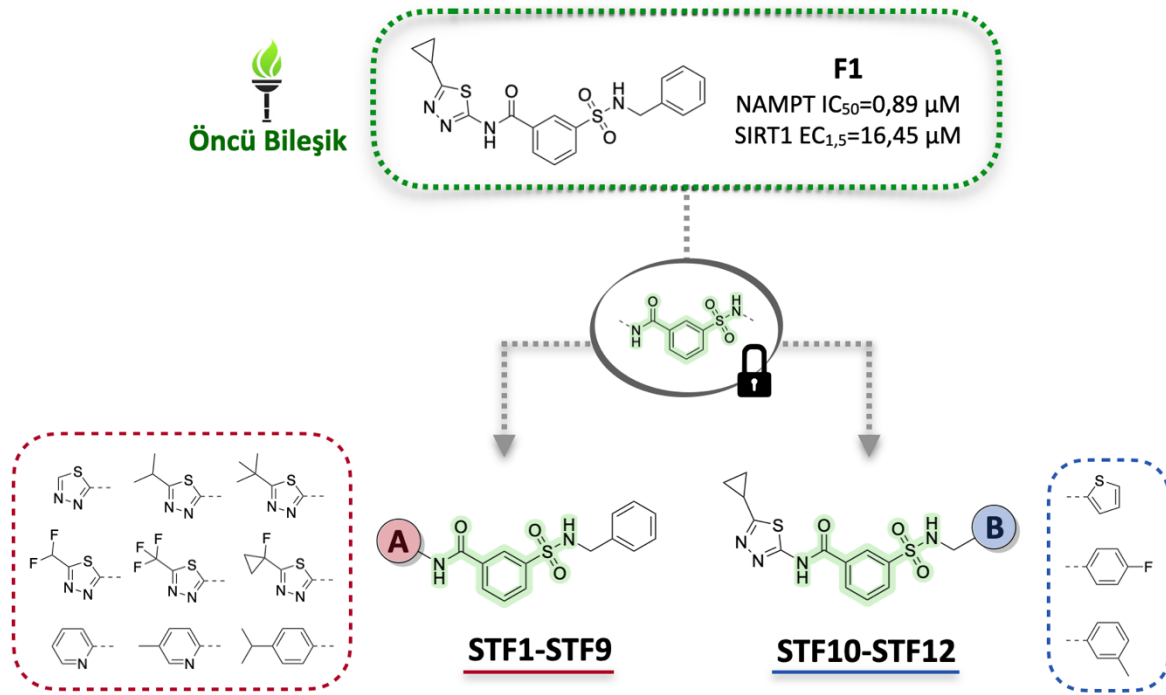
Şekil 5.5. İnsan SIRT1 aktif bölgesinde (PDB: 4ZZJ) bileşiklerin oluşturduğu hidrojen bağları (sarı) ve hidrofobik etkileşimler (yeşil)

Hedeflenen eşzamanlı etkiler açısından, bileşiklerin merkezinde yer alan 3-(N-metilsülfamoil)benzamid (**F1**, **F2** ve **F5**) ve 3-metoksibenzamid (**F3**) gruplarının her iki hedef için ortak bir uyum sergilediği gözlenmiştir. Bu gruplar, dar bir tünel şeklindeki NAMPT aktif bölgesine yerleşerek gerekli etkileşimleri sağlayabilmekte; aynı zamanda SIRT1 aktivasyonu için gerekli düzlemsel konformasyonu koruyarak kritik etkileşimlere katılmaktadır.

SIRT1 aktivatör etki gösteren bileşiklerin izoform seçiciliğini değerlendirmek amacıyla, bileşiklerin SIRT1 üzerindeki etkilerinin yanı sıra SIRT2 ve SIRT3 izoformlarına karşı aktiviteleri de incelenmiştir. Sonuçlar, test edilen bileşiklerden yalnızca **F6**, SIRT2 enzim aktivitesini %56 oranında inhibe ettiğini, diğer bileşiklerde anlamlı bir etkinin gözlenmediğini göstermiştir. SIRT3 izoformu için ise; **F1**, **F6** ve **F8** dışında kalan bileşiklerin %14-64 arasında değişen oranlarda inhibitör etki saptanmıştır. Bu bulgular, **F1** bileşiğinin SIRT1 üzerindeki aktivatör etkisinin izoform-selektif olduğunu ortaya koymuş ve ileri optimizasyon çalışmaları için öncü bileşik olarak belirlenmesini sağlamıştır.

Öncü bileşik **F1**'den yola çıkılarak, daha etkili yeni dual NAMPT inhibitörü ve SIRT1 aktivatörü türevlerin elde edilmesi amacıyla 3-[N-(arilmetil)sülfamoil]-N-(aril)benzamid iskeleti taşıyan on iki bileşik (**STF1-STF12**) tasarlanmıştır (Şekil 5.6). Tasarım aşamasında, her iki hedef için de uygun bir farmakofor çekirdeği olduğu düşünülen 3-(N-metilsülfamoil)benzamid motifi korunmuş; A ve B bölgesinde moleküler docking çalışmaları sonucu aktif bölgelerde hedeflenen etkileşimleri oluşturma potansiyeli taşıdığı tespit edilen gruplarla değiştirilmiştir. A bölgesinde; öncü bileşiğin NAMPT-Tyr18' ve Phe193 ile π - π

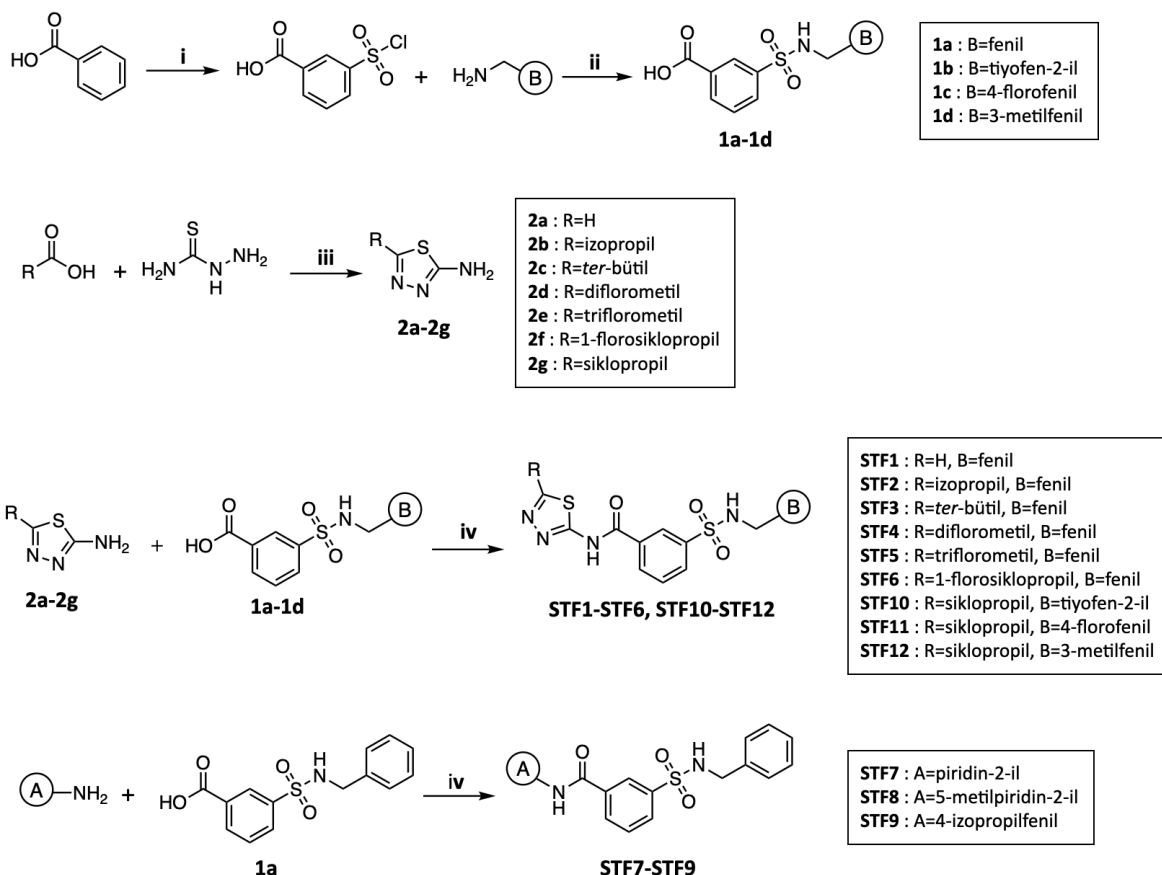
etkileşimleri kurabilen 1,3,4-tiyadiazol halkasının beşinci konumunda yer alan siklopropan halkası üzerinde biyoizosterik değişiklikler yapılmış veya tiyadiazol halkası piridin, 3-metilpiridin ve 4-izopropilfenil halkaları ile değiştirilerek **STF1-STF9** kodlu bileşiklere ulaşılmıştır. B bölgesinde ise; **F1**'in fenil halkası süstitüe edilmiş veya **F2** kodlu bileşiğin kuyruk kısmından esinlenerek tiyofen ile değiştirilmiş ve böylece **STF10-STF12** kodlu bileşikler tasarlanmıştır.



Şekil 5.6. Öncü bileşik F1'den hareketle STF1-STF12 kodlu bileşiklerin tasarımı

Tez çalışmamız kapsamında tasarlanan **STF1-STF12** kodlu bileşikler, Şekil 5.7'de sunulan sentez yolları izlenerek çok basamaklı yöntemlerle elde edilmiştir. Bileşiklerin sentezi için ilk olarak benzoik asidin klorosülfonik asit ile reaksiyonu sonucunda 3-(klorosülfonil)benzoik asit elde edilmiştir. Ardından uygun amin türevlerinin, 3-(klorosülfonil)benzoik asit ile bazik ortamda yer değiştirme reaksiyonu sonucunda 3-[N-(arilmetil)sülfamoil]benzoik asit türevleri (**1a-1d**) sentezlenmiştir. Daha sonra uygun karboksilik asit türevlerinin, tiyosemikarbazit ile POCl₃ varlığında halka kapama reaksiyonuna sokulmasıyla 2-amino-1,3,4-tiyadiazol türevleri (**2a-2g**) elde edilmiştir. Son aşamada ise sentezlenen 3-[N-(arilmetil)sülfamoil]benzoik asit türevleri (**1a-1d**) ile uygun amin türevlerinin (**2a-2g**, 2-aminopiridin, 2-amino-5-metilpiridin, 4-izopropilanilin) HATU,

HOBt ve DIPEA varlığında reaksiyona girmesi sonucunda **STF1-STF12** kodlu bileşikler sentezlenmiştir.



Şekil 5.7. İzlenen sentez yöntemi: (i) Klorosülfonik asit, 80 °C (ii) TEA, diklorometan, oda sıcaklığı; (iii) (1) POCl₃, 80 °C, 30 dakika-1 saat, (2) H₂O, reflaks, 2 saat; (iv) HATU, HOBt, DIPEA, tetrahidrofuran, oda sıcaklığı, 24-48 saat.

Sentez çalışması tamamlanan bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında ve tanımlanmasında ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS spektroskopik yöntemlerinden yararlanılmıştır.

Sonuç bileşiklere ait ¹H-NMR spektrumları incelendiğinde (Şekil 5.8); tüm bileşiklerde ortak olan sülfonamit komşusu metilen protonlarına ait sinyaller 4,01-4,25 ppm aralığında 2H değerinde dublet (*J*=6,2-6,4 Hz) olarak görülmüştür. Sülfonamit grubunda yer alan 1H değerindeki protona ait sinyaller, merkez 1,3-disübstitüe fenil halkasının proton sinyalleri ile 8,24-8,37 ppm aralığında multiyet veya bazı türevlerde (**STF9** ve **STF10**) 8,30-8,43

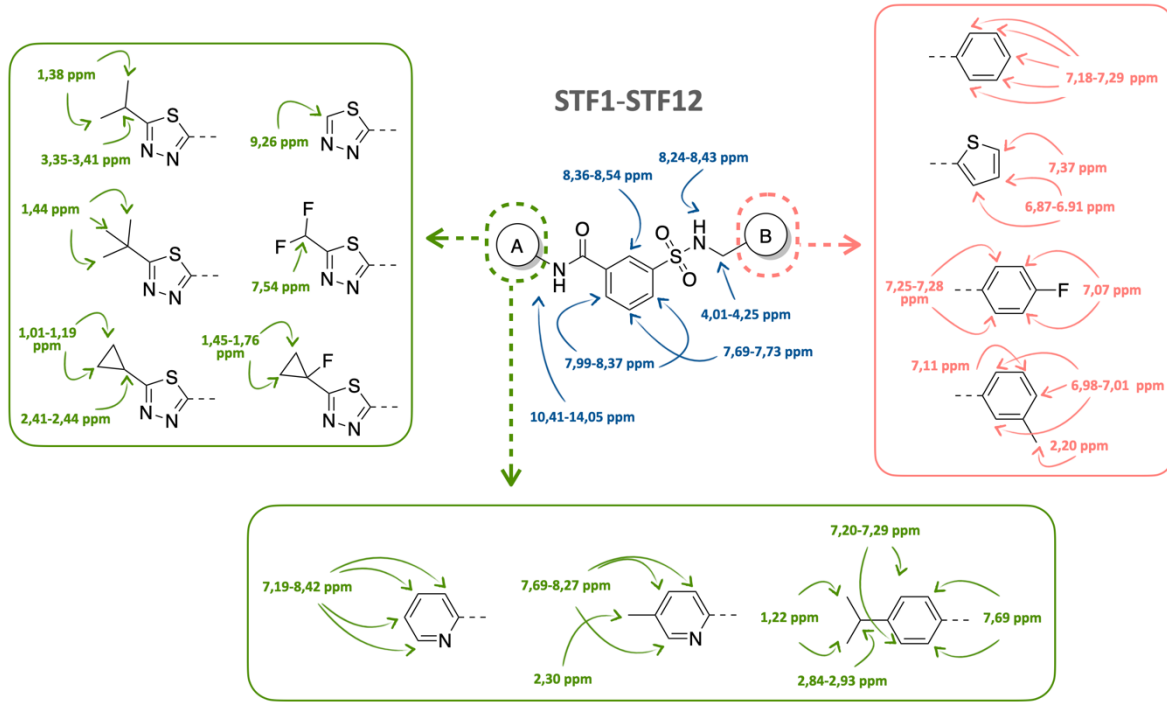
aralığında triplet ($J=6,2-6,3$ Hz) şeklinde gözlenmiştir. Amit grubunda yer alan 1H değerindeki protona ait sinyaller 10,41-14,05 ppm aralığında yayvan singlet olarak gözlenmiştir. Merkez fenil halkasının ikinci konumunda yer alan 1H değerindeki proton sinyalleri; 8,36-8,54 ppm arasında singlet (**STF1-SFT4**, **STF10-STF12**) veya triplet ($J=1,8-1,9$ Hz) (**STF5**, **STF6**, **STF8** ve **STF9**) olarak kaydedilmiştir. **STF7** kodlu bileşikte ise bu protona ait sinyal, piridin halkasındaki protonla birlikte 8,40-8,42 ppm aralığında multiplet şeklinde gözlenmiştir. Merkez fenil halkasının beşinci konumunda yer alan 1H değerindeki protona ait sinyaller 7,72-7,79 ppm aralığında triplet ($J=7,8-7,9$ Hz) olarak belirlenmiş olup; **STF8**'de bu sinyaller 7,69-7,73 ppm aralığında yer alan multiplet sinyallerin içerisinde gözlenmiştir. Halkanın dördüncü veya altıncı konumda yer alan protonların sinyalleri 7,99-8,05 ppm aralığında dublet ($J=7,7-8,4$ Hz) (**STF1-STF4**, **STF7-STF9**, **STF11** ve **STF12**) veya dubletin tripleti ($J=7,9-8,1$ Hz ve 1,2-1,4 Hz) (**STF5**, **STF6** ve **STF10**) olarak tespit edilmiştir. Diğer konumdaki protona ait sinyaller ise 8,24-8,37 ppm aralığında yer alan multiplet sinyalleri içerisinde veya 8,20 ppm'de dublet ($J=7,9$ Hz) (**STF9**) ve 8,32 ppm'de dubletin tripleti ($J=7,9$ Hz ve 1,4 Hz) (**STF10**) olarak kaydedilmiştir.

A halkası olarak 1,3,4-tiyadiyazol halkası taşıyan bileşiklerde; **STF2**'nin izopropil grubuna ait 6H değerindeki eşdeğer protonların sinyalleri 1,38 ppm'de dublet olarak ($J=6,9$ Hz) gözlenmiş; bu protonlara komşu olan 1H değerindeki protona ait sinyaller ise 3,35-3,41 ppm aralığında multiplet şeklinde tespit edilmiştir. **STF3** bileşiğinde *ter*-bütil grubunun 9H değerindeki eşdeğer protonlara ait sinyaller 1,44 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. Diflorometil taşıyan **STF4** kodlu bileşikte yer alan 1H değerindeki protona ait sinyaller, geminal konumunda bulunan iki adet flor atomu ile etkileşerek ($^1J_{HF}=53,5$ Hz) triplet şeklinde 7,54 ppm'de tespit edilmiştir. **STF10-STF12** kodlu bileşiklerde yer alan siklopropan halkasında ikinci ve üçüncü konumunda düzlemin aynı tarafında yer alan 2H değerindeki eşdeğer protonlara ait sinyaller 1,01-1,05 ppm aralığında multiplet olarak, düzlemin diğer tarafındaki eşdeğer protonlara ait 2H değerindeki sinyaller ise 1,15-1,19 ppm aralığında multiplet olarak tespit edilmiştir. Siklopropan halkasının birinci konumunda hidrojen atomu yerine flor atomu taşıyan **STF6** kodlu bileşikte ise ikinci ve üçüncü konumunda yer alan protonların sinyalleri 1,45-1,50 ppm ve 1,69-1,76 ppm aralıklarında yer almıştır. Siklopropan halkasının birinci konumunda hidrojen taşıyan türevlerde (**STF10-STF12**), bu

protonlara ait sinyaller 2,41-2,47 ppm aralığında multipler olarak gözlenirken; bu konumda flor atomu **STF6**'da ise sinyal gözlenmemiştir. A halkası olarak 1,3,4-tiyadiyazol halkası yerine 5-metilpiridin taşıyan **STF8** kodlu bileşikte, metil grubuna ait 3H değerindeki protonlara ait sinyaller 2,30 ppm'de singlet olarak; **STF9** bileşiğinde 4-izopropilfenil halkasına bağlı olan izopropil yan zincirine ait 6H değerindeki eşdeğer proton sinyalleri 1,22 ppm'de dublet ($J=6,9$ Hz) olarak ve bu protonlara komşu olan 1H değerindeki proton sinyalleri 2,84-2,93 ppm aralığında multipler olarak gözlenmiştir. **STF1** kodlu bileşiğin 1,3,4-tiyadiyazol halkasının beşinci konumunda yer alan protona ait sinyaller singlet olarak 9,26 ppm'de gözlenmiştir.

A halkası olarak piridin (**STF7**), 5-metilpiridin (**STF8**) ve 4-izopropilfenil (**STF9**) taşıyan türevlerde ise aromatik bölgede bu halkalara ait sinyaller kaydedilmiştir. **STF7** bileşiğinde piridin halkasına ait protonların sinyalleri bileşikte yer alan diğer aromatik protonlarla birlikte 7,19-8,42 ppm aralığında; **STF8** bileşiğinde ise piridin halkasına ait protonlar, diğer aromatik halka protonları ile 7,69-8,27 ppm aralığında gözlenmiştir. **STF9** bileşiğinde yer alan 4-izopropilfenil halkasına ait proton sinyalleri 7,20-7,29 ppm aralığında multipler ve 7,69 ppm'de dublet ($J=8,6$ Hz) olarak gözlenmiştir.

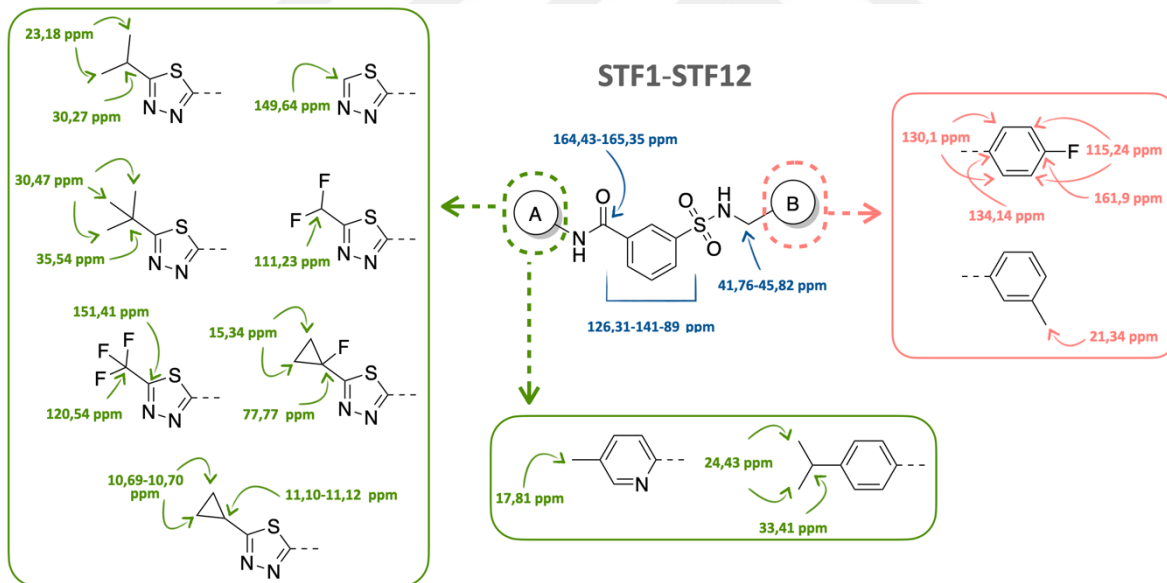
B halkası olarak fenil taşıyan türevlerde (**STF1-STF9**) bu halkaya ait 5H değerindeki proton sinyalleri 7,18-7,29 ppm aralığında multipler olarak; fenil halkası yerine tiyofen halkası taşıyan **STF10** bileşiğine ait proton sinyalleri 6,87-6,91 ppm aralığında 2H değerinde ve 7,37 ppm'de 1H değerinde dubletin dubleti ($J=5,0$ Hz ve 1,4 Hz); 4-florofenil halkası taşıyan **STF11** bileşiğinde eşdeğer 2H değerindeki proton sinyalleri 7,07 ppm'de triplet ($J=8,9$ Hz) olarak; 2H değerindeki diğer eşdeğer proton sinyalleri ise 7,25-7,28 ppm aralığında multipler olarak tespit edilmiştir. **STF12** bileşiğinde yer alan 3-metilfenil grubuna ait 3H değerindeki proton sinyalleri 2,20 ppm'de singlet olarak bulunurken; fenil halkasında yer alan protonlara ait sinyaller 6,98-7,01 ppm aralığında 3H değerinde multipler ve 7,11 ppm'de 1H değerinde triplet ($J=7,7$ Hz) şeklinde kaydedilmiştir.



Şekil 5.8. Hedef bileşiklerin ^1H -NMR spektrumlarında gözlenen kimyasal kayma değerleri

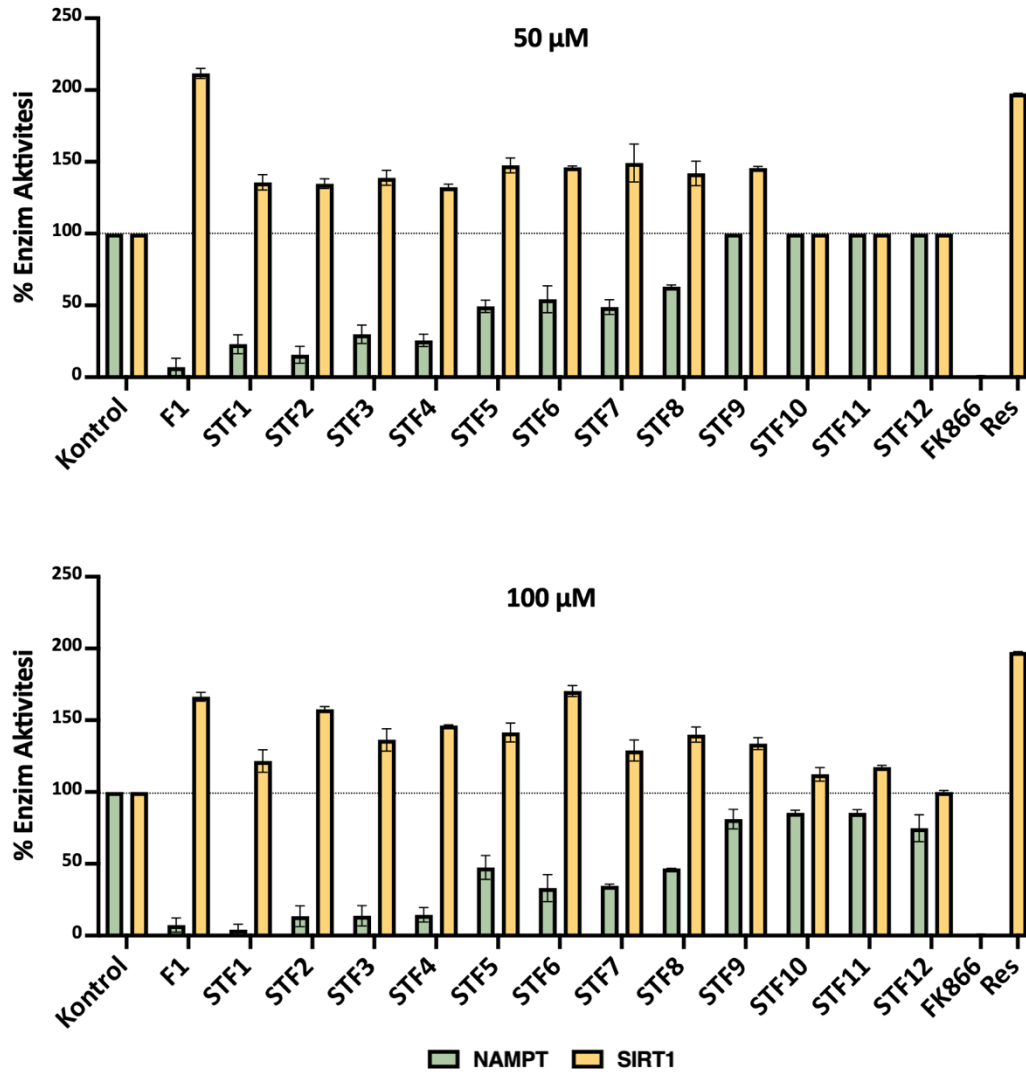
Sonuç bileşiklere ait ^{13}C -NMR spektrumları incelendiğinde (Şekil 5.9); tüm bileşiklerde yer alan metilen köprüsü karbonuna ait sinyaller alifatik sahada 41,76-45,82 ppm aralığında gözlenmiştir. A halkası olarak alkil veya sikloalkil grupları ile sübstitüe edilmiş 1,3,4-tiyadiyazol halkası taşıyan türevlerde (**STF2-STF6**, **STF10-STF12**), bu sübstitüentlere ait karbon sinyalleri alifatik sahada tespit edilmiştir. İzopropil (**STF2**) ve *ter*-bütil (**STF3**) grubu taşıyan bileşiklerde 23,18-35,54 ppm arasında sinyaller gözlenirken; diflorometil (**STF4**) ve triflorometil (**STF5**) taşıyan türevlerde flor atomlarının bağlı olduğu karbona ait sinyallerin sırasıyla 111,23 ppm'de triplete ($^1J_{\text{CF}}=235,7$ Hz) ve 120,54 ppm'de kuartete ($^1J_{\text{CF}}=270,5$ Hz) yarıldığı gözlenmiştir. **STF5** kodlu türevde flor atomlarına iki bağ uzaklıktaki 1,3,4-tiyadiyazol halkasına ait karbonun sinyalleri 151,41 ppm'de kuartet olarak ($^2J_{\text{CF}}=37,5$ Hz) tespit edilmiştir. **STF10-STF12** kodlu bileşiklerde siklopropan halkasına ait karbon sinyallerinin 10,69-10,70 ppm ve 11,10-11,12 ppm aralığında bulunmuştur. **STF12** kodlu bileşikte 3-metilfenil halkasında yer alan metil grubuna ait karbon sinyali 21,34 ppm'de alifatik sahada gözlenmiştir. Siklopropan halkasının birinci konumunda flor atomu taşıyan **STF6** bileşiğinde flor atomuna iki bağ uzaklıktaki karbona komşu eşdeğer karbonlarına ait sinyaller 15,34 ppm'de dublet ($^2J_{\text{CF}}=11,9$ Hz) olarak; flor atomunun bağlı olduğu karbon sinyalleri ise 77,77 ppm'de dublet ($^1J_{\text{CF}}=210,2$ Hz) olarak gözlenmiştir.

A halkası olarak 5-metilpiridin (**STF8**) ve 4-izopropilfenil (**STF9**) taşıyan türevlerde alifatik sahada karbon sinyalleri kaydedilmiştir. **STF8**'de piridin halkasına bağlı metil grubuna ait karbon sinyali 17,81 ppm'de gözlenirken; **STF9**'da fenil halkasına bağlı izopropil grubuna ait karbon sinyalleri 24,43 ppm ve 33,41 ppm'de bulunmuştur. Tüm bu sinyallerin dışında kalan aromatik halkalara ait karbon atomu sinyallerinin 115,28-161,93 ppm aralığında olduğu görülmüştür. Aromatik sahada **STF11** bileşiğinde farklı olarak fenil halkasına bağlı olan flor atomuna bağlı karbon sinyalleri 161,79 ppm'de dublet ($^1J_{CF}=241,2$ Hz), flor atomunun bağlı olduğu karbona komşu olan eşdeğer karbonlara ait sinyaller 115,24 ppm'de ($^2J_{CF}=21,0$ Hz) ve flor atomuna üç bağ ve dört bağ uzaklıkta olan karbon sinyalleri ise sırasıyla 130,10 ppm'de dublet ($^3J_{CF}=8,2$ Hz) ve 134,14 ppm'de dublet ($^4J_{CF}=3,7$ Hz) olarak gözlenmiştir. Tüm bileşiklerde yer alan amit karbonil grubuna ait karbon sinyalleri **STF4**, **STF5** ve **STF7-STF9** kodlu türevlerde 164,43-165,35 ppm aralığında tespit edilmiş; karbonil grubu içermelerine rağmen diğer türevlerde bu sinyaller çok zayıf bir şekilde alınmış veya alınamamıştır.



Şekil 5.9. Hedef bileşiklerin ^{13}C -NMR spektrumlarında gözlenen kimyasal kayma değerleri

Öncü bileşik **F1**'den hareketle tasarlanan **STF1-STF12** kodlu bileşiklerin sentez ve yapı aydınlatma çalışmaları tamamlandıktan sonra, insan NAMPT ve SIRT1 enzimleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir (Şekil 5.10).



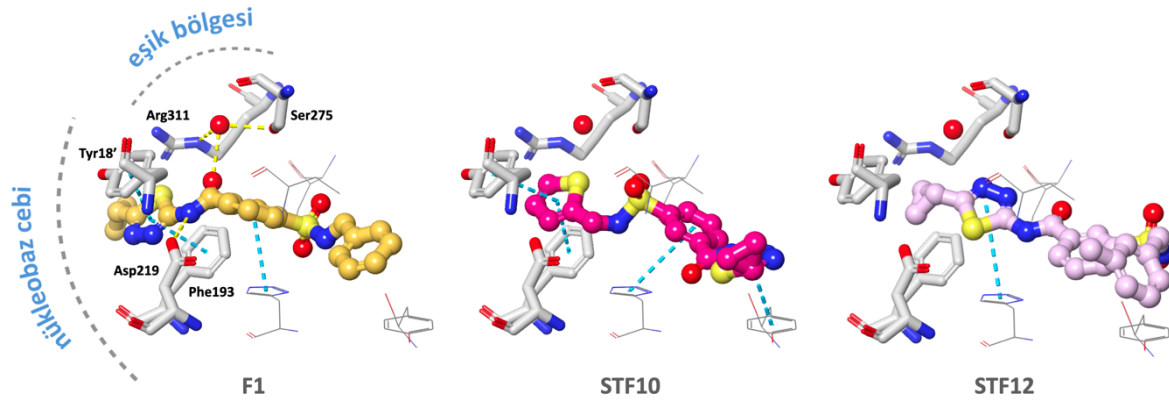
Şekil 5.10. STF1-STF12 kodlu bileşiklerin NAMPT ve SIRT1 enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri

Biyolojik aktivite bulguları değerlendirildiğinde; 50 µM konsantrasyonda 1,3,4-tiyadiazol halkasının beşinci konumundaki süstitüentlere ait hacimsel ve konformasyonel özelliklerin NAMPT inhibitör aktivitesi üzerinde belirleyici olduğu görülmüştür. Siklopropil grubunun (F1, %93) yerine benzer hacimde fakat daha hareketli ve hidrofobik özellikte olan izopropil grubunun (STF2, %84) kullanılması aktivitede hafif bir azalmaya yol açmıştır. Daha hacimli *ter*-bütil grubunun (STF3, %70) eklenmesiyle ise aktivitedeki düşüş daha belirgin hale gelmiştir. İzopropil ile benzer hacimde ancak kısmen polar karakterdeki diflorometil grubunun (STF4, %74) kullanılması, nükleobaz cebine uyum sağlayarak NAMPT inhibisyonunun büyük ölçüde korunmasını sağlamıştır. Buna karşın, diflorometil ve siklopropile kıyasla daha hacimli ve daha polar olan triflorometil (STF5, %51) ve 1-

fluorosiklopropil (**STF6**, %46) grupları, aktiviteyi belirgin şekilde düşürmüştür. Beşinci konumda herhangi bir sübstituent taşımayan **STF1**'in her iki konsantrasyonda da yüksek NAMPT inhibisyonu göstermesi ise, hacimli grupların nükleobaz cebinde oluşturabileceği sterik engel hipotezini desteklemektedir.

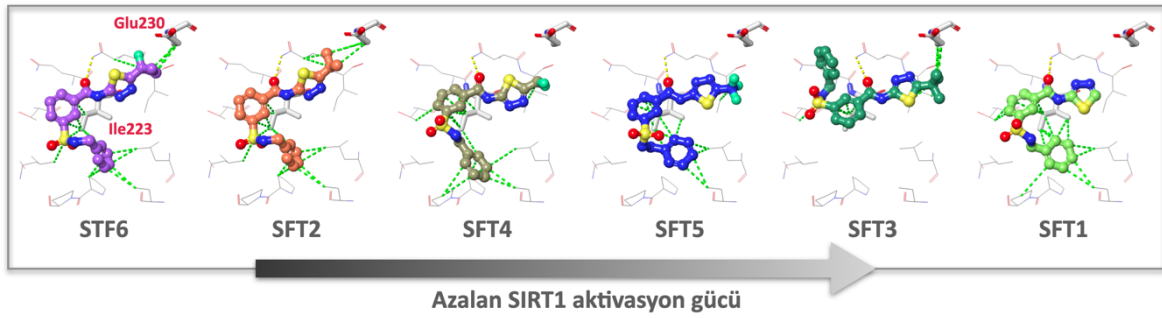
A bölgesinde 1,3,4-tiyadiazol yerine piridin getirilmesi (**STF7**, %50) aktiviteyi olumsuz yönde etkilemiş; 3-metilpiridin halkası ile (**STF8**, %34) aktivitenin daha da azaldığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, 4-izopropilfenil halkası içeren **STF9** kodlu bileşikte aktivitenin neredeyse tamamen kaybolduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, A bölgesinde 1,3,4-tiyadiazol halkasının yöneldiği nükleobaz bölgesinde halka büyüklüğündeki artışın, **STF1-STF6** türevlerinde olduğu gibi NAMPT inhibisyonunu olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.

B bölgesinde ise; öncü bileşikteki fenil halkasının tiyofen (**STF10**), 4-florofenil (**STF11**) veya 3-metilfenil (**STF12**) halkaları ile değiştirilmesi, NAMPT enzim aktivitesine karşı herhangi bir etki oluşturmamıştır. Docking analizleri, **STF10**'un NAMPT aktif bölgesindeki bağlanma beklenenden farklı bir bağlanma modu sergilediğini ortaya koymuş; daha küçük hacimli tiyofen halkasının nükleobaz cebine yerleştiği ancak **F1**'e kıyasla ters bir konumlanma sergilediği belirlenmiştir. Öte yandan **STF12**, A halkası olarak **F1** ile aynı yapıyı taşımasına rağmen, B bölgesindeki hacim artışı nedeniyle nükleobaz cebine yeterince ilerleyememiştir (Şekil 5.11). Bu sonuçlar, B bölgesinde gerçekleştirilen değişikliklerin bağlanma modunu doğrudan etkilediğini ve özellikle nükleobaz cebine uygun konumlanmanın sağlanmasında kritik rol oynadığını düşündürmektedir.



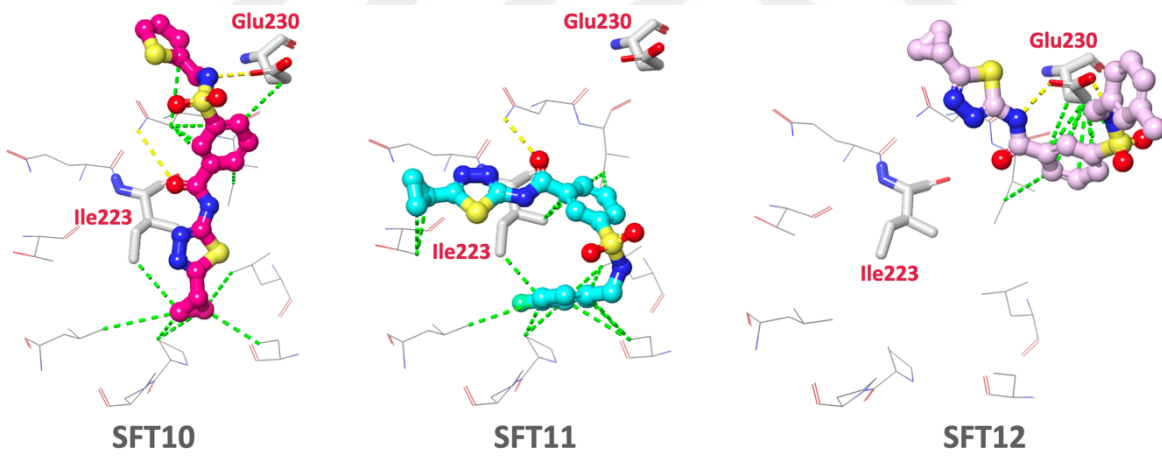
Şekil 5.11. İnsan NAMPT aktif bölgesinde (PDB: 4M6P) STF10 ve STF12 kodlu bileşiklerin F1 ile karşılaştırmalı bağlantı modları. Hidrojen bağları ve π - π etkileşimler sırasıyla sarı ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

Bileşiklerin 100 μ M konsantrasyonda SIRT1 enzim aktivitesi üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde; öncü bileşik yapısındaki 1,3,4-tiyadiazol halkasının beşinci konumundan farklı boyutlardaki gruplarla sübstitüe edilmesi (**STF2-STF6**) aktivasyon gücünün bazı türevlerde azaldığı (**F1**:%66 $\rightarrow$ %42) bazı türevlerde ise koruduğu (**F1**:%66 $\rightarrow$ %70) tespit edilmiştir. İlgili konumda 1-fluorosiklopropil (**STF6**, %70) ve izopropil (**STF2**, %58) taşıyan türevlerin, bu bölgede Glu230 ile ek hidrofobik etkileşimler kurması; *ter*-bütil (**STF3**, %36), diflorometil (**STF4**, %46) ve triflorometil (**STF5**, %42) taşıyan türevlere kıyasla daha yüksek aktivite göstermelerini açıklamaktadır. 1,3,4-tiyadiazol halkası yerine farklı aromatik halkaların getirildiği türevlerden piridin (**STF7**, %29), 3-metilpiridin (**STF8**, %40) ve 4-izopropilfenil (**STF9**, %34) taşıyan bileşiklerde aktivasyon etkinin azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, bu üç bileşik arasında **STF8** ve **STF9** > **STF7** bulgusu yine hidrofobik sübstitüent varlığında kurulan ek etkileşimler ile açıklanabilmektedir. Bununla birlikte, 1,3,4-tiyadiazol halkasında sübstitüent taşımayan **STF1** (%22) ile karşılaştırıldığında, bu bileşiklerin daha yüksek SIRT1 aktivasyonu sağlaması, beşinci konumdaki grupların SIRT1 aktivasyonu üzerindeki önemini vurgulamaktadır (Şekil 5.12).



Şekil 5.12. İnsan SIRT1 aktif bölgesinde (PDB: 4ZZJ) SFT bileşiklerinin oluşturduğu hidrojen bağları (sarı) ve hidrofobik etkileşimler (yeşil)

B bölgesinde öncü bileşiğin fenil halkası yerine tiyofen (**SFT10**), 4-florofenil (**SFT11**) ve 3-metilfenil (**SFT12**) halkalarının getirildiği türevlerde, SIRT1 aktivatör etkilerin NAMPT inhibitör etkisine benzer şekilde kaybolduğu belirlenmiştir. Moleküler docking bulguları, bu bileşiklerin düzlemsel konformasyonu sergileyemediğini ve aktif bölgede istenilen etkileşimleri sağlayamadığını göstermektedir (Şekil 5.13).



Şekil 5.13. İnsan SIRT1 aktif bölgesinde (PDB: 4ZZJ) SFT10-SFT12 kodlu bileşiklerinin oluşturduğu hidrojen bağları (sarı) ve hidrofobik etkileşimler (yeşil)

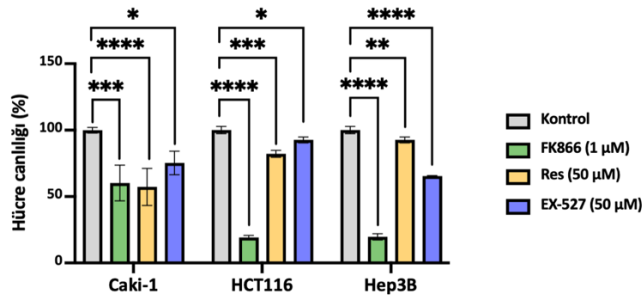
Öncü bileşik **F1** üzerinde yapılan optimizasyonlar sonucunda elde edilen **SFT1-SFT12** kodlu bileşiklerin NAMPT ve SIRT1 enzimleri üzerindeki etkileri birlikte değerlendirildiğinde; 3-(*N*-metilsülfamoil)benzamid motifinin korunarak A bölgesinde 1,3,4-tiyadiazol halkasının süstitüsüyonu veya halkanın değiştirilmesi (**SFT1-SFT9**) ile dual etkinin sürdürülebildiği

görülmüştür. Bu bölgedeki hidrofobik karakter taşıyan süstitüentlerin hacmindeki artış, NAMPT inhibisyon gücünü olumsuz yönde etkilerken, SIRT1 aktivasyonuna katkı sağlamıştır. B bölgesinde yapılan değişiklikler ise, bileşiklerin enzimlerin aktif bölgelerine yerleşememesi veya ters konumlanarak beklenen yönlendirilmenin olmaması gibi nedenlerle her iki enzim üzerindeki etkinin kaybolmasına yol açmıştır. **STF1-STF12** arasında, özellikle **STF2** (NAMPT IC₅₀=11,24 µM; SIRT1 EC_{1,5}=16,98 µM) ve **STF6** (NAMPT IC₅₀=19,15 µM; SIRT1 EC_{1,5}=0,59 µM) kodlu bileşiklerin eşzamanlı NAMPT inhibisyonu ve SIRT1 aktivasyonu açısından dikkate değer düzeyde etkili oldukları belirlenmiştir.

NAMPT inhibisyonunun, kolon [67, 78, 339], böbrek [131, 374] ve karaciğer [94, 375] kanser hücreleri olmak üzere birçok kanser üzerinde hücrel NAD⁺ seviyelerinin azalmasına bağlı olarak antikanser etkilere neden olduğu; ayrıca fibrosarkoma ve glioma gibi bazı kanser hücrelerinde NAD⁺ seviyelerinin SIRT1 aktivasyonu ile sinerjistik bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir [23]. SIRT1 aktivasyonunun NAMPT inhibitörlerinin etkinliğinin arttırdığını gösteren bulguların yanı sıra, tek başına SRT17020, SRT2183 ve resveratrol gibi SIRT1 aktivatörlerinin birçok kanser türünde hücre proliferasyonunu farklı mekanizmalar üzerinden azaltabildiği de bildirilmiştir [296, 324-326, 376, 377].

Tez çalışmamızda, bu bulgulardan yola çıkılarak geliştirilen eşzamanlı olarak NAMPT inhibitörü ve SIRT1 aktivatörü etki gösteren **F1**, **F2**, **STF2** ve **STF6** kodlu bileşiklerin insan Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal, Hep3B karaciğer kanseri hücre hatlarında oluşturdukları etkiler 10, 25 ve 100 µM konsantrasyonlarda MTS testi kullanarak ve insan HEK293T embriyonik böbrek (kansere olmayan) hücreleri ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Çalışmada kullanılan referans bileşikler için 24 saatlik inkübasyon süresi ile ön çalışma gerçekleştirilerek, insan Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanseri hücrelerinde anlamlı antiproliferatif etki gösterebildiği konsantrasyonlar NAMPT inhibitörü FK866 için 1 µM; SIRT1 aktivatörü resveratrol için 50 µM; SIRT1 inhibitörü EX-527 için ise 50 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.14).

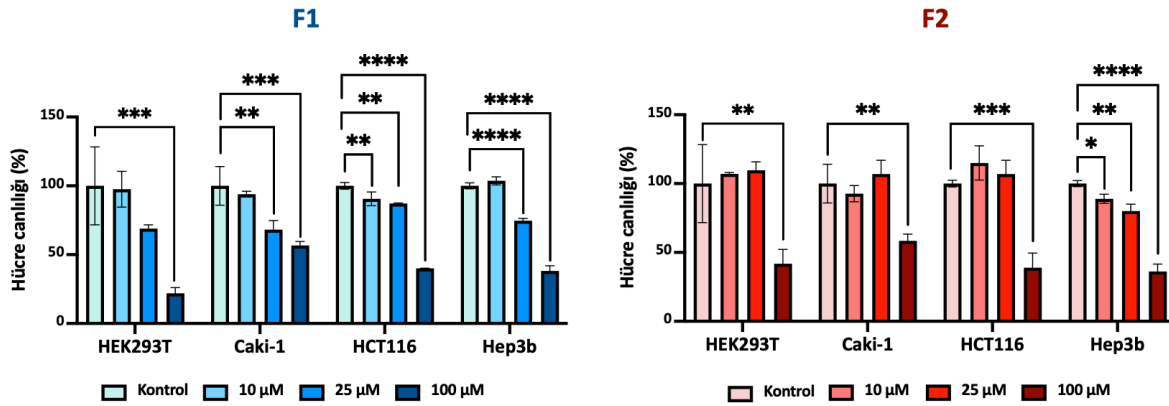


Şekil 5.14. İnsan Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında referans bileşikler için belirlenen % hücre canlılığı (değerler ortalama±SS şeklinde verilmiştir). Her deney üç kez tekrarlanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$ olarak sunulmuştur.

Elde edilen bulgular, **F1** kodlu bileşiğin antiproliferatif etkinliğinin hem konsantrasyona hem de hücre tipine bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 5.15). Düşük konsantrasyonda (10 µM) **F1**, Caki-1 böbrek ve Hep3B karaciğer kanser hücrelerinde anlamlı bir sitotoksik etki oluşturmazken, HCT116 kolorektal kanseri hücrelerinde hücre canlılığını %91'den daha düşük seviyeye indirmiştir. 25 µM konsantrasyonda; tüm kanser hücrelerinde belirgin bir canlılık azalmasına sebep olmasının yanında, kanser olmayan HEK293T hücrelerinde de hücre canlılığını %68'e indirerek sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca, Caki-1 böbrek (%68) hücrelerine karşı Hep3B karaciğer (%75) ve HCT116 kolorektal (%87) hücrelerine kıyasla daha güçlü bir antiproliferatif etki sergilemiştir. Yüksek konsantrasyonda (100 µM) ise tüm kanser hücrelerinde hücre canlılığı %38-57 arasında değişirken, kanser olmayan HEK293T hücrelerinde %22 seviyesine düşmüş, bu da bileşiğin yüksek dozda normal hücrelerde de sitotoksikite oluşturduğunu ortaya koymuştur.

F2 kodlu bileşik, 10-100 µM konsantrasyon aralığında yüksek derecede NAMPT inhibisyonu (%65-82) ve SIRT1 aktivasyonu (%36-55) sergilemesine rağmen; 10 µM ve 25 µM konsantrasyonlarda insan HEK293T (kanser olmayan), Caki-1 böbrek ve HCT116 kolorektal kanseri hücrelerinde anlamlı bir sitotoksik etki oluşturmamıştır (Şekil 5.14). 100 µM konsantrasyonda test edilen kanser hücrelerinde canlılık %36-58 oranında azalmış, ancak kanser olmayan hücrelerde de sitotoksikite gözlenmiştir. Buna karşın Hep3B karaciğer kanser hücrelerinde, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarda sırasıyla %89 ve %80 canlılık ile

anlamlı bir sitotoksik etki gözlenmiş; bu sonuçlar **F2**'nin Hep3B üzerinde diğer kanser hücrelerine göre daha etkili bir antiproliferatif etki gösterdiğini ortaya koymuştur. **F2** kodlu bileşiğin güçlü NAMPT inhibisyonu ve anlamlı SIRT1 aktivasyon profiline rağmen (NAMPT $IC_{50}=0,68 \mu M$; SIRT1 $EC_{1,5}=10,39 \mu M$), **F1**'den farklı olarak SIRT3 üzerinde inhibitör etki (%59) göstermesi, hücresel NAD^+ seviyelerini etkin bir şekilde düşürememesine, dolayısıyla daha düşük bir antiproliferatif etkiye yol açmış olabileceği düşünülmüştür.

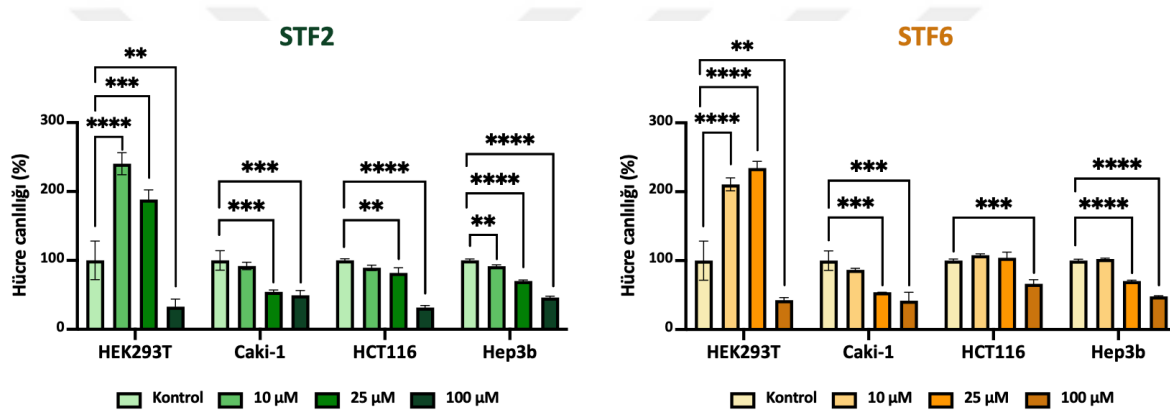


Şekil 5.15. İnsan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında F1 ve F2 için 24 saat sonunda belirlenen % hücre canlılığı (değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir). Her deney üç tekrarlar gerçekleştirilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı farklılıklar * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$ olarak sunulmuştur.

F1 öncü bileşiğinden hareketle tasarlanan **STF2** kodlu bileşiğin MTS bulguları incelendiğinde (Şekil 5.16), 10 μM konsantrasyonda anlamlı sitotoksik etkinin yalnızca Hep3B karaciğer kanseri hücrelerinde ortaya çıktığı belirlenmiştir. 25 μM konsantrasyonda ise tüm kanser hücrelerinde hücre canlılığı oranlarında (%54-82) belirgin bir azalma gözlenmiş ve bu düzeyde **STF2**'nin, **F1** ve **F2**'ye kıyasla kanser hücrelerine karşı daha yüksek seçicilik sergilediği saptanmıştır. Ayrıca, 25 μM konsantrasyonda **STF2**'nin, **F1** ile benzer şekilde, Caki-1 böbrek kanseri hücrelerinde (%54), Hep3B karaciğer (%70) ve HCT116 kolorektal kanseri hücrelerine (%82) kıyasla daha güçlü antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonda (100 μM) ise tüm kanser hücrelerinde canlılık oranlarının %32–49 aralığında olduğu, ancak kanser olmayan HEK293T hücrelerinde canlılık değerinin %33'e kadar düştüğü belirlenmiş ve bu durum **STF2**'nin yüksek konsantrasyonda seçiciliğini kaybettiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, **STF2**'nin sergilediği antiproliferatif etkinliğin,

bileşiğin ortaya koyduğu NAMPT inhibisyonu ve SIRT1 aktivasyonu (NAMPT $IC_{50}=11,24 \mu M$; SIRT1 $EC_{1,5}=16,98 \mu M$) ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

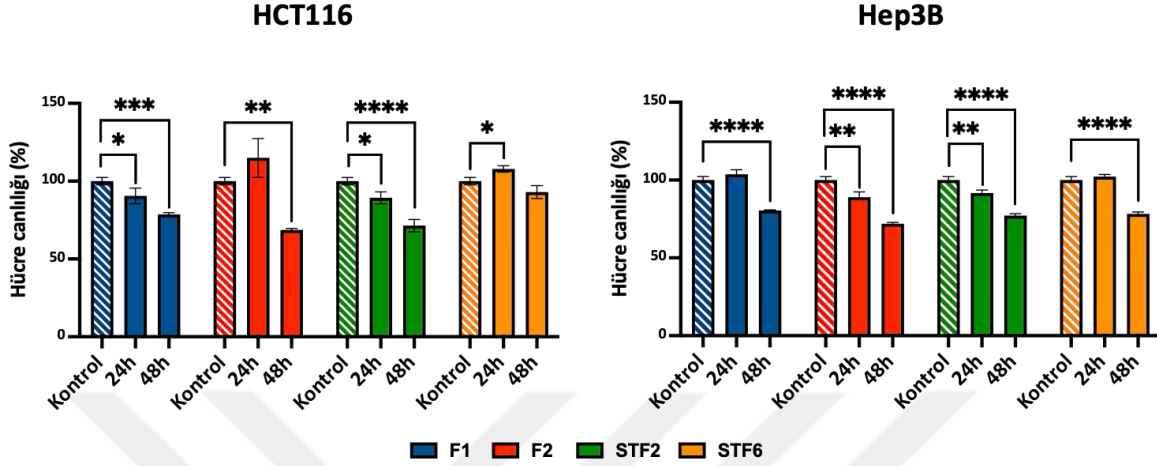
Benzer şekilde, **STF6** kodlu bileşik 10 μM konsantrasyonda test edilen kanser hücrelerinde anlamlı bir etki göstermezken, 25 μM konsantrasyonda yalnızca Caki-1 böbrek (%54) ve Hep3B karaciğer (%71) kanseri hücrelerinde belirgin antiproliferatif etki sergilemiştir. 100 μM konsantrasyonda ise tüm kanser hücrelerinde %42-66 aralığında hücre canlılığı saptanmış; kanser olmayan HEK293T hücrelerinde canlılık %43 seviyesine düşerek yüksek dozda bileşiğin seçiciliğini kaybettiği görülmüştür (Şekil 5.16).



Şekil 5.16. İnsan HEK293T embriyonik böbrek (kanser olmayan), Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında STF2 ve STF6 için 24 saat sonunda belirlenen % hücre canlılığı (değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir). Her deney üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı farklılıklar * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$ olarak sunulmuştur.

Bunlara ek olarak, bileşiklerin 10 μM konsantrasyonda insan HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücreleri üzerindeki etkileri 48 saatlik uygulama sonunda da değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular 24 saatlik sonuçlarla karşılaştırılmıştır (Şekil 5.17). Veriler, 48 saat sonunda **F1**, **F2**, **STF2** ve **STF6**'nın antiproliferatif etkilerinde artış meydana geldiğini, özellikle Hep3B hücrelerinin bu bileşiklere karşı duyarlılığının belirgin şekilde yükseldiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, bileşiklerin etkinliğinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, **F1**, **F2**, **STF2** ve **STF6**'nın kanser hücrelerine karşı sergilediği antiproliferatif etkiler, hücre görüntüleriyle de uyumlu

olduğu; doz artışıyla birlikte kanser hücrelerinde morfolojik bozulma ve sitotoksik etkinin daha belirgin hale geldiği tespit edilmiştir.



Şekil 5.17. İnsan HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücre hatlarında, 10µM konsantrasyonda F1, F2, STF2 ve STF6 bileşikleri için 24 ve 48 saat sonunda belirlenen % hücre canlılıkları (değerler ortalama±SS şeklinde verilmiştir). Her deney üç tekrarla gerçekleştirilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı farklılıklar *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ve ****p<0,0001 olarak sunulmuştur.

Genel olarak değerlendirildiğinde; bileşiklerinin özellikle insan Caki-1 böbrek ile Hep3B karaciğer kanseri hücrelerinde, HCT116 kolorektal kanseri hücrelerine kıyasla daha belirgin sitotoksikite ortaya koyduğu görülmüştür. Bu farklılık, literatürde de vurgulandığı üzere, HCT116 hücrelerinin enerji gereksinimlerini karşılamak üzere alternatif NAD⁺ biyosentez yolu olan Preiss-Handler yolağını aktive edebilme ve NAPRT ekspresyon kapasiteleri ile açıklanabilmektedir [378]. Bu metabolik esneklik, HCT116 kolorektal kanseri hücrelerinin NAMPT inhibitörlerine, özellikle de FK866'ya karşı direnç geliştirmesine neden olan temel mekanizma olarak da bildirilmektedir [379]. Diğer yandan Hep3B karaciğer kanseri hücreleri için bu konuda detaylı bilgi olmamasına karşın, Caki-1 böbrek kanseri hücrelerinde NAPRT ekspresyonunun çok düşük seviyede olduğu ve NAD⁺ sentezi için NAMPT enzimine bağımlı oldukları bildirilmiştir [378, 380]. Caki-1 böbrek kanseri hücrelerinde SIRT1 aktivasyonunun doğrudan etkisini gösteren bir veri bulunmamakla birlikte, SIRT1 aktivasyonu veya SIRT1'in aşırı eksprese edilmesi durumunda Hep3B hücrelerinin oksidatif stresle indüklenen apoptoza karşı daha duyarlı hale geldiği belirtilmiştir [381].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamız kapsamında eşzamanlı olarak NAMPT inhibitörü ve SIRT1 aktivatörü etkinlik gösterebilecek bileşiklere ulaşmak amacıyla; ligand ve yapı temelli moleküler modelleme teknikleri ile sıralı sanal tarama çalışması gerçekleştirilmiştir. Sanal tarama çıktısı olarak belirlenen dokuz aday bileşikten (**F1-F9**); **F1** (NAMPT $IC_{50}=0,89 \mu M$; SIRT1 $EC_{1,5}=16,45 \mu M$), **F2** (NAMPT $IC_{50}=0,68 \mu M$; SIRT1 $EC_{1,5}=10,39 \mu M$), **F3** (50 μM : NAMPT %41 inh.; SIRT1 %53 akt.) ve **F5** (50 μM : NAMPT %53 inh.; SIRT1 %44 akt.) kodlu bileşikler dual NAMPT inhibitörü ve SIRT1 aktivatörü olarak öne çıktığı belirlenmiştir. Bu bileşikler arasında **F1**, SIRT2 ve SIRT3 enzimlerine etki göstermeksizin SIRT1 aktivasyonunu selektif şekilde sağladığından diğer bileşiklerden farklılaşmış ve optimizasyon çalışmaları için öncü bileşik olarak seçilmiştir. Bu kapsamda, **F1**'den hareketle 3-[*N*-(arilmetil)sülfamoil]-*N*-(aril)benzamid türevi on iki adet yeni bileşik (**STF1-STF12**) tasarlanmıştır.

Elde edilen bulgular, NAMPT aktif bölgesinde Tyr18' ve Phe193 amino asitleriyle π - π etkileşimlerini sürdürebilen aromatik halka değişikliklerinin (**STF1-STF9**), NAMPT inhibitör aktivitesinin korunmasına ve eşzamanlı olarak SIRT1 aktivasyonunun devam ettirilmesine olanak sağladığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, bu halkalarda sübstituent hacminin veya halka büyüklüğünün artması sterik engel nedeniyle NAMPT inhibisyonunu azalttığı; buna karşılık hidrofobik etkileşimlerin artışıyla ilişkili olarak SIRT1 aktivasyonuna olumlu katkı sağladığı belirlenmiştir. **F1** kodlu bileşiğin fenil halkası üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonların (**STF10-STF12**) ise her iki enzimde de aktivite kaybına yol açtığı tespit edilmiştir. Ayrıca moleküler docking bulgularının, bileşiklerin sergilediği etki profili ile uyumlu olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, **F1** bileşiği üzerinde gerçekleştirilen optimizasyonlar neticesinde **STF2** (NAMPT $IC_{50}=11,24 \mu M$; SIRT1 $EC_{1,5}=16,98 \mu M$) ve **STF6** (NAMPT $IC_{50}=19,15 \mu M$; SIRT1 $EC_{1,5}=0,59 \mu M$) bileşiklerinin dual NAMPT inhibitörü ve SIRT1 aktivatörü olarak öne çıktığı belirlenmiştir.

Dual etkili olarak tanımlanan **F1**, **F2**, **STF2** ve **STF6** kodlu bileşiklerin insan Caki-1 böbrek, HCT116 kolorektal ve Hep3B karaciğer kanser hücreleri ile insan HEK293T embriyonik böbrek hücreleri (kansere olmayan) üzerindeki etkileri araştırılmış; HEK293T normal hücreleri üzerinde düşük sitotoksikite sergilerken; özellikle Caki-1 böbrek ve Hep3B karaciğer kanseri hücre hatlarında anlamlı antiproliferatif etki ortaya koymuş, HCT116 kolon kanseri hücrelerinde ise sınırlı düzeyde etki göstermiştir. Özellikle **STF2** ve **STF6**'nın, Caki-1 ve Hep3B hücrelerinde **F1** ile benzer antiproliferatif etkilere sahip olmalarına karşın, normal hücreler üzerinde daha düşük toksisite göstermeleri, bu bileşiklerin **F1**'e kıyasla daha avantajlı bir terapötik profil sunduğunu ortaya koymuştur.

İleri aşamalarda, hem NAMPT inhibitörü hem de SIRT1 aktivatörü özellikleri sergileyen bileşiklerde gözlenen antiproliferatif etkinin, öngörüldüğü üzere hücrel NAD⁺ seviyelerindeki azalma ile ilişkili olup olmadığı araştırılacaktır. Ayrıca bu azalma üzerinde NAMPT ve SIRT1 enzimlerinin rolünün aydınlatılması hedeflenmektedir. Bunun yanı sıra, söz konusu bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki apoptotik ve antiangiyojenik etkilerinin belirlenmesiyle antiproliferatif bulguların desteklenmesi ve antikanser etki mekanizmalarının kapsamlı biçimde ortaya konulması amaçlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Peters, J. U. (2013). Polypharmacology - foe or friend? *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(22), 8955-8971.
2. Hopkins, A. L. (2008). Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nature Chemical Biology*, 4(11), 682-690.
3. Frei, E., Karon, M., Levin, R. H., J. Freireicij, E., Taylor, R. J., Hananian, J., Selawry, O., Holland, J. F., Hoogstraten, B., Wolman, I. J., Abir, E., Sawitsky, A., Lee, S., Mills, S. D., Burgert, E. O., Spurr, C. L., Patterson, R. B., Ebaugh, F. G., James, W. and Moon, J. H. (1965). The Effectiveness of Combinations of Antileukemic Agents in Inducing and Maintaining Remission in Children with Acute Leukemia. *Blood*, 26(5), 642-656.
4. Szumilak, M., Wiktorowska-Owczarek, A. and Stanczak, A. (2021). Hybrid Drugs-A Strategy for Overcoming Anticancer Drug Resistance? *Molecules*, 26(9), 2601.
5. Navas, L. E. and Carnero, A. (2021). NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 2.
6. Sharif, T., Martell, E., Dai, C., Ghassemi-Rad, M. S., Kennedy, B. E., Lee, P. W. and Gujar, S. (2019). Regulation of cancer and cancer-related genes via NAD⁺. *Antioxidants & Redox Signaling*, 30(6), 906-923.
7. Chen, H., Wang, S., Zhang, H., Nice, E. C. and Huang, C. (2016). Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) in carcinogenesis: new clinical opportunities. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 16(8), 827-838.
8. Sampath, D., Zabka, T. S., Misner, D. L., O'Brien, T. and Dragovich, P. S. (2015). Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 151, 16-31.
9. Ying, W. (2008). NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(2), 179-206.
10. Revollo, J. R., Grimm, A. A. and Imai, S.-i. (2007). The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23(2), 164-170.
11. Ghanem, M. S., Monacelli, F. and Nencioni, A. (2021). Advances in NAD-Lowering Agents for Cancer Treatment. *Nutrients*, 13(5), 1665.

12. Audrito, V., Manago, A., Gaudino, F., Sorci, L., Messana, V. G., Raffaelli, N. and Deaglio, S. (2019). NAD-Biosynthetic and Consuming Enzymes as Central Players of Metabolic Regulation of Innate and Adaptive Immune Responses in Cancer. *Frontiers in Immunology*, 10, 1720.
13. Lucas, S., Soave, C., Nabil, G., Ahmed, Z. S. O., Chen, G., El-Banna, H. A., Dou, Q. P. and Wang, J. (2017). Pharmacological Inhibitors of NAD Biosynthesis as Potential Anticancer Agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 12(3), 190-207.
14. Ozgencil, F., Gunindi, H. B. and Eren, G. (2024). Dual-targeted NAMPT inhibitors as a progressive strategy for cancer therapy. *Bioorganic Chemistry*, 149, 107509.
15. Holen, K., Saltz, L. B., Hollywood, E., Burk, K. and Hanauske, A.-R. (2008). The pharmacokinetics, toxicities, and biologic effects of FK866, a nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis inhibitor. *Investigational New Drugs*, 26(1), 45-51.
16. Hasmann, M. and Schemainda, I. (2003). FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Research*, 63(21), 7436-7442.
17. Beauparlant, P., Bédard, D., Bernier, C., Chan, H., Gilbert, K., Goulet, D., Gratton, M.-O., Lavoie, M., Roulston, A., Turcotte, É. and Watson, M. (2009). Preclinical development of the nicotinamide phosphoribosyl transferase inhibitor prodrug GMX1777. *Anti-cancer Drugs*, 20(5), 346-354.
18. Watson, M., Roulston, A., Bélec, L., Billot, X., Marcellus, R., Bédard, D., Bernier, C., Branchaud, S., Chan, H., Dairi, K., Gilbert, K., Goulet, D., Gratton, M.-O., Isakau, H., Jang, A., Khadir, A., Koch, E., Lavoie, M., Lawless, M., Nguyen, M., Paquette, D., Turcotte, É., Berger, A., Mitchell, M., Shore, G. C. and Beauparlant, P. (2009). The Small Molecule GMX1778 Is a Potent Inhibitor of NAD⁺ Biosynthesis: Strategy for Enhanced Therapy in Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase 1-Deficient Tumors. *Molecular and Cellular Biology*, 29(21), 5872-5888.
19. von Heideman, A., Berglund, A., Larsson, R. and Nygren, P. (2010). Safety and efficacy of NAD depleting cancer drugs: results of a phase I clinical trial of CHS 828 and overview of published data. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 65(6), 1165-1172.
20. Cassar, S., Dunn, C., Olson, A., Buck, W., Fossey, S., Ramos, M. F., Sancheti, P., Stolarik, D., Britton, H., Cole, T., Bratcher, N., Huang, X., Peterson, R., Longenecker, K. and LeRoy, B. (2018). From the Cover: Inhibitors of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Cause Retinal Damage in Larval Zebrafish. *Toxicological Sciences*, 161(2), 300-309.
21. Misner, D. L., Kauss, M. A., Singh, J., Uppal, H., Bruening-Wright, A., Liederer, B. M., Lin, T., McCray, B., La, N., Nguyen, T., Sampath, D., Dragovich, P. S., O'Brien, T. and Zabka, T. S. (2017). Cardiotoxicity Associated with Nicotinamide

Phosphoribosyltransferase Inhibitors in Rodents and in Rat and Human-Derived Cells Lines. *Cardiovascular Toxicology*, 17(3), 307-318.

22. Tang, H., Wang, L., Wang, T., Yang, J., Zheng, S., Tong, J., Jiang, S., Zhang, X. and Zhang, K. (2023). Recent advances of targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) for cancer drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 258, 115607.
23. Miller, J. J., Fink, A., Banagis, J. A., Nagashima, H., Subramanian, M., Lee, C. K., Melamed, L., Tummala, S. S., Tateishi, K., Wakimoto, H. and Cahill, D. P. (2020). Sirtuin activation targets IDH-mutant tumors. *Neuro-Oncology*, 23(1), 53-62.
24. London, C., Brown, M., Warry, E., Schuh, E., Senapedis, W. T., Argueta, C., Kashyap, T., Chang, H., Ellis, J., Shacham, S. and Baloglu, E. (2017). Abstract LB-308: KPT-9274 inhibits cellular NAD and synergizes with doxorubicin to treat dogs with lymphoma. *Cancer Research*, 77(13_Supplement), LB-308-LB-308.
25. Galli, U., Colombo, G., Travelli, C., Tron, G. C., Genazzani, A. A. and Grolla, A. A. (2020). Recent Advances in NAMPT Inhibitors: A Novel Immunotherapeutic Strategy. *Frontiers in Pharmacology*, 11(656).
26. Hubbard, B. P. and Sinclair, D. A. (2014). Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(3), 146-154.
27. Rongvaux, A., Shea, R. J., Mulks, M. H., Gigot, D., Urbain, J., Leo, O. and Andris, F. (2002). Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *European Journal of Immunology*, 32(11), 3225-3234.
28. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57-70.
29. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
30. Pavlova, N. N. and Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), 27-47.
31. Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P. E., Zhou, X., Li, C., Shen, G. and Zou, B. (2020). NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 227.

32. Covarrubias, A. J., Perrone, R., Grozio, A. and Verdin, E. (2021). NAD(+) metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 119-141.
33. Kim, M. Y., Zhang, T. and Kraus, W. L. (2005). Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes & Development*, 19(17), 1951-1967.
34. Kaya, S. G. and Eren, G. (2023). Selective inhibition of SIRT2: A disputable therapeutic approach in cancer therapy. *Bioorganic Chemistry*, 143, 107038.
35. Chini, E. N. (2009). CD38 as a regulator of cellular NAD: a novel potential pharmacological target for metabolic conditions. *Current Pharmaceutical Design*, 15(1), 57-63.
36. Graeff, R., Liu, Q., Kriksunov, I. A., Kotaka, M., Oppenheimer, N., Hao, Q. and Lee, H. C. (2009). Mechanism of cyclizing NAD to cyclic ADP-ribose by ADP-ribosyl cyclase and CD38. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), 27629-27636.
37. Murata, M. M., Kong, X., Moncada, E., Chen, Y., Imamura, H., Wang, P., Berns, M. W., Yokomori, K. and Digman, M. A. (2019). NAD⁺ consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival. *Molecular Biology of the Cell*, 30(20), 2584-2597.
38. Poltronieri, P., Celetti, A. and Palazzo, L. (2021). Mono(ADP-ribosyl)ation Enzymes and NAD⁺ Metabolism: A Focus on Diseases and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 10(1), 128.
39. Levine, D. C., Ramsey, K. M. and Bass, J. (2022). Circadian NAD(P)(H) cycles in cell metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 126, 15-26.
40. Chiarugi, A., Dölle, C., Felici, R. and Ziegler, M. (2012). The NAD metabolome-a key determinant of cancer cell biology. *Nature Reviews. Cancer*, 12(11), 741-752.
41. Belenky, P., Bogan, K. L. and Brenner, C. (2007). NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 12-19.
42. Lautrup, S., Sinclair, D. A., Mattson, M. P. and Fang, E. F. (2019). NAD(+) in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. *Cell Metabolism*, 30(4), 630-655.
43. Luengo, A., Li, Z., Gui, D. Y., Sullivan, L. B., Zagorulya, M., Do, B. T., Ferreira, R., Naamati, A., Ali, A., Lewis, C. A., Thomas, C. J., Spranger, S., Matheson, N. J. and Vander Heiden, M. G. (2021). Increased demand for NAD⁺ relative to ATP drives aerobic glycolysis. *Molecular Cell*, 81(4), 691-707.e696.
44. Conlon, N. and Ford, D. (2022). A systems-approach to NAD⁺ restoration. *Biochemical Pharmacology*, 198, 114946.

45. Cantó, C., Menzies, K. J. and Auwerx, J. (2015). NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metabolism*, 22(1), 31-53.
46. Xiao, Y., Elkins, K., Durieux, J. K., Lee, L., Oeh, J., Yang, L. X., Liang, X., DelNagro, C., Tremayne, J., Kwong, M., Liederer, B. M., Jackson, P. K., Belmont, L. D., Sampath, D. and O'Brien, T. (2013). Dependence of tumor cell lines and patient-derived tumors on the NAD salvage pathway renders them sensitive to NAMPT inhibition with GNE-618. *Neoplasia*, 15(10), 1151-1160.
47. Shames, D. S., Elkins, K., Walter, K., Holcomb, T., Du, P., Mohl, D., Xiao, Y., Pham, T., Haverty, P. M., Liederer, B., Liang, X., Yauch, R. L., O'Brien, T., Bourgon, R., Koeppen, H. and Belmont, L. D. (2013). Loss of NAPRT1 expression by tumor-specific promoter methylation provides a novel predictive biomarker for NAMPT inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(24), 6912-6923.
48. Tateishi, K., Wakimoto, H., Iafrate, A. J., Tanaka, S., Loebel, F., Lelic, N., Wiederschain, D., Bedel, O., Deng, G., Zhang, B., He, T., Shi, X., Gerszten, R. E., Zhang, Y., Yeh, J.-R. J., Curry, W. T., Zhao, D., Sundaram, S., Nigim, F., Koerner, M. V. A., Ho, Q., Fisher, D. E., Roider, E. M., Kemeny, L. V., Samuels, Y., Flaherty, K. T., Batchelor, T. T., Chi, A. S. and Cahill, D. P. (2015). Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD⁺ Depletion. *Cancer Cell*, 28(6), 773-784.
49. Kirkland, J. (2009). Niacin Status, NAD Distribution and ADP-Ribose Metabolism. *Current Pharmaceutical Design*, 15(1), 3-11.
50. Preiss, J. and Handler, P. (1957). Enzymatic synthesis of nicotinamide mononucleotide. *The Journal of Biological Chemistry*, 225(2), 759-770.
51. Martin, P. R., Shea, R. J. and Mulks, M. H. (2001). Identification of a Plasmid-Encoded Gene from *Haemophilus ducreyi* Which Confers NAD Independence. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1168-1174.
52. Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanabe, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kihara, S., Yamashita, S., Makishima, M., Funahashi, T., Yamanaka, S., Hiramatsu, R., Matsuzawa, Y. and Shimomura, I. (2005). Visfatin: A Protein Secreted by Visceral Fat That Mimics the Effects of Insulin. *Science*, 307(5708), 426-430.
53. Imai, S.-i. (2009). Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): A link between NAD biology, metabolism, and diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 15(1), 20-28.

54. Travelli, C., Colombo, G., Mola, S., Genazzani, A. A. and Porta, C. (2018). NAMPT: A pleiotropic modulator of monocytes and macrophages. *Pharmacological Research*, 135, 25-36.
55. Gasparrini, M. and Audrito, V. (2022). NAMPT: A critical driver and therapeutic target for cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 145, 106189.
56. Zhu, Y., Xu, P., Huang, X., Shuai, W., Liu, L., Zhang, S., Zhao, R., Hu, X. and Wang, G. (2022). From Rate-Limiting Enzyme to Therapeutic Target: The Promise of NAMPT in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 920113.
57. Audrito, V. (2020). The dual face of NAMPT: Intracellular/extracellular protein and diagnostic/therapeutic target in cancer. *EBioMedicine*, 62, 103109.
58. Wen, F., Gui, G., Wang, X., Ye, L., Qin, A., Zhou, C. and Zha, X. (2024). Drug discovery targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT): Updated progress and perspectives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 99, 117595.
59. Sayers, S. R., Beavil, R. L., Fine, N. H. F., Huang, G. C., Choudhary, P., Pacholarz, K. J., Barran, P. E., Butterworth, S., Mills, C. E., Cruickshank, J. K., Silvestre, M. P., Poppitt, S. D., McGill, A. T., Lavery, G. G., Hodson, D. J. and Caton, P. W. (2020). Structure-functional changes in eNAMPT at high concentrations mediate mouse and human beta cell dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 63(2), 313-323.
60. Kadoglou, N. P., Sailer, N., Kapelouzou, A., Lampropoulos, S., Vitta, I., Kostakis, A. and Liapis, C. D. (2012). Effects of atorvastatin on apelin, visfatin (nampt), ghrelin and early carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetologica*, 49(4), 269-276.
61. Hara, N., Yamada, K., Shibata, T., Osago, H. and Tsuchiya, M. (2011). Nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin does not catalyze nicotinamide mononucleotide formation in blood plasma. *PloS One*, 6(8), e22781.
62. Van den Bergh, R., Morin, S., Sass, H. J., Grzesiek, S., Vekemans, M., Florence, E., Tran, H. T., Imiru, R. G., Heyndrickx, L., Vanham, G., De Baetselier, P. and Raes, G. (2012). Monocytes contribute to differential immune pressure on R5 versus X4 HIV through the adipocytokine visfatin/NAMPT. *PloS One*, 7(4), e35074.
63. Camp, S. M., Ceco, E., Evenoski, C. L., Danilov, S. M., Zhou, T., Chiang, E. T., Moreno-Vinasco, L., Mapes, B., Zhao, J. and Gursoy, G. (2015). Unique toll-like receptor 4 activation by NAMPT/PBEF induces NFκB signaling and inflammatory lung injury. *Scientific Reports*, 5(1), 13135.
64. Wang, T., Zhang, X., Bheda, P., Revollo, J. R., Imai, S.-i. and Wolberger, C. (2006). Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD⁺ biosynthetic enzyme. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(7), 661-662.

65. Zheng, X., Bauer, P., Baumeister, T., Buckmelter, A. J., Caligiuri, M., Clodfelter, K. H., Han, B., Ho, Y.-C., Kley, N., Lin, J., Reynolds, D. J., Sharma, G., Smith, C. C., Wang, Z., Dragovich, P. S., Oh, A., Wang, W., Zak, M., Gunzner-Toste, J., Zhao, G., Yuen, P.-w. and Bair, K. W. (2013). Structure-Based Identification of Ureas as Novel Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (Nampt) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(12), 4921-4937.
66. Zheng, X., Bauer, P., Baumeister, T., Buckmelter, A. J., Caligiuri, M., Clodfelter, K. H., Han, B., Ho, Y.-C., Kley, N., Lin, J., Reynolds, D. J., Sharma, G., Smith, C. C., Wang, Z., Dragovich, P. S., Gunzner-Toste, J., Liederer, B. M., Ly, J., O'Brien, T., Oh, A., Wang, L., Wang, W., Xiao, Y., Zak, M., Zhao, G., Yuen, P.-w. and Bair, K. W. (2013). Structure-Based Discovery of Novel Amide-Containing Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (Nampt) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(16), 6413-6433.
67. Zheng, X., Bair, K. W., Bauer, P., Baumeister, T., Bowman, K. K., Buckmelter, A. J., Caligiuri, M., Clodfelter, K. H., Feng, Y., Han, B., Ho, Y.-C., Kley, N., Li, H., Liang, X., Liederer, B. M., Lin, J., Ly, J., O'Brien, T., Oeh, J., Oh, A., Reynolds, D. J., Sampath, D., Sharma, G., Skelton, N., Smith, C. C., Tremayne, J., Wang, L., Wang, W., Wang, Z., Wu, H., Wu, J., Xiao, Y., Yang, G., Yuen, P.-w., Zak, M. and Dragovich, P. S. (2013). Identification of amides derived from 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylic acid as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(20), 5488-5497.
68. Böhnke, N., Berger, M., Griebenow, N., Rottmann, A., Erkelenz, M., Hammer, S., Berndt, S., Günther, J., Wengner, A. M., Stelte-Ludwig, B., Mahlert, C., Greven, S., Dietz, L., Jörißen, H., Barak, N., Bömer, U., Hillig, R. C., Eberspacher, U., Weiske, J., Giese, A., Mumberg, D., Nising, C. F., Weinmann, H. and Sommer, A. (2022). A Novel NAMPT Inhibitor-Based Antibody–Drug Conjugate Payload Class for Cancer Therapy. *Bioconjugate Chemistry*, 33(6), 1210-1221.
69. Khan, J. A., Tao, X. and Tong, L. (2006). Molecular basis for the inhibition of human NMPRTase, a novel target for anticancer agents. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(7), 582-588.
70. Kim, M.-K., Lee, J. H., Kim, H., Park, S. J., Kim, S. H., Kang, G. B., Lee, Y. S., Kim, J. B., Kim, K. K., Suh, S. W. and Eom, S. H. (2006). Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK-866. *Journal of Molecular Biology*, 362(1), 66-77.
71. Velma, G. R., Krider, I. S., Alves, E. T. M., Courey, J. M., Laham, M. S. and Thatcher, G. R. J. (2024). Channeling Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) to Address Life and Death. *Journal of Medicinal Chemistry*, 67(8), 5999-6026.

72. Burgos, E. S., Ho, M.-C., Almo, S. C. and Schramm, V. L. (2009). A phosphoenzyme mimic, overlapping catalytic sites and reaction coordinate motion for human NAMPT. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13748-13753.
73. Lucena-Cacace, A., Otero-Albiol, D., Jimenez-Garcia, M. P., Munoz-Galvan, S. and Carnero, A. (2018). NAMPT Is a Potent Oncogene in Colon Cancer Progression that Modulates Cancer Stem Cell Properties and Resistance to Therapy through Sirt1 and PARP. *Clinical Cancer Research*, 24(5), 1202-1215.
74. Lucena-Cacace, A., Otero-Albiol, D., Jiménez-García, M. P., Peinado-Serrano, J. and Carnero, A. (2017). NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor signature for glioma prognosis. *Oncotarget*, 8(59), 99514-99530.
75. Wang, B., Hasan, M. K., Alvarado, E., Yuan, H., Wu, H. and Chen, W. Y. (2011). NAMPT overexpression in prostate cancer and its contribution to tumor cell survival and stress response. *Oncogene*, 30(8), 907-921.
76. Sawicka-Gutaj, N., Waligórska-Stachura, J., Andrusiewicz, M., Biczysko, M., Sowiński, J., Skrobisz, J. and Ruchała, M. (2015). Nicotinamide phosphorybosyltransferase overexpression in thyroid malignancies and its correlation with tumor stage and with survivin/survivin DEx3 expression. *Tumor Biology*, 36(10), 7859-7863.
77. Maldi, E., Travelli, C., Caldarelli, A., Agazzone, N., Cintura, S., Galli, U., Scatolini, M., Ostano, P., Miglino, B., Chiorino, G., Boldorini, R. and Genazzani, A. A. (2013). Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) is over-expressed in melanoma lesions. *Pigment Cell Melanoma Res*, 26(1), 144-146.
78. Lv, X., Zhang, L., Zhu, Y., Said, H. M., Shi, J. and Xu, G. (2015). Regulative Effect of Nampt on Tumor Progression and Cell Viability in Human Colorectal Cancer. *Journal of Cancer*, 6(9), 849-858.
79. Davis, K., Dunseth, C. D., Mott, S. L., Cramer-Morales, K. L., Miller, A. M., Ear, P. H., Mezhir, J. J., Bellizzi, A. M. and Chan, C. H. F. (2019). Nicotinamide phosphoribosyltransferase expression and clinical outcome of resected stage I/II pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*, 14(3), e0213576.
80. Bi, T.-Q., Che, X.-M., Liao, X.-H., Zhang, D.-J., Long, H.-L., Li, H.-J. and Zhao, W. (2011). Overexpression of Nampt in gastric cancer and chemopotentiating effects of the Nampt inhibitor FK866 in combination with fluorouracil. *Oncology Reports*, 26(5), 1251-1257.
81. Zhou, S. J., Bi, T. Q., Qin, C. X., Yang, X. Q. and Pang, K. (2018). Expression of NAMPT is associated with breast invasive ductal carcinoma development and prognosis. *Oncology Letters*, 15(5), 6648-6654.

82. Shackelford, R. E., Bui, M. M., Coppola, D. and Hakam, A. (2010). Over-expression of nicotinamide phosphoribosyltransferase in ovarian cancers. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(5), 522-527.
83. Vora, M., Ansari, J., Shanti, R. M., Veillon, D., Cotelingam, J., Coppola, D. and Shackelford, R. E. (2016). Increased Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Rhabdomyosarcomas and Leiomyosarcomas Compared to Skeletal and Smooth Muscle Tissue. *Anticancer Research*, 36(2), 503-507.
84. Kozako, T., Aikawa, A., Ohsugi, T., Uchida, Y.-i., Kato, N., Sato, K., Ishitsuka, K., Yoshimitsu, M. and Honda, S.-i. (2019). High expression of NAMPT in adult T-cell leukemia/lymphoma and anti-tumor activity of a NAMPT inhibitor. *European Journal of Pharmacology*, 865, 172738.
85. Wei, Y., Xiang, H. and Zhang, W. (2022). Review of various NAMPT inhibitors for the treatment of cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 970553.
86. Nacarelli, T., Fukumoto, T., Zundell, J. A., Fatkhutdinov, N., Jean, S., Cadungog, M. G., Borowsky, M. E. and Zhang, R. (2020). NAMPT Inhibition Suppresses Cancer Stem-like Cells Associated with Therapy-Induced Senescence in Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 80(4), 890-900.
87. Peterse, E. F. P., van den Akker, B., Niessen, B., Oosting, J., Suijker, J., de Jong, Y., Danen, E. H. J., Cleton-Jansen, A. M. and Bovée, J. (2017). NAD Synthesis Pathway Interference Is a Viable Therapeutic Strategy for Chondrosarcoma. *Molecular Cancer Research*, 15(12), 1714-1721.
88. Grohmann, T., Penke, M., Petzold-Quinque, S., Schuster, S., Richter, S., Kiess, W. and Garten, A. (2018). Inhibition of NAMPT sensitizes MOLT4 leukemia cells for etoposide treatment through the SIRT2-p53 pathway. *Leukemia Research*, 69, 39-46.
89. Pant, K., Richard, S., Peixoto, E., Yin, J., Seelig, D. M., Carotenuto, P., Salati, M., Franco, B., Roberts, L. R. and Gradilone, S. A. (2023). The NAMPT Inhibitor FK866 in Combination with Cisplatin Reduces Cholangiocarcinoma Cells Growth. *Cells*, 12(5)775.
90. Giannetti, A. M., Zheng, X., Skelton, N. J., Wang, W., Bravo, B. J., Bair, K. W., Baumeister, T., Cheng, E., Crocker, L., Feng, Y., Gunzner-Toste, J., Ho, Y.-C., Hua, R., Liederer, B. M., Liu, Y., Ma, X., O'Brien, T., Oeh, J., Sampath, D., Shen, Y., Wang, C., Wang, L., Wu, H., Xiao, Y., Yuen, P.-w., Zak, M., Zhao, G., Zhao, Q. and Dragovich, P. S. (2014). Fragment-Based Identification of Amides Derived from trans-2-(Pyridin-3-yl)cyclopropanecarboxylic Acid as Potent Inhibitors of Human Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(3), 770-792.

91. Olesen, U. H., Christensen, M. K., Björkling, F., Jäätelä, M., Jensen, P. B., Sehested, M. and Nielsen, S. J. (2008). Anticancer agent CHS-828 inhibits cellular synthesis of NAD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(4), 799-804.
92. Binderup, E., Björkling, F., Hjarnaa, P. V., Latini, S., Baltzer, B., Carlsen, M. and Binderup, L. (2005). EB1627: a soluble prodrug of the potent anticancer cyanoguanidine CHS828. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(10), 2491-2494.
93. Zheng, X., Baumeister, T., Buckmelter, A. J., Caligiuri, M., Clodfelter, K. H., Han, B., Ho, Y.-C., Kley, N., Lin, J., Reynolds, D. J., Sharma, G., Smith, C. C., Wang, Z., Dragovich, P. S., Oh, A., Wang, W., Zak, M., Wang, Y., Yuen, P.-w. and Bair, K. W. (2014). Discovery of potent and efficacious cyanoguanidine-containing nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(1), 337-343.
94. Ozgencil, F., Eren, G., Ozkan, Y., Guntekin-Ergun, S. and Cetin-Atalay, R. (2020). Identification of small-molecule urea derivatives as novel NAMPT inhibitors via pharmacophore-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(1), 115217.
95. Zak, M., Yuen, P.-w., Liu, X., Patel, S., Sampath, D., Oeh, J., Liederer, B. M., Wang, W., O'Brien, T., Xiao, Y., Skelton, N., Hua, R., Sodhi, J., Wang, Y., Zhang, L., Zhao, G., Zheng, X., Ho, Y.-C., Bair, K. W. and Dragovich, P. S. (2016). Minimizing CYP2C9 Inhibition of Exposed-Pyridine NAMPT (Nicotinamide Phosphoribosyltransferase) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(18), 8345-8368.
96. Galli, U., Ercolano, E., Carraro, L., Blasi Roman, C. R., Sorba, G., Canonico, P. L., Genazzani, A. A., Tron, G. C. and Billington, R. A. (2008). Synthesis and Biological Evaluation of Isosteric Analogues of FK866, an Inhibitor of NAD Salvage. *ChemMedChem*, 3(5), 771-779.
97. Colombano, G., Travelli, C., Galli, U., Caldarelli, A., Chini, M. G., Canonico, P. L., Sorba, G., Bifulco, G., Tron, G. C. and Genazzani, A. A. (2010). A Novel Potent Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitor Synthesized via Click Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(2), 616-623.
98. Travelli, C., Aprile, S., Mattoteia, D., Colombo, G., Clemente, N., Scanziani, E., Terrazzino, S., Alisi, M. A., Polenzani, L., Groza, G., Genazzani, A. A., Tron, G. C. and Galli, U. (2019). Identification of potent triazolypyridine nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors bearing a 1,2,3-triazole tail group. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 181, 111576.
99. Christensen, M. K., Erichsen, K. D., Olesen, U. H., Tjørnelund, J., Fristrup, P., Thougard, A., Nielsen, S. J., Sehested, M., Jensen, P. B., Loza, E., Kalvinsh, I., Garten, A., Kiess, W. and Björkling, F. (2013). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase

Inhibitors, Design, Preparation, and Structure–Activity Relationship. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(22), 9071-9088.

100. Wilsbacher, J. L., Cheng, M., Cheng, D., Trammell, S. A. J., Shi, Y., Guo, J., Koeniger, S. L., Kovar, P. J., He, Y., Selvaraju, S., Heyman, H. R., Sorensen, B. K., Clark, R. F., Hansen, T. M., Longenecker, K. L., Raich, D., Korepanova, A. V., Cepa, S., Towne, D. L., Abraham, V. C., Tang, H., Richardson, P. L., McLoughlin, S. M., Badagnani, I., Curtin, M. L., Michaelides, M. R., Maag, D., Buchanan, F. G., Chiang, G. G., Gao, W., Rosenberg, S. H., Brenner, C. and Tse, C. (2017). Discovery and Characterization of Novel Nonsubstrate and Substrate NAMPT Inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(7), 1236-1245.
101. Dragovich, P. S., Bair, K. W., Baumeister, T., Ho, Y.-C., Liederer, B. M., Liu, X., Liu, Y., O'Brien, T., Oeh, J., Sampath, D., Skelton, N., Wang, L., Wang, W., Wu, H., Xiao, Y., Yuen, P.-w., Zak, M., Zhang, L. and Zheng, X. (2013). Identification of 2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-c]pyridine-derived ureas as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(17), 4875-4885.
102. Chiang, P.-W., Wang, J., Chen, Y., Fu, Q., Zhong, J., Chen, Y., Yi, X., Wu, R., Gan, H. and Shi, Y. (2012). Exome sequencing identifies NMNAT1 mutations as a cause of Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*, 44(9), 972-974.
103. Tarrant, J. M., Dhawan, P., Singh, J., Zabka, T. S., Clarke, E., DosSantos, G., Dragovich, P. S., Sampath, D., Lin, T., McCray, B., La, N., Nguyen, T., Kauss, A., Dambach, D., Misner, D. L., Diaz, D. and Uppal, H. (2015). Preclinical models of nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitor-mediated hematotoxicity and mitigation by co-treatment with nicotinic acid. *Toxicology Mechanism and Methods*, 25(3), 201-211.
104. O'Brien, T., Oeh, J., Xiao, Y., Liang, X., Vanderbilt, A., Qin, A., Yang, L., Lee, L. B., Ly, J., Cosino, E., LaCap, J. A., Ogasawara, A., Williams, S., Nannini, M., Liederer, B. M., Jackson, P., Dragovich, P. S. and Sampath, D. (2013). Supplementation of nicotinic acid with NAMPT inhibitors results in loss of in vivo efficacy in NAMPT1-deficient tumor models. *Neoplasia*, 15(12), 1314-1329.
105. Olesen, U. H., Petersen, J. G., Garten, A., Kiess, W., Yoshino, J., Imai, S.-I., Christensen, M. K., Fristrup, P., Thougard, A. V., Björkling, F., Jensen, P. B., Nielsen, S. J. and Sehested, M. (2010). Target enzyme mutations are the molecular basis for resistance towards pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase. *BMC Cancer*, 10(1), 677.
106. Zabka, T. S., Singh, J., Dhawan, P., Liederer, B. M., Oeh, J., Kauss, M. A., Xiao, Y., Zak, M., Lin, T. and McCray, B. (2015). Retinal toxicity, in vivo and in vitro, associated with inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Toxicological Sciences*, 144(1), 163-172.

107. Zhao, G., Green, C. F., Hui, Y.-H., Prieto, L., Shepard, R., Dong, S., Wang, T., Tan, B., Gong, X., Kays, L., Johnson, R. L., Wu, W., Bhattachar, S., Del Prado, M., Gillig, J. R., Fernandez, M.-C., Roth, K. D., Buchanan, S., Kuo, M.-S., Geeganage, S. and Burkholder, T. P. (2017). Discovery of a Highly Selective NAMPT Inhibitor That Demonstrates Robust Efficacy and Improved Retinal Toxicity with Nicotinic Acid Coadministration. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(12), 2677-2688.
108. Dragovich, P. S., Zhao, G., Baumeister, T., Bravo, B., Giannetti, A. M., Ho, Y.-C., Hua, R., Li, G., Liang, X., Ma, X., O'Brien, T., Oh, A., Skelton, N. J., Wang, C., Wang, W., Wang, Y., Xiao, Y., Yuen, P.-w., Zak, M., Zhao, Q. and Zheng, X. (2014). Fragment-based design of 3-aminopyridine-derived amides as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(3), 954-962.
109. Xu, T. Y., Zhang, S. L., Dong, G. Q., Liu, X. Z., Wang, X., Lv, X. Q., Qian, Q. J., Zhang, R. Y., Sheng, C. Q. and Miao, C. Y. (2015). Discovery and characterization of novel small-molecule inhibitors targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Scientific Reports*, 5, 10043.
110. Takeuchi, M., Niimi, T., Masumoto, M., Orita, M., Yokota, H. and Yamamoto, T. (2014). Discovery of a novel nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT) inhibitor via in silico screening. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(1), 31-36.
111. Wang, X., Xu, T.-Y., Liu, X.-Z., Zhang, S.-L., Wang, P., Li, Z.-Y., Guan, Y.-F., Wang, S.-N., Dong, G.-Q., Zhuo, S., Le, Y.-Y., Sheng, C.-Q. and Miao, C.-Y. (2015). Discovery of Novel Inhibitors and Fluorescent Probe Targeting NAMPT. *Scientific Reports*, 5(1), 12657.
112. Clark, D. E., Waszkowycz, B., Wong, M., Lockey, P. M., Adalbert, R., Gilley, J., Clark, J. and Coleman, M. P. (2016). Application of virtual screening to the discovery of novel nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors with potential for the treatment of cancer and axonopathies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(12), 2920-2926.
113. Bai, J., Liao, C., Liu, Y., Qin, X., Chen, J., Qiu, Y., Qin, D., Li, Z., Tu, Z.-C. and Jiang, S. (2016). Structure-Based Design of Potent Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitors with Promising in Vitro and in Vivo Antitumor Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(12), 5766-5779.
114. Palacios, D. S., Meredith, E., Kawanami, T., Adams, C., Chen, X., Darsigny, V., Geno, E., Palermo, M., Baird, D., Boynton, G., Busby, S. A., George, E. L., Guy, C., Hewett, J., Tierney, L., Thigale, S., Weihofen, W., Wang, L., White, N., Yin, M. and Argikar, U. A. (2018). Structure based design of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors from a phenotypic screen. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(3), 365-370.
115. Palacios, D. S., Meredith, E. L., Kawanami, T., Adams, C. M., Chen, X., Darsigny, V., Palermo, M., Baird, D., George, E. L., Guy, C., Hewett, J., Tierney, L., Thigale, S., Wang,

- L. and Weihofen, W. A. (2019). Scaffold Morphing Identifies 3-Pyridyl Azetidine Ureas as Inhibitors of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT). *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10(11), 1524-1529.
116. Zhang, K., Ni, Y., Chen, J., Tu, Z., Wu, X., Chen, D., Yao, H. and Jiang, S. (2019). Discovery of trans-3-(pyridin-3-yl)acrylamide-derived sulfamides as potent nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors for the potential treatment of cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(12), 1502-1506.
 117. Korotchikina, L., Kazyulkin, D., Komarov, P. G., Polinsky, A., Andrianova, E. L., Joshi, S., Gupta, M., Vujcic, S., Kononov, E., Toshkov, I., Tian, Y., Krasnov, P., Chernov, M. V., Veith, J., Antoch, M. P., Middlemiss, S., Somers, K., Lock, R. B., Norris, M. D., Henderson, M. J., Haber, M., Chernova, O. B. and Gudkov, A. V. (2020). OT-82, a novel anticancer drug candidate that targets the strong dependence of hematological malignancies on NAD biosynthesis. *Leukemia*, 34(7), 1828-1839.
 118. Wang, W., Elkins, K., Oh, A., Ho, Y.-C., Wu, J., Li, H., Xiao, Y., Kwong, M., Coons, M., Brillantes, B., Cheng, E., Crocker, L., Dragovich, P. S., Sampath, D., Zheng, X., Bair, K. W., O'Brien, T. and Belmont, L. D. (2014). Structural Basis for Resistance to Diverse Classes of NAMPT Inhibitors. *PloS One*, 9(10), e109366.
 119. Guo, J., Lam, L. T., Longenecker, K. L., Bui, M. H., Idler, K. B., Glaser, K. B., Wilsbacher, J. L., Tse, C., Pappano, W. N. and Huang, T.-H. (2017). Identification of novel resistance mechanisms to NAMPT inhibition via the de novo NAD⁺ biosynthesis pathway and NAMPT mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(3), 681-686.
 120. Maleki Vareki, S., Chen, D., Di Cresce, C., Ferguson, P. J., Figueredo, R., Pampillo, M., Rytelowski, M., Vincent, M., Min, W., Zheng, X. and Koropatnick, J. (2015). IDO Downregulation Induces Sensitivity to Pemetrexed, Gemcitabine, FK866, and Methoxyamine in Human Cancer Cells. *PloS One*, 10(11), e0143435.
 121. Chan, D. A., Sutphin, P. D., Nguyen, P., Turcotte, S., Lai, E. W., Banh, A., Reynolds, G. E., Chi, J.-T., Wu, J., Solow-Cordero, D. E., Bonnet, M., Flanagan, J. U., Bouley, D. M., Graves, E. E., Denny, W. A., Hay, M. P. and Giaccia, A. J. (2011). Targeting GLUT1 and the Warburg Effect in Renal Cell Carcinoma by Chemical Synthetic Lethality. *Science Translational Medicine*, 3(94), 94ra70-94ra70.
 122. Kraus, D., Reckenbeil, J., Veit, N., Kuerpig, S., Meisenheimer, M., Beier, I., Stark, H., Winter, J. and Probstmeier, R. (2018). Targeting glucose transport and the NAD pathway in tumor cells with STF-31: a re-evaluation. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 41(5), 485-494.
 123. Arias-Romero, L. E. and Chernoff, J. (2008). A tale of two Paks. *Biology of the Cell*, 100(2), 97-108.

124. Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.-s. and Lim, L. (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*, 367(6458), 40-46.
125. Rane, C. K. and Minden, A. (2019). P21 activated kinase signaling in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 54, 40-49.
126. Wong, L., Chen, N., Karantza, V. and Minden, A. (2013). The Pak4 protein kinase is required for oncogenic transformation of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncogenesis*, 2(6), e50-e50.
127. Ahn, H. K., Jang, J., Lee, J., Se, H. P., Park, J. O., Park, Y. S., Lim, H. Y., Kim, K.-M. and Kang, W. K. (2011). P21-activated kinase 4 overexpression in metastatic gastric cancer patients. *Translational Oncology*, 4(6), 345-349.
128. Park, M., Lee, H., Lee, C., You, S., Kim, D., Park, B., Kang, M., Heo, W. D., Shin, E. and Schwartz, M. (2013). p21-Activated kinase 4 promotes prostate cancer progression through CREB. *Oncogene*, 32(19), 2475-2482.
129. Cai, S., Ye, Z., Wang, X., Pan, Y., Weng, Y., Lao, S., Wei, H. and Li, L. (2015). Overexpression of P21-activated kinase 4 is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer and promotes migration and invasion. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34(1), 1-10.
130. Baloglu, E., Golan, G., Kalid, O., Landesman, Y., Mccauley, D., Senapedis, W., Shacham, S., Shechter, S., (2015). Substituted benzofuranyl and benzoxazolyl compounds and uses thereof (US Patent No. PCT/US2014/045479).
131. Abu Aboud, O., Chen, C.-H., Senapedis, W., Baloglu, E., Argueta, C. and Weiss, R. H. (2016). Dual and Specific Inhibition of NAMPT and PAK4 By KPT-9274 Decreases Kidney Cancer Growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(9), 2119-2129.
132. Neggers, J. E., Kwanten, B., Dierckx, T., Noguchi, H., Voet, A., Bral, L., Minner, K., Massant, B., Kint, N., Delforge, M., Vercruysse, T., Baloglu, E., Senapedis, W., Jacquemyn, M. and Daelemans, D. (2018). Target identification of small molecules using large-scale CRISPR-Cas mutagenesis scanning of essential genes. *Nature Communications*, 9(1), 502.
133. Aboukameel, A., Muqbil, I., Senapedis, W., Baloglu, E., Landesman, Y., Shacham, S., Kauffman, M., Philip, P. A., Mohammad, R. M. and Azmi, A. S. (2017). Novel p21-Activated Kinase 4 (PAK4) Allosteric Modulators Overcome Drug Resistance and Stemness in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(1), 76-87.
134. Kuo, M. H. and Allis, C. D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 20(8), 615-626.

135. Smith, B. C. and Denu, J. M. (2009). Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1789(1), 45-57.
136. Seto, E. and Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4), a018713.
137. Li, Y. and Seto, E. (2016). HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10), a026831.
138. Ververis, K., Hiong, A., Karagiannis, T. C. and Licciardi, P. V. (2013). Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents. *Biologics*, 7, 47-60.
139. Shah, R. R. (2019). Safety and Tolerability of Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors in Oncology. *Drug Safety*, 42(2), 235-245.
140. Peng, X., Sun, Z., Kuang, P. and Chen, J. (2020). Recent progress on HDAC inhibitors with dual targeting capabilities for cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, 112831.
141. Cea, M., Soncini, D., Fruscione, F., Raffaghello, L., Garuti, A., Emionite, L., Moran, E., Magnone, M., Zoppoli, G., Reverberi, D., Caffa, I., Salis, A., Cagnetta, A., Bergamaschi, M., Casciaro, S., Pierri, I., Damonte, G., Ansaldi, F., Gobbi, M., Pistoia, V., Ballestrero, A., Patrone, F., Bruzzzone, S. and Nencioni, A. (2011). Synergistic interactions between HDAC and sirtuin inhibitors in human leukemia cells. *PLoS One*, 6(7), e22739.
142. Dong, G., Chen, W., Wang, X., Yang, X., Xu, T., Wang, P., Zhang, W., Rao, Y., Miao, C. and Sheng, C. (2017). Small Molecule Inhibitors Simultaneously Targeting Cancer Metabolism and Epigenetics: Discovery of Novel Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) and Histone Deacetylase (HDAC) Dual Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(19), 7965-7983.
143. Chen, W., Dong, G., Wu, Y., Zhang, W., Miao, C. and Sheng, C. (2018). Dual NAMPT/HDAC Inhibitors as a New Strategy for Multitargeting Antitumor Drug Discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9(1), 34-38.
144. McClure, J. J., Zhang, C., Inks, E. S., Peterson, Y. K., Li, J. and Chou, C. J. (2016). Development of Allosteric Hydrazide-Containing Class I Histone Deacetylase Inhibitors for Use in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(21), 9942-9959.
145. Yue, K., Sun, S., Liu, E., Liu, J., Hou, B., Qi, K., Chou, C. J., Jiang, Y. and Li, X. (2024). HDAC/NAMPT dual inhibitors overcome initial drug-resistance in p53-null leukemia cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 266, 116127.

146. Chunquan, S., Baoli, L., Guoqiang, D. (2017). *NAMPT/HDAC dual-target inhibitor and preparation method thereof* (China Patent No. CN106916101B).
147. Wu, Y., Wang, L., Huang, Y., Chen, S., Wu, S., Dong, G. and Sheng, C. (2020). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Is a New Target of Antitumor Agent Chidamide. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(1), 40-44.
148. Shibuya, M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*, 2(12), 1097-1105.
149. Wu, P., Nielsen, T. E. and Clausen, M. H. (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), 422-439.
150. Itatani, Y., Kawada, K., Yamamoto, T. and Sakai, Y. (2018). Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer: Alterations to Anti-VEGF Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1232.
151. Al-Sanea, M. M., Chilingaryan, G., Abelyan, N., Sargsyan, A., Hovhannisyan, S., Gasparyan, H., Gevorgyan, S., Albogami, S., Ghoneim, M. M., Farag, A. K., Mohamed, A. A. B. and El-Damasy, A. K. (2021). Identification of Novel Potential VEGFR-2 Inhibitors Using a Combination of Computational Methods for Drug Discovery. *Life (Basel)*, 11(10), 1070.
152. Zhang, K., Sheng, J., Zhang, W., Zhang, W., Yin, Y. (2020). *Biphenyl urea compound as well as pharmaceutical composition, preparation method and application thereof* (China Patent No. CN111848506A).
153. Wieduwilt, M. J. and Moasser, M. M. (2008). The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(10), 1566-1584.
154. Tan, L., Zhang, J., Wang, Y., Wang, X., Wang, Y., Zhang, Z., Shuai, W., Wang, G., Chen, J., Wang, C., Ouyang, L. and Li, W. (2022). Development of Dual Inhibitors Targeting Epidermal Growth Factor Receptor in Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(7), 5149-5183.
155. Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. and Haber, D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(3), 169-181.
156. Mitsudomi, T. and Yatabe, Y. (2010). Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS Journal*, 277(2), 301-308.
157. Chung, C. H., Zhang, Q., Hammond, E. M., Trotti, A. M., 3rd, Wang, H., Spencer, S., Zhang, H. Z., Cooper, J., Jordan, R., Rotman, M. H. and Ang, K. K. (2011). Integrating epidermal growth factor receptor assay with clinical parameters improves risk

- classification for relapse and survival in head-and-neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 81(2), 331-338.
158. Hirsch, F. R., Varella-Garcia, M., Bunn, P. A. J., Di Maria, M. V., Veve, R., Bremmes, R. M., Barón, A. E., Zeng, C. and Franklin, W. A. (2003). Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 21(20), 3798-3807.
 159. Lee, H. J., Seo, A. N., Kim, E. J., Jang, M. H., Kim, Y. J., Kim, J. H., Kim, S. W., Ryu, H. S., Park, I. A., Im, S. A., Gong, G., Jung, K. H., Kim, H. J. and Park, S. Y. (2015). Prognostic and predictive values of EGFR overexpression and EGFR copy number alteration in HER2-positive breast cancer. *British Journal of Cancer*, 112(1), 103-111.
 160. Neal, D. E., Sharples, L., Smith, K., Fennelly, J., Hall, R. R. and Harris, A. L. (1990). The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer*, 65(7), 1619-1625.
 161. Psyrri, A., Kassab, M., Yu, Z., Bamias, A., Weinberger, P. M., Markakis, S., Kowalski, D., Camp, R. L., Rimm, D. L. and Dimopoulos, M. A. (2005). Effect of epidermal growth factor receptor expression level on survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(24 Pt 1), 8637-8643.
 162. Zubair, T. and Bandyopadhyay, D. (2023). Small Molecule EGFR Inhibitors as Anti-Cancer Agents: Discovery, Mechanisms of Action, and Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2651.
 163. Pao, W., Miller, V. A., Politi, K. A., Riely, G. J., Somwar, R., Zakowski, M. F., Kris, M. G. and Varmus, H. (2005). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Medicine*, 2(3), e73.
 164. Kobayashi, S., Boggon, T. J., Dayaram, T., Jänne, P. A., Kocher, O., Meyerson, M., Johnson, B. E., Eck, M. J., Tenen, D. G. and Halmos, B. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, 352(8), 786-792.
 165. Yu, H. A. and Riely, G. J. (2013). Second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancers. *National Comprehensive Cancer Network*, 11(2), 161-169.
 166. Zhang, W., Zhang, K., Yao, Y., Liu, Y., Ni, Y., Liao, C., Tu, Z., Qiu, Y., Wang, D., Chen, D., Qiang, L., Li, Z. and Jiang, S. (2021). Dual nicotinamide phosphoribosyltransferase and epidermal growth factor receptor inhibitors for the treatment of cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 211, 113022.

167. Du, X., Yang, B., An, Q., Assaraf, Y. G., Cao, X. and Xia, J. (2021). Acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs and emerging next-generation EGFR inhibitors. *Innovation*, 2(2), 100103.
168. Westover, D., Zugazagoitia, J., Cho, B. C., Lovly, C. M. and Paz-Ares, L. (2018). Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Annals of Oncology*, 29(suppl_1), i10-i19.
169. Ding, M., Shen, Q., Lu, W. and Zhu, S. (2023). Synthesis, and biological evaluation of EGFR/HER2-NAMPT conjugates for tumor treatment. *Molecular Diversity*, 28(4), 2617-2636.
170. Okumura, S., Sasaki, T., Minami, Y. and Ohsaki, Y. (2012). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase: A Potent Therapeutic Target in Non-small Cell Lung Cancer with Epidermal Growth Factor Receptor-Gene Mutation. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(1), 49-56.
171. Tang, K., Wu, Y.-H., Song, Y. and Yu, B. (2021). Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors in clinical trials for cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), 68.
172. Lewis-Ballester, A., Pham, K. N., Batabyal, D., Karkashon, S., Bonanno, J. B., Poulos, T. L. and Yeh, S.-R. (2017). Structural insights into substrate and inhibitor binding sites in human indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Nature Communications*, 8(1), 1693.
173. Zhai, L., Bell, A., Ladomersky, E., Lauing, K. L., Bollu, L., Sosman, J. A., Zhang, B., Wu, J. D., Miller, S. D., Meeks, J. J., Lukas, R. V., Wyatt, E., Doglio, L., Schiltz, G. E., McCusker, R. H. and Wainwright, D. A. (2020). Immunosuppressive IDO in Cancer: Mechanisms of Action, Animal Models, and Targeting Strategies. *Frontiers in Immunology*, 11, 1185.
174. Levina, V., Su, Y. and Gorelik, E. (2012). Immunological and nonimmunological effects of indoleamine 2,3-dioxygenase on breast tumor growth and spontaneous metastasis formation. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012(1), 173029.
175. Brandacher, G., Perathoner, A., Ladurner, R., Schneeberger, S., Obrist, P., Winkler, C., Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., Weiss, H. G., Gvðbel, G., Margreiter, R., Kvðnigsrainer, A., Fuchs, D. and Amberger, A. (2006). Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clinical Cancer Research*, 12(4), 1144-1151.
176. Kiyozumi, Y., Baba, Y., Okadome, K., Yagi, T., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., Miyamoto, Y., Yoshida, N., Watanabe, M., Komohara, Y. and Baba, H. (2019). IDO1 Expression Is Associated With Immune Tolerance and Poor Prognosis in Patients With Surgically Resected Esophageal Cancer. *Annals of Surgery*, 269(6), 1101-1108.

177. Liu, M., Wang, X., Wang, L., Ma, X., Gong, Z., Zhang, S. and Li, Y. (2018). Targeting the IDO1 pathway in cancer: from bench to bedside. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), 100.
178. Wang, K., Ye, K., Zhang, X., Wang, T., Qi, Z., Wang, Y., Jiang, S. and Zhang, K. (2023). Dual Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) and Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitors for the Treatment of Drug-Resistant Non-small-Cell Lung Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(1), 1027-1047.
179. Zhang, K., Chen, D., Ma, K., Wu, X., Hao, H. and Jiang, S. (2018). NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) as a Therapeutic and Diagnostic Target in Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(16), 6983-7003.
180. Dinkova-Kostova, A. T. and Talalay, P. (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 116-123.
181. Kahanda, D., Chakrabarti, G., McWilliams, M. A., Boothman, D. A. and Slinker, J. D. (2016). Using DNA devices to track anticancer drug activity. *Biosensors and Bioelectronics*, 80, 647-653.
182. Parkinson, E. I., Bair, J. S., Cismesia, M. and Hergenrother, P. J. (2013). Efficient NQO1 Substrates are Potent and Selective Anticancer Agents. *ACS Chemical Biology*, 8(10), 2173-2183.
183. Oh, E.-T. and Park, H. J. (2015). Implications of NQO1 in cancer therapy. *BMB Reports*, 48(11), 609-617.
184. Zhang, K., Wang, K., Zhang, X., Qian, Z., Zhang, W., Zheng, X., Wang, J., Jiang, Y., Zhang, W., Lu, Z., Hao, H. and Jiang, S. (2022). Discovery of Small Molecules Simultaneously Targeting NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 and Nicotinamide Phosphoribosyltransferase: Treatment of Drug-Resistant Non-small-Cell Lung Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(11), 7746-7769.
185. Ross, D. and Siegel, D. (2021). The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. *Redox Biology*, 41, 101950.
186. Liu, F., Yu, G., Wang, G., Liu, H., Wu, X., Wang, Q., Liu, M., Liao, K., Wu, M., Cheng, X. and Hao, H. (2012). An NQO1-initiated and p53-independent apoptotic pathway determines the anti-tumor effect of tanshinone IIA against non-small cell lung cancer. *PLoS One*, 7(7), e42138.
187. Song, J., Zou, G., Zhao, Z., Zhu, Y., Xue, J., Ao, L., Sun, H., Hao, H., Zhang, B. and Xu, X. (2024). Discovery of proquodine A derivatives with antitumor activity targeting

- NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 22(1), 75-88.
188. McBride, O. W., Swan, D. C., Tronick, S. R., Gol, R., Klimanis, D., Moore, D. E. and Aaronson, S. A. (1983). Regional chromosomal localization of N-ras, K-ras-1, K-ras-2 and myb oncogenes in human cells. *Nucleic Acids Research*, 11(23), 8221-8236.
 189. Ferreira, A., Pereira, F., Reis, C., Oliveira, M. J., Sousa, M. J. and Preto, A. (2022). Crucial Role of Oncogenic KRAS Mutations in Apoptosis and Autophagy Regulation: *Therapeutic Implications*. *Cells*, 11(14).
 190. Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(1), 11-22.
 191. Kolch, W., Berta, D. and Rosta, E. (2023). Dynamic regulation of RAS and RAS signaling. *Biochemical Journal*, 480(1), 1-23.
 192. Zhang, Z., Zhang, H., Liao, X. and Tsai, H.-i. (2023). KRAS mutation: the booster of pancreatic ductal adenocarcinoma transformation and progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1147676.
 193. Huang, L., Guo, Z., Wang, F. and Fu, L. (2021). KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 386.
 194. Yun, J., Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Rajagopalan, H., Schmidt, K., Willson, J. K., Markowitz, S., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr., Velculescu, V. E., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Papadopoulos, N. (2009). Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science*, 325(5947), 1555-1559.
 195. Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J. W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J. L., Yan, H., Wang, W., Chen, S., Viale, A., Zheng, H., Paik, J. H., Lim, C., Guimaraes, A. R., Martin, E. S., Chang, J., Hezel, A. F., Perry, S. R., Hu, J., Gan, B., Xiao, Y., Asara, J. M., Weissleder, R., Wang, Y. A., Chin, L., Cantley, L. C. and DePinho, R. A. (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149(3), 656-670.
 196. Liu, Y. H., Hu, C. M., Hsu, Y. S. and Lee, W. H. (2022). Interplays of glucose metabolism and KRAS mutation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death and Disease*, 13(9), 817.
 197. Nong, S., Han, X., Xiang, Y., Qian, Y., Wei, Y., Zhang, T., Tian, K., Shen, K., Yang, J. and Ma, X. (2023). Metabolic reprogramming in cancer: Mechanisms and therapeutics. *MedComm*, 4(2), e218.
 198. Zimmerman, G. and Soreq, H. (2006). Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 655-669.

199. Chandra, A., Grecco, H. E., Pisupati, V., Perera, D., Cassidy, L., Skoulidis, F., Ismail, S. A., Hedberg, C., Hanzal-Bayer, M., Venkitaraman, A. R., Wittinghofer, A. and Bastiaens, P. I. H. (2012). The GDI-like solubilizing factor PDE δ sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nature Cell Biology*, 14(2), 148-158.
200. Chen, L., Zhang, J., Wang, X., Li, Y., Zhou, L., Lu, X., Dong, G. and Sheng, C. (2022). Discovery of novel KRAS–PDE δ inhibitors with potent activity in patient-derived human pancreatic tumor xenograft models. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(1), 274-290.
201. Xie, X., Yu, T., Li, X., Zhang, N., Foster, L. J., Peng, C., Huang, W. and He, G. (2023). Recent advances in targeting the “undruggable” proteins: from drug discovery to clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 335.
202. Dong, G., Sheng, C., Chen, Z. (2023). *Compound used as NAMPT-PDEdelta double-target inhibitor and application thereof* (China Patent No. CN116589402A).
203. Povirk, L. F. and Shuker, D. E. (1994). DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutation Research*, 318(3), 205-226.
204. Ditsworth, D., Zong, W.-X. and Thompson, C. B. (2007). Activation of Poly(ADP)-ribose Polymerase (PARP-1) Induces Release of the Pro-inflammatory Mediator HMGB1 from the Nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17845-17854.
205. Singh, R. K., Kumar, S., Prasad, D. N. and Bhardwaj, T. R. (2018). Therapeutic journey of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: Historic to future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 151, 401-433.
206. Costa, B. A., Mouhieddine, T. H., Ortiz, R. J. and Richter, J. (2023). Revisiting the role of alkylating agents in multiple myeloma: Up-to-date evidence and future perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 187, 104040.
207. Chen, Y., Jia, Y., Song, W. and Zhang, L. (2018). Therapeutic Potential of Nitrogen Mustard Based Hybrid Molecules. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1453.
208. Fu, Y., Huang, Y., Zhou, C., Li, X., Dong, G., Huang, M., Ding, J. and Sheng, C. (2023). Discovery of Dual Function Agents That Exhibit Anticancer Activity via Catastrophic Nicotinamide Adenine Dinucleotide Depletion. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(24), 16694-16703.
209. Tian, W., Zhang, W., Wang, Y., Jin, R., Wang, Y., Guo, H., Tang, Y. and Yao, X. (2022). Recent advances of IDH1 mutant inhibitor in cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 982424.

210. Zarei, M., Hue, J. J., Hajihassani, O., Graor, H. J., Katayama, E. S., Loftus, A. W., Bajor, D., Rothermel, L. D., Vaziri-Gohar, A. and Winter, J. M. (2022). Clinical development of IDH1 inhibitors for cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 103, 102334.
211. Ma, T., Zou, F., Pusch, S., Xu, Y., von Deimling, A. and Zha, X. (2018). Inhibitors of Mutant Isocitrate Dehydrogenases 1 and 2 (mIDH1/2): An Update and Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(20), 8981-9003.
212. Jakob, C. G., Upadhyay, A. K., Donner, P. L., Nicholl, E., Addo, S. N., Qiu, W., Ling, C., Gopalakrishnan, S. M., Torrent, M., Cepa, S. P., Shanley, J., Shoemaker, A. R., Sun, C. C., Vasudevan, A., Woller, K. R., Shotwell, J. B., Shaw, B., Bian, Z. and Hutti, J. E. (2018). Novel Modes of Inhibition of Wild-Type Isocitrate Dehydrogenase 1 (IDH1): Direct Covalent Modification of His315. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(15), 6647-6657.
213. Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B. and Bigner, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *New England Journal of Medicine*, 360(8), 765-773.
214. Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Jr., Hartigan, J., Smith, D. R., Strausberg, R. L., Marie, S. K., Shinjo, S. M., Yan, H., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E. and Kinzler, K. W. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321(5897), 1807-1812.
215. Mardis, E. R., Ding, L., Dooling, D. J., Larson, D. E., McLellan, M. D., Chen, K., Koboldt, D. C., Fulton, R. S., Delehaanty, K. D., McGrath, S. D., Fulton, L. A., Locke, D. P., Magrini, V. J., Abbott, R. M., Vickery, T. L., Reed, J. S., Robinson, J. S., Wylie, T., Smith, S. M., Carmichael, L., Eldred, J. M., Harris, C. C., Walker, J., Peck, J. B., Du, F., Dukes, A. F., Sanderson, G. E., Brummett, A. M., Clark, E., McMichael, J. F., Meyer, R. J., Schindler, J. K., Pohl, C. S., Wallis, J. W., Shi, X., Lin, L., Schmidt, H., Tang, Y., Haipiek, C., Wiechert, M. E., Ivy, J. V., Kalicki, J., Elliott, G., Ries, R. E., Payton, J. E., Westervelt, P., Tomasson, M. H., Watson, M. A., Baty, J., Heath, S., Shannon, W. D., Nagarajan, R., Link, D. C., Walter, M. J., Graubert, T. A., DiPersio, J. F., Wilson, R. K. and Ley, T. J. (2009). Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *New England Journal of Medicine*, 361(11), 1058-1066.
216. Borger, D. R., Tanabe, K. K., Fan, K. C., Lopez, H. U., Fantin, V. R., Straley, K. S., Schenkein, D. P., Hezel, A. F., Ancukiewicz, M., Liebman, H. M., Kwak, E. L., Clark, J. W., Ryan, D. P., Deshpande, V., Dias-Santagata, D., Ellisen, L. W., Zhu, A. X. and Iafrate, A. J. (2012). Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *Oncologist*, 17(1), 72-79.

217. Mohammad, N., Wong, D., Lum, A., Lin, J., Ho, J., Lee, C. H. and Yip, S. (2020). Characterisation of isocitrate dehydrogenase 1/isocitrate dehydrogenase 2 gene mutation and the d-2-hydroxyglutarate oncometabolite level in dedifferentiated chondrosarcoma. *Histopathology*, 76(5), 722-730.
218. Popovici-Muller, J., Saunders, J. O., Salituro, F. G., Travins, J. M., Yan, S., Zhao, F., Gross, S., Dang, L., Yen, K. E., Yang, H., Straley, K. S., Jin, S., Kunii, K., Fantin, V. R., Zhang, S., Pan, Q., Shi, D., Biller, S. A. and Su, S. M. (2012). Discovery of the First Potent Inhibitors of Mutant IDH1 That Lower Tumor 2-HG in Vivo. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3(10), 850-855.
219. Dhillon, S. (2018). Ivosidenib: First Global Approval. *Drugs*, 78(14), 1509-1516.
220. Kang, C. (2023). Olutasidenib: First Approval. *Drugs*, 83(4), 341-346.
221. Curtin, N. J. and Szabo, C. (2020). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(10), 711-736.
222. Wang, Y. Q., Wang, P. Y., Wang, Y. T., Yang, G. F., Zhang, A. and Miao, Z. H. (2016). An Update on Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors: Opportunities and Challenges in Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(21), 9575-9598.
223. Zhao, Y., Zhang, L. X., Jiang, T., Long, J., Ma, Z. Y., Lu, A. P., Cheng, Y. and Cao, D. S. (2020). The ups and downs of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 inhibitors in cancer therapy-Current progress and future direction. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 203, 112570.
224. Robson, M., Im, S. A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S. and Conte, P. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 523-533.
225. Martínez-Morcillo, F. J., Cantón-Sandoval, J., Martínez-Navarro, F. J., Cabas, I., Martínez-Vicente, I., Armistead, J., Hatzold, J., López-Muñoz, A., Martínez-Menchón, T., Corbalán-Vélez, R., Lacal, J., Hammerschmidt, M., García-Borrón, J. C., García-Ayala, A., Cayuela, M. L., Pérez-Oliva, A. B., García-Moreno, D. and Mulero, V. (2021). NAMPT-derived NAD⁺ fuels PARP1 to promote skin inflammation through parthanatos cell death. *PLoS Biology*, 19(11), e3001455.
226. Bajrami, I., Kigozi, A., Van Weverwijk, A., Brough, R., Frankum, J., Lord, C. J. and Ashworth, A. (2012). Synthetic lethality of PARP and NAMPT inhibition in triple-negative breast cancer cells. *EMBO Molecular Medicine*, 4(10), 1087-1096.
227. Heske, C. M., Davis, M. I., Baumgart, J. T., Wilson, K., Gormally, M. V., Chen, L., Zhang, X., Ceribelli, M., Duveau, D. Y., Guha, R., Ferrer, M., Arnaldez, F. I., Ji, J., Tran, H. L.,

- Zhang, Y., Mendoza, A., Helman, L. J. and Thomas, C. J. (2017). Matrix Screen Identifies Synergistic Combination of PARP Inhibitors and Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibitors in Ewing Sarcoma. *Clinical Cancer Research*, 23(23), 7301-7311.
228. Sauriol, S. A., Carmona, E., Udaskin, M. L., Radulovich, N., Leclerc-Desaulniers, K., Rottapel, R., Oza, A. M., Lheureux, S., Provencher, D. M. and Mes-Masson, A.-M. (2023). Inhibition of nicotinamide dinucleotide salvage pathway counters acquired and intrinsic poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor resistance in high-grade serous ovarian cancer. *Scientific Reports*, 13(1), 3334.
229. Mao, J., Wang, K., Tong, J., Zhang, W., Shen, G., Wang, D., Liao, Z., Zhang, Z., Miao, Q., Jiang, S. and Zhang, K. (2025). Discovery of dual PARP/NAMPT inhibitors for the treatment of BRCA wild-type triple-negative breast cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 120, 130117.
230. Sheng, J., Zhang, K., Liao, J., Wang, D. Ni, Y., Wang, Y., Zhang, X. (2021). *Phthalazinone compound as well as preparation method and medical application thereof* (China Patent No. CN113788827A).
231. Li, Y., Kong, X., Chu, X., Fu, H., Feng, X., Zhao, C., Deng, Y. and Ge, J. (2024). Targeting NAD Metabolism: Rational Design, Synthesis and In Vitro Evaluation of NAMPT/PARP1 Dual-Target Inhibitors as Anti-Breast Cancer Agents. *Molecules*, 29(12), 2836.
232. Wu, S. Y. and Chiang, C. M. (2007). The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13141-13145.
233. Donati, B., Lorenzini, E. and Ciarrocchi, A. (2018). BRD4 and Cancer: going beyond transcriptional regulation. *Molecular Cancer*, 17(1), 164.
234. Singh, V. V. and Alauddin, S. (2023). Review on: BRD4 inhibitors for anticancer research. *Human Gene*, 37, 201196.
235. Hishiki, K., Akiyama, M., Kanegae, Y., Ozaki, K., Ohta, M., Tsuchitani, E., Kaito, K. and Yamada, H. (2018). NF- κ B signaling activation via increases in BRD2 and BRD4 confers resistance to the bromodomain inhibitor I-BET151 in U937 cells. *Leukemia Research*, 74, 57-63.
236. Rathert, P., Roth, M., Neumann, T., Muerdter, F., Roe, J.-S., Muhar, M., Deswal, S., Cerny-Reiterer, S., Peter, B., Jude, J., Hoffmann, T., Boryń, Ł. M., Axelsson, E., Schweifer, N., Tontsch-Grunt, U., Dow, L. E., Gianni, D., Pearson, M., Valent, P., Stark, A., Kraut, N., Vakoc, C. R. and Zuber, J. (2015). Transcriptional plasticity promotes primary and acquired resistance to BET inhibition. *Nature*, 525(7570), 543-547.

237. Chedere, A., Mishra, M., Kulkarni, O., Sriraman, S. and Chandra, N. (2022). Personalized quantitative models of NAD metabolism in hepatocellular carcinoma identify a subgroup with poor prognosis. *Frontiers in Oncology*, 12, 954512.
238. Yin, C., Jia, S., Yang, X. and Wu, L. (2024). Discovery of potent and novel dual NAMPT/BRD4 inhibitors for efficient treatment of hepatocellular carcinoma. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 271, 116444.
239. Ai, L., Chen, J., Yan, H., He, Q., Luo, P., Xu, Z. and Yang, X. (2020). Research Status and Outlook of PD-1/PD-L1 Inhibitors for Cancer Therapy. *Drug Design Development and Therapy* 14, 3625-3649.
240. Vesely, M. D., Zhang, T. and Chen, L. (2022). Resistance Mechanisms to Anti-PD Cancer Immunotherapy. *Annual Review of Immunology*, 40, 45-74.
241. Lv, H., Lv, G., Chen, C., Zong, Q., Jiang, G., Ye, D., Cui, X., He, Y., Xiang, W., Han, Q., Tang, L., Yang, W. and Wang, H. (2021). NAD(+) Metabolism Maintains Inducible PD-L1 Expression to Drive Tumor Immune Evasion. *Cell Metabolism*, 33(1), 110-127.e115.
242. Yang, Y., Li, Z., Wang, Y., Gao, J., Meng, Y., Wang, S., Zhao, X., Tang, C., Yang, W., Li, Y., Bao, J., Fan, X., Tang, J., Yang, J., Wu, C., Qin, M. and Wang, L. (2024). The regulatory relationship between NAMPT and PD-L1 in cancer and identification of a dual-targeting inhibitor. *EMBO Molecular Medicine*, 16(4), 885-903.
243. Lv, J., Cheng, B. and Song, C. (2025). Rational design of NAMPT-based dual inhibitors with improved drug-like and pharmacokinetic properties for cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 297, 117966.
244. Klar, A. J., Fogel, S. and Macleod, K. (1979). MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics*, 93(1), 37-50.
245. Rine, J., Strathern, J. N., Hicks, J. B. and Herskowitz, I. (1979). A suppressor of mating-type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for and identification of cryptic mating-type loci. *Genetics*, 93(4), 877-901.
246. Gottlieb, S. and Esposito, R. E. (1989). A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell*, 56(5), 771-776.
247. Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D. and Broach, J. R. (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes & Development*, 7(4), 592-604.
248. Aparicio, O. M., Billington, B. L. and Gottschling, D. E. (1991). Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell*, 66(6), 1279-1287.

249. Michan, S. and Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *The Biochemical Journal*, 404(1), 1-13.
250. Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L. and Boeke, J. D. (1995). The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes & Development*, 9(23), 2888-2902.
251. Kaeberlein, M., McVey, M. and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & Development*, 13(19), 2570-2580.
252. Sinclair, D. A. and Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell*, 91(7), 1033-1042.
253. Frye, R. A. (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 260(1), 273-279.
254. Imai, S.-i., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403(6771), 795-800.
255. Bordo, D. (2013). Structure and Evolution of Human Sirtuins. *Current Drug Targets*, 14(6), 662-665.
256. Houtkooper, R. H., Pirinen, E. and Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 225-238.
257. Saunders, L. R. and Verdin, E. (2007). Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, 26(37), 5489-5504.
258. Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K. and Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9), 6823-6832.
259. Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L. and Weinberg, R. A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 107(2), 149-159.
260. Haigis, M. C. and Sinclair, D. A. (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5, 253-295.
261. Srivastava, S. and Haigis, M. C. (2011). Role of sirtuins and calorie restriction in neuroprotection: implications in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 17(31), 3418-3433.

262. Yang, Y., Liu, Y., Wang, Y., Chao, Y., Zhang, J., Jia, Y., Tie, J. and Hu, D. (2022). Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 13, 831168.
263. Sung, J. Y., Kim, S. G., Kim, J. R. and Choi, H. C. (2021). SIRT1 suppresses cellular senescence and inflammatory cytokine release in human dermal fibroblasts by promoting the deacetylation of NF- κ B and activating autophagy. *Experimental Gerontology*, 150, 111394.
264. Rodriguez, R. M., Fernandez, A. F. and Fraga, M. F. (2013). Role of sirtuins in stem cell differentiation. *Genes & Cancer*, 4(3-4), 105-111.
265. Vaquero, A., Scher, M. B., Lee, D. H., Sutton, A., Cheng, H.-L., Alt, F. W., Serrano, L., Sternglanz, R. and Reinberg, D. (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes & Development*, 20(10), 1256-1261.
266. Penteado, A. B., Hassanie, H., Gomes, R. A., Silva Emery, F. d. and Goulart Trossini, G. H. (2023). Human Sirtuin 2 inhibitors, Their Mechanisms and Binding Modes. *Future Medicinal Chemistry*, 15(3), 291-311.
267. North, B. J. and Verdin, E. (2007). Mitotic Regulation of SIRT2 by Cyclin-dependent Kinase 1-dependent Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19546-19555.
268. Peck, B., Chen, C.-Y., Ho, K.-K., Di Fruscia, P., Myatt, S. S., Coombes, R. C., Fuchter, M. J., Hsiao, C.-D. and Lam, E. W.-F. (2010). SIRT Inhibitors Induce Cell Death and p53 Acetylation through Targeting Both SIRT1 and SIRT2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(4), 844-855.
269. Wang, Y., Yang, J., Hong, T., Chen, X. and Cui, L. (2019). SIRT2: Controversy and multiple roles in disease and physiology. *Ageing Research Reviews*, 55, 1-15.
270. Zhang, J., Xiang, H., Liu, J., Chen, Y., He, R. R. and Liu, B. (2020). Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics*, 10(18), 8315-8342.
271. Tomaselli, D., Steegborn, C., Mai, A. and Rotili, D. (2020). Sirt4: A Multifaceted Enzyme at the Crossroads of Mitochondrial Metabolism and Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 474.
272. Fabbrizi, E., Fiorentino, F., Carafa, V., Altucci, L., Mai, A. and Rotili, D. (2023). Emerging Roles of SIRT5 in Metabolism, Cancer, and SARS-CoV-2 Infection. *Cells*, 12(6), 852.
273. Du, J., Zhou, Y., Su, X., Yu, J. J., Khan, S., Jiang, H., Kim, J., Woo, J., Kim, J. H., Choi, B. H., He, B., Chen, W., Zhang, S., Cerione, R. A., Auwerx, J., Hao, Q. and Lin, H. (2011).

- Sirt5 Is a NAD-Dependent Protein Lysine Demalonylase and Desuccinylase. *Science*, 334(6057), 806.
274. Beauharnois, J. M., Bolívar, B. E. and Welch, J. T. (2013). Sirtuin 6: a review of biological effects and potential therapeutic properties. *Molecular BioSystems*, 9(7), 1789-1806.
 275. Mao, Z., Hine, C., Tian, X., Van Meter, M., Au, M., Vaidya, A., Seluanov, A. and Gorbunova, V. (2011). SIRT6 Promotes DNA Repair Under Stress by Activating PARP1. *Science*, 332(6036), 1443-1446.
 276. Feldman, J. L., Baeza, J. and Denu, J. M. (2013). Activation of the Protein Deacetylase SIRT6 by Long-chain Fatty Acids and Widespread Deacylation by Mammalian Sirtuins. *Journal of Biological Chemistry*, 288(43), 31350-31356.
 277. Ianni, A., Kumari, P., Tarighi, S., Braun, T. and Vaquero, A. (2024). SIRT7: a novel molecular target for personalized cancer treatment? *Oncogene*, 43(14), 993-1006.
 278. Moreno-Yruela, C., Ekundayo, B. E., Foteva, P. N., Ni, D., Calvino-Sanles, E., Stahlberg, H. and Fierz, B. (2025). Structural basis of SIRT7 nucleosome engagement and substrate specificity. *Nature Communications*, 16(1), 1328.
 279. Yuan, H. and Marmorstein, R. (2012). Structural Basis for Sirtuin Activity and Inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42428-42435.
 280. Sharma, A., Mahur, P., Muthukumaran, J., Singh, A. K. and Jain, M. (2023). Shedding light on structure, function and regulation of human sirtuins: a comprehensive review. *3 Biotech*, 13(1), 29.
 281. Teixeira, C. S. S., Cerqueira, N. M. F. S. A., Gomes, P. and Sousa, S. F. (2020). A Molecular Perspective on Sirtuin Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8609.
 282. Sauve, A. A. and Youn, D. Y. (2012). Sirtuins: NAD⁺-dependent deacetylase mechanism and regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16(5), 535-543.
 283. Garcia-Peterson, L. M. and Li, X. (2021). Trending topics of SIRT1 in tumorigenicity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1865(9), 129952.
 284. Jang, S. Y., Kang, H. T. and Hwang, E. S. (2012). Nicotinamide-induced mitophagy: event mediated by high NAD⁺/NADH ratio and SIRT1 protein activation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19304-19314.
 285. Cantó, C. and Auwerx, J. (2009). Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(7), 325-331.

286. Majeed, Y., Halabi, N., Madani, A. Y., Engelke, R., Bhagwat, A. M., Abdesslem, H., Agha, M. V., Vakayil, M., Courjaret, R., Goswami, N., Hamidane, H. B., Elrayess, M. A., Rafii, A., Graumann, J., Schmidt, F. and Mazloun, N. A. (2021). SIRT1 promotes lipid metabolism and mitochondrial biogenesis in adipocytes and coordinates adipogenesis by targeting key enzymatic pathways. *Scientific Reports*, 11(1), 8177.
287. Liang, F., Kume, S. and Koya, D. (2009). SIRT1 and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 367-373.
288. Batiha, G. E.-S., Al-kuraishy, H. M., Al-Gareeb, A. I. and Elekhawwy, E. (2023). SIRT1 pathway in Parkinson's disease: a faraway snapshot but so close. *Inflammopharmacology*, 31(1), 37-56.
289. Flori, L., Petrarolo, G., Brogi, S., La Motta, C., Testai, L. and Calderone, V. (2021). Identification of novel SIRT1 activators endowed with cardioprotective profile. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 165, 105930.
290. Cheng, Y., Xiao, Z., Cai, W., Zhou, T. and Yang, Z. (2025). Suppression of FOXO1 activity by SIRT1-mediated deacetylation weakening the intratumoral androgen autocrine function in glioblastoma. *Cancer Gene Therapy*, 32(3), 343-354.
291. Firestein, R., Blander, G., Michan, S., Oberdoerffer, P., Ogino, S., Campbell, J., Bhimavarapu, A., Luikenhuis, S., de Cabo, R., Fuchs, C., Hahn, W. C., Guarente, L. P. and Sinclair, D. A. (2008). The SIRT1 Deacetylase Suppresses Intestinal Tumorigenesis and Colon Cancer Growth. *PLoS One*, 3(4), e2020.
292. Wang, R. H., Sengupta, K., Li, C., Kim, H. S., Cao, L., Xiao, C., Kim, S., Xu, X., Zheng, Y., Chilton, B., Jia, R., Zheng, Z. M., Appella, E., Wang, X. W., Ried, T. and Deng, C. X. (2008). Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*, 14(4), 312-323.
293. Zhang, Y., Cai, X., Chai, N., Gu, Y., Zhang, S., Ding, M., Cao, H., Sha, S., Yin, J., Li, M., Wu, K. and Nie, Y. (2015). SIRT1 Is Reduced in Gastric Adenocarcinoma and Acts as a Potential Tumor Suppressor in Gastric Cancer. *Gastrointestinal Tumors*, 2(3), 109-123.
294. Mei, Z., Zhang, X., Yi, J., Huang, J., He, J. and Tao, Y. (2016). Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35, 182.
295. Yamamori, T., DeRicco, J., Naqvi, A., Hoffman, T. A., Mattagajasingh, I., Kasuno, K., Jung, S. B., Kim, C. S. and Irani, K. (2010). SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair. *Nucleic Acids Research*, 38(3), 832-845.

296. Kabra, N., Li, Z., Chen, L., Li, B., Zhang, X., Wang, C., Yeatman, T., Coppola, D. and Chen, J. (2009). SirT1 Is an Inhibitor of Proliferation and Tumor Formation in Colon Cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 18210-18217.
297. García-Martínez, J. M., Chocarro-Calvo, A., Martínez-Useros, J., Regueira-Acebedo, N., Fernández-Aceñero, M. J., Muñoz, A., Larriba, M. J. and García-Jiménez, C. (2024). SIRT1 Mediates the Antagonism of Wnt/ β -Catenin Pathway by Vitamin D in Colon Carcinoma Cells. *International Journal of Biological Sciences*, 20(14), 5495-5509.
298. Yang, H., Zhang, W., Pan, H., Feldser, H. G., Lainez, E., Miller, C., Leung, S., Zhong, Z., Zhao, H., Sweitzer, S., Considine, T., Riera, T., Suri, V., White, B., Ellis, J. L., Vlasuk, G. P. and Loh, C. (2012). SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF- κ B activity. *PLoS One*, 7(9), e46364.
299. Yi, J. and Luo, J. (2010). SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(8), 1684-1689.
300. Yousafzai, N. A., Jin, H., Ullah, M. and Wang, X. (2021). Recent advances of SIRT1 and implications in chemotherapeutics resistance in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 11(11), 5233-5248.
301. Kriegel, L., Vieth, M., Kirchner, T. and Menssen, A. (2012). Up-regulation of c-MYC and SIRT1 expression correlates with malignant transformation in the serrated route to colorectal cancer. *Oncotarget*, 3(10), 1182-1193.
302. Deng, C.-X. (2009). SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *International Journal of Biological Sciences*, 5(2), 147.
303. Dai, H., Case, A. W., Riera, T. V., Considine, T., Lee, J. E., Hamuro, Y., Zhao, H., Jiang, Y., Sweitzer, S. M., Pietrak, B., Schwartz, B., Blum, C. A., Disch, J. S., Caldwell, R., Szczepankiewicz, B., Oalman, C., Yee Ng, P., White, B. H., Casaubon, R., Narayan, R., Koppetsch, K., Bourbonais, F., Wu, B., Wang, J., Qian, D., Jiang, F., Mao, C., Wang, M., Hu, E., Wu, J. C., Perni, R. B., Vlasuk, G. P. and Ellis, J. L. (2015). Crystallographic structure of a small molecule SIRT1 activator-enzyme complex. *Nature Communications*, 6, 7645.
304. Zhao, X., Allison, D., Condon, B., Zhang, F., Gheyi, T., Zhang, A., Ashok, S., Russell, M., MacEwan, I., Qian, Y., Jamison, J. A. and Luz, J. G. (2013). The 2.5 Å Crystal Structure of the SIRT1 Catalytic Domain Bound to Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺) and an Indole (EX527 Analogue) Reveals a Novel Mechanism of Histone Deacetylase Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(3), 963-969.
305. Davenport, A. M., Huber, F. M. and Hoelz, A. (2014). Structural and Functional Analysis of Human SIRT1. *Journal of Molecular Biology*, 426(3), 526-541.

306. Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., Carney, D. P., Smith, J. J., Gagne, D. J., Jin, L., Boss, O., Perni, R. B., Vu, C. B., Bemis, J. E., Xie, R., Disch, J. S., Ng, P. Y., Nunes, J. J., Lynch, A. V., Yang, H., Galonek, H., Israelian, K., Choy, W., Iffland, A., Lavu, S., Medvedik, O., Sinclair, D. A., Olefsky, J. M., Jirousek, M. R., Elliott, P. J. and Westphal, C. H. (2007). Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, 450(7170), 712-716.
307. Hubbard, B. P., Gomes, A. P., Dai, H., Li, J., Case, A. W., Considine, T., Riera, T. V., Lee, J. E., E, S. Y., Lamming, D. W., Pentelute, B. L., Schuman, E. R., Stevens, L. A., Ling, A. J. Y., Armour, S. M., Michan, S., Zhao, H., Jiang, Y., Sweitzer, S. M., Blum, C. A., Disch, J. S., Ng, P. Y., Howitz, K. T., Rolo, A. P., Hamuro, Y., Moss, J., Perni, R. B., Ellis, J. L., Vlasuk, G. P. and Sinclair, D. A. (2013). Evidence for a Common Mechanism of SIRT1 Regulation by Allosteric Activators. *Science*, 339(6124), 1216-1219.
308. Cao, D., Wang, M., Qiu, X., Liu, D., Jiang, H., Yang, N. and Xu, R.-M. (2015). Structural basis for allosteric, substrate-dependent stimulation of SIRT1 activity by resveratrol. *Genes & Development*, 29(12), 1316-1325.
309. Sun, C., Bai, S., Liang, Y., Liu, D., Liao, J., Chen, Y., Zhao, X., Wu, B., Huang, D., Chen, M. and Wu, D. (2023). The role of Sirtuin 1 and its activators in age-related lung disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162, 114573.
310. Nandave, M., Acharjee, R., Bhaduri, K., Upadhyay, J., Rupanagunta, G. P. and Ansari, M. N. (2023). A pharmacological review on SIRT 1 and SIRT 2 proteins, activators, and inhibitors: Call for further research. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124581.
311. Fiorentino, F., Fabbri, E., Mai, A. and Rotili, D. (2024). Activation and inhibition of sirtuins: From bench to bedside. *Medicinal Research Reviews*, 45(2), 484-560.
312. Dai, H., Sinclair, D. A., Ellis, J. L. and Steegborn, C. (2018). Sirtuin activators and inhibitors: Promises, achievements, and challenges. *Pharmacology & Therapeutics*, 188, 140-154.
313. Cohen, H. Y., Miller, C., Bitterman, K. J., Wall, N. R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K. T., Gorospe, M., de Cabo, R. and Sinclair, D. A. (2004). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*, 305(5682), 390-392.
314. Villalba, J. M. and Alcáín, F. J. (2012). Sirtuin activators and inhibitors. *BioFactors*, 38(5), 349-359.
315. Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.-L., Scherer, B. and Sinclair, D. A.

- (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954), 191-196.
316. Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A. and Mayo, M. W. (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO journal*, 23(12), 2369-2380.
 317. Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M. W. and Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*, 429(6993), 771-776.
 318. Araki, T., Sasaki, Y. and Milbrandt, J. (2004). Increased Nuclear NAD Biosynthesis and SIRT1 Activation Prevent Axonal Degeneration. *Science*, 305(5686), 1010-1013.
 319. Howells, L. M., Berry, D. P., Elliott, P. J., Jacobson, E. W., Hoffmann, E., Hegarty, B., Brown, K., Steward, W. P. and Gescher, A. J. (2011). Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prevention Research*, 4(9), 1419-1425.
 320. Popat, R., Plesner, T., Davies, F., Cook, G., Cook, M., Elliott, P., Jacobson, E., Gumbleton, T., Oakervee, H. and Cavenagh, J. (2013). A phase 2 study of SRT501 (resveratrol) with bortezomib for patients with relapsed and or refractory multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 160(5), 714-717.
 321. Bemis, J. E., Vu, C. B., Xie, R., Nunes, J. J., Ng, P. Y., Disch, J. S., Milne, J. C., Carney, D. P., Lynch, A. V., Jin, L., Smith, J. J., Lavu, S., Iffland, A., Jirousek, M. R. and Perni, R. B. (2009). Discovery of oxazolo[4,5-b]pyridines and related heterocyclic analogs as novel SIRT1 activators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(8), 2350-2353.
 322. Vu, C. B., Bemis, J. E., Disch, J. S., Ng, P. Y., Nunes, J. J., Milne, J. C., Carney, D. P., Lynch, A. V., Smith, J. J., Lavu, S., Lambert, P. D., Gagne, D. J., Jirousek, M. R., Schenk, S., Olefsky, J. M. and Perni, R. B. (2009). Discovery of Imidazo[1,2-b]thiazole Derivatives as Novel SIRT1 Activators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(5), 1275-1283.
 323. Nayagam, V. M., Wang, X., Tan, Y. C., Poulsen, A., Goh, K. C., Ng, T., Wang, H., Song, H. Y., Ni, B., Entzeroth, M. and Stünkel, W. (2006). SIRT1 Modulating Compounds from High-Throughput Screening as Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Agents. *SLAS Discovery*, 11(8), 959-967.
 324. Ye, T., Wei, L., Shi, J., Jiang, K., Xu, H., Hu, L., Kong, L., Zhang, Y., Meng, S. and Piao, H. (2019). Sirtuin1 activator SRT2183 suppresses glioma cell growth involving activation of endoplasmic reticulum stress pathway. *BMC Cancer*, 19(1), 706.

325. Sun, T., Hu, Y., He, W., Shang, Y., Yang, X., Gong, L., Zhang, X., Gong, P. and Yang, G. (2020). SRT2183 impairs ovarian cancer by facilitating autophagy. *Aging (Albany NY)*, 12(23), 24208-24218.
326. Chauhan, D., Bandi, M., Singh, A. V., Ray, A., Raje, N., Richardson, P. and Anderson, K. C. (2011). Preclinical evaluation of a novel SIRT1 modulator SRT1720 in multiple myeloma cells. *British Journal of Haematology*, 155(5), 588-598.
327. Hoffmann, E., Wald, J., Lavu, S., Roberts, J., Beaumont, C., Haddad, J., Elliott, P., Westphal, C. and Jacobson, E. (2013). Pharmacokinetics and tolerability of SRT2104, a first-in-class small molecule activator of SIRT1, after single and repeated oral administration in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(1), 186-196.
328. Chang, N., Li, J., Lin, S., Zhang, J., Zeng, W., Ma, G. and Wang, Y. (2024). Emerging roles of SIRT1 activator, SRT2104, in disease treatment. *Scientific Reports*, 14(1), 5521.
329. Curry, A. M., White, D. S., Donu, D. and Cen, Y. (2021). Human Sirtuin Regulators: The "Success" Stories. *Frontiers in Physiology*, 12, 752117.
330. Mai, A., Valente, S., Meade, S., Carafa, V., Tardugno, M., Nebbioso, A., Galmozzi, A., Mitro, N., De Fabiani, E., Altucci, L. and Kazantsev, A. (2009). Study of 1,4-Dihydropyridine Structural Scaffold: Discovery of Novel Sirtuin Activators and Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(17), 5496-5504.
331. Wu, J., Zhang, D., Chen, L., Li, J., Wang, J., Ning, C., Yu, N., Zhao, F., Chen, D., Chen, X., Chen, K., Jiang, H., Liu, H. and Liu, D. (2013). Discovery and Mechanism Study of SIRT1 Activators that Promote the Deacetylation of Fluorophore-Labeled Substrate. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(3), 761-780.
332. Atobe, M., Yamakawa, N., Wada, Y., Goto, T., Kawanishi, M., Ito, T., Saito, M., Takeda, M., Tabata, T. and Arai, H. (2017). A series of novel indazole derivatives of Sirt 1 activator as osteogenic regulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(21), 4828-4831.
333. Feng, T., Liu, P., Wang, X., Luo, J., Zuo, X., Jiang, X., Liu, C., Li, Y., Li, N., Chen, M., Zhu, N., Han, X., Liu, C., Xu, Y. and Si, S. (2018). SIRT1 activator E1231 protects from experimental atherosclerosis and lowers plasma cholesterol and triglycerides by enhancing ABCA1 expression. *Atherosclerosis*, 274, 172-181.
334. Kim, M. J., An, H. J., Kim, D. H., Lee, B., Lee, H. J., Ullah, S., Kim, S. J., Jeong, H. O., Moon, K. M., Lee, E. K., Yang, J., Akter, J., Chun, P., Moon, H. R. and Chung, H. Y. (2018). Novel SIRT1 activator MHY2233 improves glucose tolerance and reduces hepatic lipid accumulation in db/db mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(4), 684-688.

335. Azminah, A., Erlina, L., Radji, M., Mun'im, A., Syahdi, R. R. and Yanuar, A. (2019). In silico and in vitro identification of candidate SIRT1 activators from Indonesian medicinal plants compounds database. *Computational Biology and Chemistry*, 83, 107096.
336. Scisciola, L., Sarno, F., Carafa, V., Cosconati, S., Di Maro, S., Ciuffreda, L., De Angelis, A., Stiuso, P., Feoli, A., Sbardella, G., Altucci, L. and Nebbioso, A. (2020). Two novel SIRT1 activators, SCIC2 and SCIC2.1, enhance SIRT1-mediated effects in stress response and senescence. *Epigenetics*, 15(6-7), 664-683.
337. Gao, J., Chen, Q.-Q., Huang, Y., Li, K.-H., Geng, X.-J., Wang, T., Lin, Q.-S. and Yao, R.-S. (2021). Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Naphthofuran Derivatives as Potent SIRT1 Activators. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 653233.
338. Chauhan, S., Kumar, A., Kumar, R. and Saini, D. (2024). Discovery of 5-(Substituted Phenyl)-2-aryl Benzimidazole Derivatives as SIRT1 Activators: Their Design, in silico Studies, Synthesis, and in vitro Evaluation. *Current Medicinal Chemistry*, DOI: 10.2174/0109298673330534240924104941.
339. Gunzner-Toste, J., Zhao, G., Bauer, P., Baumeister, T., Buckmelter, A. J., Caligiuri, M., Clodfelter, K. H., Fu, B., Han, B., Ho, Y.-C., Kley, N., Liang, X., Liederer, B. M., Lin, J., Mukadam, S., O'Brien, T., Oh, A., Reynolds, D. J., Sharma, G., Skelton, N., Smith, C. C., Sodhi, J., Wang, W., Wang, Z., Xiao, Y., Yuen, P.-w., Zak, M., Zhang, L., Zheng, X., Bair, K. W. and Dragovich, P. S. (2013). Discovery of potent and efficacious urea-containing nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors with reduced CYP2C9 inhibition properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(12), 3531-3538.
340. Chen, W., Dong, G., He, S., Xu, T., Wang, X., Liu, N., Zhang, W., Miao, C. and Sheng, C. (2016). Identification of benzothiophene amides as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(3), 765-768.
341. Oh, A., Ho, Y.-C., Zak, M., Liu, Y., Chen, X., Yuen, P.-w., Zheng, X., Liu, Y., Dragovich, P. S. and Wang, W. (2014). Structural and Biochemical Analyses of the Catalysis and Potency Impact of Inhibitor Phosphoribosylation by Human Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. *ChemBioChem*, 15(8), 1121-1130.
342. Dai, H., Kustigian, L., Carney, D., Case, A., Considine, T., Hubbard, B. P., Perni, R. B., Riera, T. V., Szczepankiewicz, B., Vlasuk, G. P. and Stein, R. L. (2010). SIRT1 activation by small molecules: kinetic and biophysical evidence for direct interaction of enzyme and activator. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 32695-32703.
343. Nunes, J., Milne, J., Bemis, J., Xie, J., Vu, R., Chi, Pui, B. N., Disch, Y., Salzmann, Y.S., Armistead, T. (2007). *Benzothiazoles and thiazolopyridines as sirtuin modulators* (China Patent No. WO/2007/019346).

344. Zak, M., Liederer, B. M., Sampath, D., Yuen, P.-w., Bair, K. W., Baumeister, T., Buckmelter, A. J., Clodfelter, K. H., Cheng, E., Crocker, L., Fu, B., Han, B., Li, G., Ho, Y.-C., Lin, J., Liu, X., Ly, J., O'Brien, T., Reynolds, D. J., Skelton, N., Smith, C. C., Tay, S., Wang, W., Wang, Z., Xiao, Y., Zhang, L., Zhao, G., Zheng, X. and Dragovich, P. S. (2015). Identification of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors with no evidence of CYP3A4 time-dependent inhibition and improved aqueous solubility. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(3), 529-541.
345. Cereto-Massagué, A., Guasch, L., Valls, C., Mulero, M., Pujadas, G. and Garcia-Vallvé, S. (2012). DecoyFinder: an easy-to-use python GUI application for building target-specific decoy sets. *Bioinformatics*, 28(12), 1661-1662.
346. Rizzi, A. and Fioni, A. (2008). Virtual Screening Using PLS Discriminant Analysis and ROC Curve Approach: An Application Study on PDE4 Inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48(8), 1686-1692.
347. Truchon, J. F. and Bayly, C. I. (2007). Evaluating virtual screening methods: Good and bad metrics for the "early recognition" problem. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 47(2), 488-508.
348. Irwin, J. J., Tang, K. G., Young, J., Dandarchuluun, C., Wong, B. R., Khurelbaatar, M., Moroz, Y. S., Mayfield, J. and Sayle, R. A. (2020). ZINC20-A Free Ultralarge-Scale Chemical Database for Ligand Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(12), 6065-6073.
349. Zhang, W. L., Pei, J. F. and Lai, L. H. (2017). Computational Multitarget Drug Design. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(3), 403-412.
350. Zhao, W., Hevener, K. E., White, S. W., Lee, R. E. and Boyett, J. M. (2009). A statistical framework to evaluate virtual screening. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 225.
351. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. and Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 46(1-3), 3-26.
352. Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W. and Kopple, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615-2623.
353. Duan, J., Dixon, S. L., Lowrie, J. F. and Sherman, W. (2010). Analysis and comparison of 2D fingerprints: Insights into database screening performance using eight fingerprint methods. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 29(2), 157-170.

354. Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C. and Mainz, D. T. (2006). Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21), 6177-6196.
355. Yagci, S., Gozelle, M., Kaya, S. G., Ozkan, Y., Aksel, A. B., Bakar-Ates, F., Dundar, Y. and Eren, G. (2021). Hit-to-lead optimization on aryloxybenzamide derivative virtual screening hit against SIRT. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 30, 115961.
356. Kaya, S. G., Eren, G., Massarotti, A., Gunindi, H. B., Bakar-Ates, F. and Ozkan, E. (2024). Symmetrical 2,7-disubstituted 9H-fluoren-9-one as a novel and promising scaffold for selective targeting of SIRT2. *Archiv der Pharmazie*, e2400661.
357. Özdemir, B. and Çimen, H. (2016). Sodium borate treatment induces metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma through SIRT3 activation. *Turkish Journal of Biology*, 40, 906-914.
358. Travelli, C., Aprile, S., Rahimian, R., Grolla, A. A., Rogati, F., Bertolotti, M., Malagnino, F., di Paola, R., Impellizzeri, D., Fusco, R., Mercalli, V., Massarotti, A., Stortini, G., Terrazzino, S., Del Grosso, E., Fakhfour, G., Troiani, M. P., Alisi, M. A., Grosa, G., Sorba, G., Canonico, P. L., Orsomando, G., Cuzzocrea, S., Genazzani, A. A., Galli, U. and Tron, G. C. (2017). Identification of Novel Triazole-Based Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibitors Endowed with Antiproliferative and Antiinflammatory Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 60(5), 1768-1792.
359. Pui, Y. N., Blum, C., Mcpherson, L., Perni, R. B., Vu, C. B., Ahmed, M. M., Disch, J. D. (2017). *Bicyclic pyridines and analogs as sirtuin modulators*. (US Patent No. US9556201B2).
360. Ellis, J., Evan, K. A., Fox, R. M., Miller, W. H., Seefeld, M. A. (2017). *Substituted bridged urea analogs as sirtuin modulators*. (China Patent no. WO2016079709A1).
361. Dixon, S. L., Smondirev, A. M. and Rao, S. N. (2006). PHASE: A Novel Approach to Pharmacophore Modeling and 3D Database Searching. *Chemical Biology & Drug Design*, 67(5), 370-372.
362. Galli, U., Travelli, C., Massarotti, A., Fakhfour, G., Rahimian, R., Tron, G. C. and Genazzani, A. A. (2013). Medicinal Chemistry of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(16), 6279-6296.
363. Gorantla, V., Gundla, R., Jadav, S. S., Anugu, S. R., Chimakurthy, J., Nidasanametla, S. K. and Korupolu, R. (2017). Molecular hybrid design, synthesis and biological evaluation of N-phenyl sulfonamide linked N-acyl hydrazone derivatives functioning as COX-2 inhibitors: New anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-bacterial agents. *New Journal of Chemistry*, 41(22), 13516-13532.

364. Liu, Y., Zhang, Z., Yin, D., Huang, Y., Zheng, R., Zhou, Y., Chen, J. and Dang, C. (2025). Green synthesis of thiadiazole Schiff bases and specific recognition of Cr2O7²⁻, SiO3²⁻ and S²⁻. *Inorganica Chimica Acta*, 577, 122472.
365. Dinh Thanh, N., Ngoc Toan, V., Thi Kim Giang, N., Thi Kim Van, H., Son Hai, D., Minh Tri, N. and Ngoc Toan, D. (2023). Synthesis, biological and molecular modelling for 1,3,4-thiadiazole sulfonyl thioureas: bacterial and fungal activity. *RSC Medicinal Chemistry*, 14(12), 2751-2767.
366. Niu, P., Kang, J., Tian, X., Song, L., Liu, H., Wu, J., Yu, W. and Chang, J. (2015). Synthesis of 2-Amino-1,3,4-oxadiazoles and 2-Amino-1,3,4-thiadiazoles via Sequential Condensation and I2-Mediated Oxidative C–O/C–S Bond Formation. *The Journal of Organic Chemistry*, 80(2), 1018-1024.
367. Lytkina, M. A., Eliseenkov, E. V., Boyarskii, V. P. and Petrov, A. A. (2017). Sodium difluoromethanesulfinate—A difluoromethylating agent toward protonated heterocyclic bases. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 53(4), 539-546.
368. Boechat, N., Ferreira, S. B., Glidewell, C., Low, J. N., Skakle, J. M. S. and Wardell, S. M. S. V. (2006). 2-Amino-5-trifluoromethyl-1,3,4-thiadiazole and a redetermination of 2-amino-1,3,4-thiadiazole, both at 120 K: chains of edge-fused R22(8) and R44(10) rings, and sheets of R22(8) and R66(20) rings. *Acta Crystallographica Section C*, 62(1), o42-o44.
369. Noolvi, M. N., Patel, H. M., Singh, N., Gadad, A. K., Cameotra, S. S. and Badiger, A. (2011). Synthesis and anticancer evaluation of novel 2-cyclopropylimidazo[2,1-b][1,3,4]-thiadiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(9), 4411-4418.
370. Gediya, L. K. and Njar, V. C. (2009). Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 4(11), 1099-1111.
371. Doostmohammadi, A., Jooya, H., Ghorbanian, K., Gohari, S. and Dadashpour, M. (2024). Potentials and future perspectives of multi-target drugs in cancer treatment: the next generation anti-cancer agents. *Cell Communication and Signaling*, 22(1), 228.
372. Gunther, S., Senger, C., Michalsky, E., Goede, A. and Preissner, R. (2006). Representation of target-bound drugs by computed conformers: implications for conformational libraries. *BMC Bioinformatics*, 7, 293.
373. Gardell, S. J., Hopf, M., Khan, A., Dispagna, M., Hampton Sessions, E., Falter, R., Kapoor, N., Brooks, J., Culver, J., Petucci, C., Ma, C. T., Cohen, S. E., Tanaka, J., Burgos, E. S., Hirschi, J. S., Smith, S. R., Sergienko, E. and Pinkerton, A. B. (2019). Boosting

- NAD(+) with a small molecule that activates NAMPT. *Nature Communications*, 10(1), 3241.
374. Najera, S. S., Ricketts, C. J., Schmidt, L. S., Medina, J. I., Saito, K., Ileva, L., Brender, J. R., James, A. M., Peer, C. J., Gouker, B., Karim, B. O., Chernova, O., Wells, C., Wei, M.-H., Yang, Y., Zhang, X., Klumpp-Thomas, C., Travers, J., Chen, L., Wilson, K. M., Issaq, S. H., Figg, W. D., Difilippantonio, S., Kalen, J. D., Krishna, M. C., Thomas, C. J., Ceribelli, M., Heske, C. M., Crooks, D. R. and Meier, J. L. (2025). Targeting NAD⁺ Metabolism Vulnerability in FH-Deficient Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma with the Novel NAMPT Inhibitor OT-82. *Molecular Cancer Therapeutics*, 24(2), 200-213.
 375. Schuster, S., Penke, M., Gorski, T., Gebhardt, R., Weiss, T. S., Kiess, W. and Garten, A. (2015). FK866-induced NAMPT inhibition activates AMPK and downregulates mTOR signaling in hepatocarcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(2), 334-340.
 376. Karimi Dermani, F., Saidijam, M., Amini, R., Mahdavinezhad, A., Heydari, K. and Najafi, R. (2017). Resveratrol Inhibits Proliferation, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition by Increasing miR-200c Expression in HCT-116 Colorectal Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(6), 1547-1555.
 377. Dai, H., Li, M., Yang, W., Sun, X., Wang, P., Wang, X., Su, J., Wang, X., Hu, X. and Zhao, M. (2020). Resveratrol inhibits the malignant progression of hepatocellular carcinoma via MARCH1-induced regulation of PTEN/AKT signaling. *Aging (Albany NY)*, 12(12), 11717-11731.
 378. Tolstikov, V., Nikolayev, A., Dong, S., Zhao, G. and Kuo, M. S. (2014). Metabolomics analysis of metabolic effects of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibition on human cancer cells. *PloS One*, 9(12), e114019.
 379. Ogino, Y., Sato, A., Uchiumi, F. and Tanuma, S. I. (2018). Cross resistance to diverse anticancer nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitors induced by FK866 treatment. *Oncotarget*, 9(23), 16451-16461.
 380. Duarte-Pereira, S., Pereira-Castro, I., Silva, S. S., Correia, M. G., Neto, C., da Costa, L. T., Amorim, A. and Silva, R. M. (2016). Extensive regulation of nicotinate phosphoribosyltransferase (NAPRT) expression in human tissues and tumors. *Oncotarget*, 7(2), 1973-1983.
 381. Farcas, M., Gavrea, A. A., Gulei, D., Ionescu, C., Irimie, A., Catana, C. S. and Berindan-Neagoe, I. (2019). SIRT1 in the Development and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Nutrition*, 6, 148.

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Adı Soyadı: Fikriye ÖZGENCİL

Uyruğu: T.C.

Doğum Yeri, Tarihi:

Medeni Hali:

Telefon:

E-posta:

Eğitim

Derece	Okul/ Program	Yıl
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya ABD <i>“Yeni Nikotinamid Fosforiboziltransferaz (NAMPT) İnhibitör Adaylarının Sanal Tarama Yöntemi ile Keşfi ve Biyolojik Etkilerinin Belirlenmesi”</i>	2019-Devam ediyor
Yüksek Lisans	Danışman: Doç. Dr. Gökçen EREN, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya ABD	2016-2019
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011-2016
Lise	Necip Fazıl Anadolu Lisesi	2007-2011

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2021-Halen	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya ABD	Araştırma Görevlisi
2018-2021	Ankara Üniversitesi Cebeci Hastanesi	Eczacı
2016-2018	Selçuk Eczanesi	Eczacı

ESERLER

SCIE kapsamında taranan uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. EREN G.; BRUNO A.; GUNTEKIN-ERGUN S.; CETIN-ATALAY R.; **OZGENCIL F.**; OZKAN Y.; GOZELLE M.; KAYA S.G.; COSTANTINO G.: "Pharmacophore Modeling and Virtual Screening Studies to Identify Novel Selective SIRT2 Inhibitors", *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 89, 60-73 (2019).
2. **OZGENCIL F.**; EREN G.; OZKAN Y.; GUNTEKIN-ERGUN S.; CETIN-ATALAY R.: "Identification of small-molecule urea derivatives as novel NAMPT inhibitors via pharmacophore-based virtual Screening", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 28(1), 115217 (2020).
3. **OZGENCIL F.**; EREN G.: "Field-based 3D-QSAR studies on amide- and urea-containing NAMPT inhibitors", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 242, 104984 (2023).
4. **OZGENCIL F.**; GUNINDI H.B.; EREN G.: "Dual-targeted NAMPT inhibitors as a progressive strategy for cancer therapy" *Bioorganic Chemistry*, 149, 107509 (2024).

Uluslararası ve ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. **OZGENCIL F.**; OZKAN Y.; EREN G.: "Yeni Nikotinamit Fosforiboziltransferaz (NAMPT) İnhibitör Adaylarının Sanal Tarama Yöntemi ile Keşfi ve Biyolojik Etkilerinin Belirlenmesi" VI. Ulusal Farmasötik Kimya Kongresi, 26-29 Ağustos, İstanbul, Türkiye (2022) (Poster).
2. **OZGENCIL F.**; EREN G.: "3D-QSAR Studies on Amide and Urea Derivatives as NAMPT Inhibitors" 9th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium (EFMC-YMCS 2022), 08-09 Eylül, Nice, Fransa (2022) (Poster).
3. OZUPEK B.; SOHRETOGLU D.; ŞORAL M.; **OZGENCIL F.**; EREN G.; DELIORMAN ORHAN D.: "Phytochemical and Activity Studies on *Geranium subcaulescens*" International Congress on Integrative Medicine and Health, 11-13 Nisan, Ohio, ABD (2024) (Poster).
4. **OZGENCIL F.**; EREN G.: "Developing a Field-Based 3D-QSAR Model through SIRT2 Inhibitory Profiles of In-House Compounds" 24th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationship, 22-26 Eylül Barselona, İspanya (2024) (Poster).

5. PEKACAR S.; DELIORMAN ORHAN D.; ŞOHRETOGLU D.; ŞORAL M.; **ÖZGENCİL F.**, EREN G. : “*Pistacia atlantica* Desf’in *in vitro* ve *in siliko* Yöntemlerle Metabolizma Hastalıkları Üzerindeki Etki Potansiyelinin İncelenmesi” 25. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT 2024), 7-10 Kasım, Türkiye (2024) (Poster).

Bilimsel Projeler

1. Ligand ve Yapı Temelli Yaklaşımların Birlikte Kullanıldığı Sanal Tarama Yöntemi ile Yeni SIRT2 İnhibitörlerinin Keşfi, TÜBİTAK 3001 118S726, Yürütücü: Gökçen EREN, Araştırmacı: Rengül ATALAY, Bursiyer: **Fikriye ÖZGENCİL** (15.08.2015-15.08.2017).
2. Yeni NAMPT İnhibitörlerinin Sanal Tarama Yöntemi ile Keşfi, TÜBİTAK 1002 118S726, Yürütücü: Gökçen EREN, Araştırmacı: Yeşim ÖZKAN, Bursiyer: **Fikriye ÖZGENCİL** (15.12.2018-15.12.2019).
3. Öncü Bileşik Optimizasyonu ile Yeni Selektif SIRT2 İnhibitörlerin Geliştirilmesi, Gazi Üniversitesi Öncelikli Alan Bilimsel Araştırma Projesi TOA-2021-7165, Yürütücü: Gökçen EREN, Araştırmacılar: Yeşim ÖZKAN, Mahmut GÖZELLE, Filiz BAKAR ATEŞ, Selen Gözde KAYA, Ahmet Buğra AKSEL, **Fikriye ÖZGENCİL**, Erva ÖZKAN (15.11.2018- 15.05.2022).
4. Çok Hedefli İlaç Yaklaşımı: NAMPT İnhibitörü ve SIRT1 Aktivatörü Olarak Dual Etki Gösteren Moleküllerin Sanal Tarama Yöntemi ile Keşfi, TÜSEB A 16839, Yürütücü: **Fikriye ÖZGENCİL**, Danışman: Gökçen EREN, Araştırmacı: Yeşim ÖZKAN (21.11.2022-01.05.2024).
5. NAMPT İnhibitörü ve SIRT1 Aktivatörü Olarak Dual Etki Gösterebilecek Bileşiklerin *in vitro* NAMPT İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi, TÜBİTAK 1002-B 124S441, Yürütücü: **Fikriye ÖZGENCİL**, Danışman: Gökçen EREN (14.06.2024-19.12.2024).
6. NAMPT İnhibisyonunu ve SIRT1 Aktivasyonunu Hedef Alan Dual Etkili Moleküllerin Geliştirilmesi, TÜBİTAK 1002-A 224S108, Yürütücü: **Fikriye ÖZGENCİL**, Danışman: Gökçen EREN (25.10.2024-Devam ediyor).
7. NAMPT İnhibitörü ve SIRT1 Aktivatörü Olarak İkili Etki Gösteren Moleküllerin Geliştirilmesi, Gazi Üniversitesi Uluslararası Araştırma İşbirliği Projesi TUI-2024-9807, Yürütücü: Gökçen EREN, Araştırmacılar: Alberto MASSAROTTI, Hüseyin ÇİMEN, **Fikriye ÖZGENCİL** (28.11.2024-Devam ediyor).



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

