

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ NİKOTİNAMİT FOSFORİBOZİLTRANSFERAZ (NAMPT) İNHİBİTÖR ADAYLARININ SANAL TARAMA YÖNTEMİ İLE KEŞFİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

FİKRİYE ÖZGENCİL

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

NİSAN 2019


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

YENİ NİKOTİNAMİT FOSFORİBOZİLTRANSFERAZ (NAMPT) İNHİBİTÖR ADAYLARININ SANAL TARAMA YÖNTEMİ İLE KEŞFİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Fikriye ÖZGENCİL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİSAN 2019

Fikriye ÖZGENCİL tarafından hazırlanan "YENİ NİKOTİNAMİT FOSFORİBOZİLTRANSFERAZ (NAMPT) İNHİBİTÖR ADAYLARININ SANAL TARAMA YÖNTEMİ İLE KEŞFİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ /~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Gökçen EREN
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Başkan: Prof. Dr. Erden BANOĞLU
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye: Prof. Dr. Erhan PALASKA
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Tez Savunma Tarihi: 29.04.2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

- 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 çalışmasında 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

29.04.2019



YENİ NİKOTİNAMİT FOSFORİBOZİLTRANSFERAZ (NAMPT) İNHİBİTÖR ADAYLARININ SANAL TARAMA YÖNTEMİ İLE KEŞFİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Fikriye ÖZGENCİL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Nisan 2019

ÖZET

Nikotinamit fosforiboziltransferaz (NAMPT), memelilerde nikotinamit adenin dinükleotit (NAD^+) sentez yolağında nikotinamit ile 5-fosforibozil-1-pirofostatın (PRPP) nikotinamit mononükleotit (NMN) oluşturmak üzere kondenzasyonunu katalizleyen önemli bir enzimdir. NAD^+, hücrenin hayatta kalmasını sağlayan kalsiyum dengesi ve mobilizasyonu, antioksidasyon, gen ekspresyonu, immünolojik fonksiyonlar ve hücre ölümü gibi birçok hücresel süreçte gerekli olan bir düzenleyicidir. Poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP) ve Sirtuin (SIRT) ailesi gibi enzimlerin NAD^+'ı substrat olarak kullanıyor olmasının keşfi ve NAD^+ seviyesinin sitokin regülasyonu, metabolizma ve yaşlanma üzerine etkisi olabileceği düşüncesi ile yakın zamanda intraselüler NAD^+ üzerine olan ilgi artmıştır. Buna ek olarak, çeşitli kanser türlerinde NAMPT enziminin upregüle olduğu bulunmuştur. Hem bu nedenle hem de NAD^+ sentez yolağındaki önemi sebebiyle, NAMPT enzimi kanser tedavisinde dikkat çekici bir hedef haline gelmiştir. Literatürde çeşitli kimyasal yapılarda etkili ve selektif NAMPT inhibitörleri bildirilmiştir. Bu çalışmada, literatürde kayıtlı, amit, üre ve siyanoguanidin türevi NAMPT inhibitörlerinden yola çıkılarak farmakofor modeller elde edilmiştir. Valide edilen farmakofor modeller ile ZINC kütüphanesine karşı sanal tarama çalışması gerçekleştirilmiştir. Filtreleme basamağı sonrası ise on adet molekül sanal tarama çıktısı olarak belirlenmiş, satın alınmış ve *in vitro* NAMPT aktivite çalışmaları tamamlanmıştır. Sonuç olarak GF4 (NAMPT IC_{50}=2,26 μM) ve GF8 (NAMPT IC_{50}=7,42 μM) bileşikleri ile üre türevi iki yeni NAMPT inhibitörüne ulaşılmıştır.

Bilim Kodu : 1019
Anahtar Kelimeler : NAMPT, Sanal Tarama, Farmakofor Modelleme
Sayfa Adedi : 67
Danışman : Doç. Dr. Gökçen EREN

IDENTIFICATION OF NOVEL NICOTINAMIDE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE (NAMPT) INHIBITIOR CANDIDATES VIA VIRTUAL SCREENING CAMPAIGN AND EVALUATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES
(M. Sc. Thesis)

Fikriye OZGENCIL

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES
April 2019

ABSTRACT

Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) catalyzes the condensation of nicotinamide with 5-phosphoribosyl-1-prophosphate (PRPP) to yield nicotinamide mononucleotide (NMN), a rate limiting enzyme in a mammalian salvage pathway of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) synthesis. Recently, intracellular NAD has received substantial attention due to the recent discovery that several enzymes, including poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and the Sirtuin family, use NAD^+ as a substrate, suggesting that intracellular NAD^+ level may regulate cytokine production, metabolism, and aging through these enzymes. NAMPT is found to be upregulated in various types of cancer, and given its importance in the NAD^+ salvage pathway, NAMPT is considered as an attractive target for the development of new cancer therapies. Several classes of potent and selective small-molecule NAMPT inhibitors have been reported in the literature. In this study, the reported NAMPT inhibitors bearing amide, urea and cyanoguanidine scaffolds were used to generate pharmacophore models and virtual screening studies against ZINC database were performed. After filtering step, ten hits were identified, purchased and evaluated for their *in vitro* NAMPT inhibitory effects. Finally, compounds GF4 (NAMPT IC_{50}=2,26 µM) and GF8 (NAMPT IC_{50}=7,42 µM) were identified as new urea-typed inhibitors of NAMPT.

Science Code : 1019
Key Words : NAMPT, Virtual Screening, Pharmacophore Modeling
Page Number : 67
Supervisor : Assoc. Prof. Gokcen EREN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında değerli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Gökçen Eren'e, biyolojik aktivite çalışmalarını gerçekleştiren Prof. Dr. Yeşim Özkan'a, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocam Arş. Gör. Dr. Mahmut Gözelle'ye, bana her anlamda destek olan laboratuvar arkadaşım Selen Gözde Kaya'ya, yoğun çalışmalarım sırasında manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan eşim İbrahim Kaan Özgencil'e ve aileme teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmalarım boyunca aldığım bursla bana destek olan ve bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde verdiği desteklerden ötürü Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK 118S726) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

ŞEKİLLERİN LİSTESİ x

SİMGELER VE KISALTMALAR xii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Nikotinamit Adenin Dinükleotit (NAD^+) Metabolizması ve Kanser 5

2.2. Nikotinamit Fosforiboziltransferaz (NAMPT) 7

2.3. NAMPT İnhibitörleri 11

3. YÖNTEM 27

3.1. Farmakofor Modelleme 27

3.1.1. Veri seti oluşturma ve moleküllerin hizalanması 27

3.1.2. Farmakofor model oluşturma 28

3.1.2. Farmakofor model doğrulama 28

3.2. Sanal Tarama 29

3.3. Moleküler Docking 29

3.3.1. Protein hazırlama ve aktif bölge tanımlama 29

3.3.2. Sanal tarama iş akışı (virtual screening workflow) protokolü 30

3.4. *İn Vitro* NAMPT İnhibisyon Testi 30

4. BULGULAR 33

4.1. Moleküler Modelleme Bulguları 33

4.2. Biyolojik Bulgular 46

5. TARTIŞMA 49

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 55

KAYNAKLAR 57

ÖZGEÇMİŞ 67

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.1. NAMPT inhibitörlerinden oluşan veri seti 33

Çizelge 4.1. (Devam) NAMPT inhibitörlerinden oluşan veri seti 34

Çizelge 4.1. (Devam) NAMPT inhibitörlerinden oluşan veri seti 35

Çizelge 4.1. (Devam) NAMPT inhibitörlerinden oluşan veri seti 36

Çizelge 4.1. (Devam) NAMPT inhibitörlerinden oluşan veri seti 37

Çizelge 4.2. Farmakofor model belirlemede kullanılan puan türleri.....38

Çizelge 4.3. Farmakofor model doğrulama için kullanılan aktif bileşikler.....39

Çizelge 4.3. (Devam) Farmakofor model doğrulama için kullanılan aktif bileşikler 40

Çizelge 4.3. (Devam) Farmakofor model doğrulama için kullanılan aktif bileşikler 41

Çizelge 4.4. Farmakofor model performansını belirleyen parametreler 42

Çizelge 4.5. Elde edilen farmakofor modeller 43

Çizelge 4.6. Satın alınan final sanal tarama çıktısı moleküller.....47

Çizelge 4.7. Final sanal tarama çıktısı moleküllerin *in vitro* NAMPT inhibisyon değerleri ..48

Çizelge 4.8. GF4 ve GF8 bileşiklerinin NAMPT IC_{50} değerleri.....48

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 1.1. NAD^+'ın NAM kaynaklı sentez yolağı.....2

Şekil 2.2. İnsan NAMPT x-ray kristal yapıları: (A) PDB kodu: 2GVG , (B) PDB kodu: 2GVJ (A zinciri turuncu ile, B zinciri yeşil ile, NMN ve FK866 mavi ile gösterilmiştir). 9

Şekil 2.3. İnsan NAMPT monomeri ve bölgeleri 9

Şekil 2.4. İnsan NAMPT aktif bölgesi; (A) NMN-aktif bölge etkileşimleri, (B) FK866-aktif bölge etkileşimleri, (C) NMN (mor) ve FK866'nın (mavi) aktif bölgedeki konumlarının üst üste çakıştırılmış hali.....10

Şekil 2.5. NAM'dan NAMPT katalizli NMN oluşumu 11

Şekil 2.6. FK866 kimyasal yapısı.....12

Şekil 2.7. CHS828 (A) ve GMX1777 (B) kimyasal yapıları.....13

Şekil 2.8. TRON-8 kimyasal yapısı 13

Şekil 2.9. IS001 kimyasal yapısı.....14

Şekil 2.10. GPP78 (A) ve eter analoğu (B) kimyasal yapısı.....14

Şekil 2.11. CB30865 kimyasal yapısı 15

Şekil 2.12. Bileşik 1 kimyasal yapısı 15

Şekil 2.13. FK866 ve CHS828 moleküllerinin etkiden sorumlu ortak yapıları.....16

Şekil 2.14. Bileşik 2 kimyasal yapısı 16

Şekil 2.15. CS-Map yazılımı kullanılarak elde edilen farmakofor bölgeler 17

Şekil 2.16. Bileşik 3 kimyasal yapısı ve üç ana etkileşim bölgesi 17

Şekil 2.17. Bileşik 4 kimyasal yapısı 18

Şekil 2.18. Bileşik 5 kimyasal yapısı 19

Şekil 2.19. Bileşik 6 kimyasal yapısı 19

Şekil 2.20. Bileşik 7 kimyasal yapısı 19

Şekil 2.21. GNE-618 kimyasal yapısı 20

Şekil 2.22. Bileşik 8 (A) ve Bileşik 9 (B) kimyasal yapıları.....20

Şekil 2.23. AS1604498 kimyasal yapısı 20

Şekil 2.24. Bileşik 10 kimyasal yapısı 21

Şekil 2.25. Bileşik 11 kimyasal yapısı 21

Şekil 2.26. Bileşik 12 kimyasal yapısı 21

Şekil 2.27. Bileşik 13 kimyasal yapısı 22

Şekil 2.28. F671-0003 kimyasal yapısı 22

Şekil 2.29. MPI-0479626 kimyasal yapısı.....22

Şekil 2.30. Sanal tarama sonucu keşfedilen NAMPT inhibitörleri 23

Şekil 2.31. Bileşik 14 kimyasal yapısı 23

Şekil 2.32. A-1293201 kimyasal yapısı.....24

Şekil 2.33. Bileşik 15 (A) ve Bileşik 16 (B) kimyasal yapıları.....24

Şekil 2.34. LSN3154567 kimyasal yapısı 25

Şekil 2.35. KPT-9274 kimyasal yapısı 25

Şekil 2.36. Bileşik 17 (A), Bileşik 18 (B) ve Bileşik 19 (C) kimyasal yapıları 26

Şekil 4.1. V1-27 moleküllerinin (A) A-ref molekülüne, (B) S-ref molekülüne, (C) U-ref molekülüne hizalanmış gösterimi 37

Şekil 4.2. Farmakofor modellerinin eV bileşenleriyle (sarı) birlikte insan NAMPT aktif bölgesindeki (PDB kodu: 4M6P) konumları (A: Model 1; B: Model 2; C: Model 3; D: Model 4; E: Model 5; F: Model 6) 44

Şekil 4.3. Model 1-3 için çizilen ROC grafikleri 45

Şekil 5.1. Uygulanan sanal tarama prosedürüne ait iş akış şemaları 50

Şekil 5.2. GF4 (A) ve GF8 (B) kimyasal yapıları 51

Şekil 5.3. GF4 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesindeki (PDB kodu: 4JNM) bağlantı modu 51

Şekil 5.4. GF8 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesindeki (PDB kodu: 4JNM) bağlantı modu 52

Şekil 5.5. GF4 (mor) ve GF8 (yeşil) bileşiklerinin insan NAMPT aktif bölgesindeki bağlanma modları ile Model 3 arasındaki uyum.....53

Şekil 5.6. GF1 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesindeki bağlanma modu ile Model 1 arasındaki uyum 53

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklamalar
kDa	Kilodalton
α	Alfa
β	Beta
Å	Angstrom
π	Pi
nM	Nanomolar
µM	Mikromolar
kkal	Kilokalori
µl	Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklamalar
ADMET	Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon, Toksisite
ART	Mono(ADP-Riboz) Transferaz
ATP	Adenozin Trifosfat (Adenosine Triphosphate)
AUAC	Kümelenmiş Eğri Altında Kalan Alan (The Under the Accumulation Curve)
BEDROC	Boltzmann-Geliştirilmiş ROC Ayrımı (Boltzmann-Enhanced Discrimination of the Receiver Operating Characteristic)
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EF	Zenginleştirme Katsayısı (Enrichment Factor)
eNAMPT	Ekstraselüler Nikotinamit Fosforiboziltransferaz

GH	Çıktı İyiliği (Godness of Hit Score)
HTVS	Yüksek Çıktılı Sanal Tarama (High Throughput Virtual Screening)
IC_{50}	%50 Oranında inhibisyon için gerekli inhibitör konsantrasyonu
IDO	İndolamin-2,3-dioksijenaz
iNAMPT	İntraselüler Nikotinamit Fosforiboziltransferaz
NA	Nikotinik Asit
NAAD	Nikotinik Asit Adenin Dinükleotit
NAD^+	Nikotinamit Adenin Dinükleotit
NADH	Redükte Nikotinamit Adenin Dinükleotit
NADP	Fosforile Nikotinamit Adenin Dinükleotit
NADS	Nikotinamit Adenin Dinükleotit Sentaz
NAM	Nikotinamit
NAMN	Nikotinik Asit Mononükleotit
NAMPT	Nikotinamit Fosforiboziltransferaz
NAPRT	Nikotinik Asit Fosforiboziltransferaz
NMN	Nikotinamit Mononükleotit
NMNAT	Nikotinik Asit/Nikotinamit Mononükleotit Adeniltransferaz
NMNH	Redükte Nikotinamit Mononükleotit
NRK	Nikotinamit Ribozit Kinaz
PARP	Poli(ADP-Riboz) Polimeraz
PBEF	Pre-B-hücre Koloni Artırıcı Faktör (Pre-B-cell Colony Enhancing Factor)
PDB	Protein Data Bank
pIC_{50}	%50 Oranında Inhibisyon Için Gerekli Inhibitör Konsantrasyonunun Eksi Logaritması
PNP	Purin Nükleozit Fosforilaz
QAPRT	Kinolinik Asit Fosforiboziltransferaz

RIE	Sağlam Başlangıç İyileştirmesi (Robust Initial Enhancement)
RMSD	Kare Ortalamalarının Karekökündeki Sapma (Root Mean Square Deviation)
ROC	Alıcı Çalışma Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic)
SIRT	Sirtuin
SP	Standart Duyarlılık (Standard Precision)
TDO	Triptofan Dioksijenaz
XP	Ekstra Duyarlılık (Extra Precision)

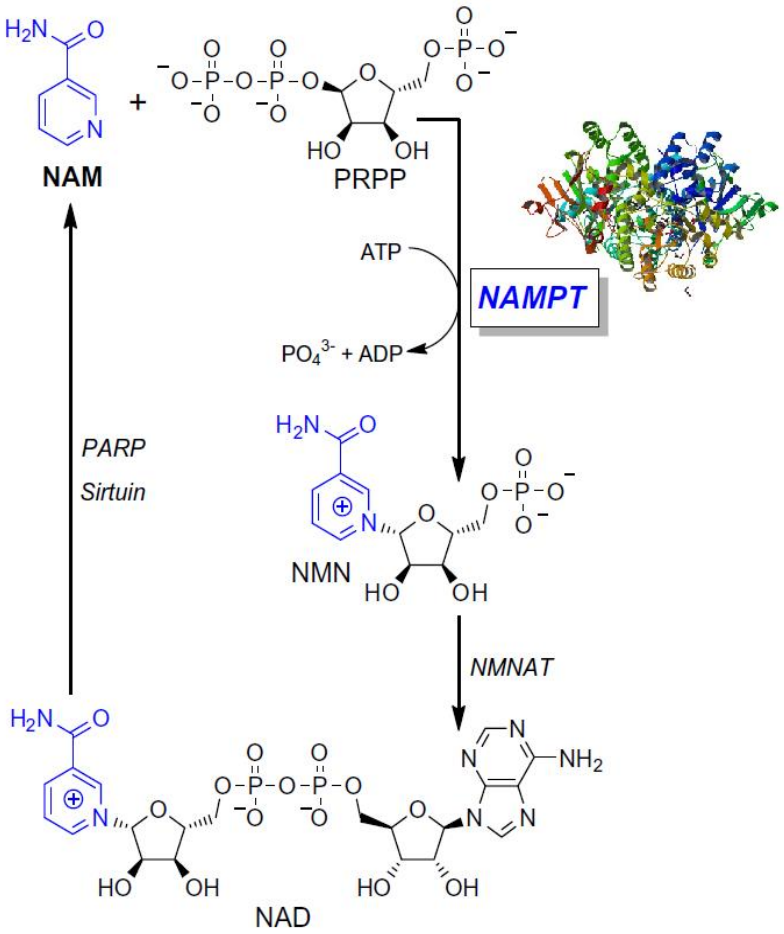
1. GİRİŞ

Nikotinamit adenin dinükleotit (NAD^+) hücre metabolizmasında görev alan önemli bir redoks kofaktörüdür ve başta kanser olmak üzere pek çok hastalık durumunda düzenleyici olarak görev aldığı bilinmektedir. Bu nedenle NAD^+ sentezini hedef alan stratejiler, terapötik açıdan önem taşımaktadır [1].

NAD^+, Poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP), mono(ADP-riboz) transferaz (ART) ve sirtuin (SIRT) gibi enzim aileleri tarafından substrat olarak kullanılmakta [2] ve NAD^+-bağımlı sinyal yolakları gen ekspresyonu, kalsiyum dengesi, hücre döngüsü, DNA tamiri, hücre çoğalması ve immünolojik fonksiyonlar gibi birçok hücresel süreçte önemli bir rol oynamaktadır [1,3].

Kanser hücrelerinde, hızla çoğalmanın gerçekleşebilmesi için adenozin trifosfat (ATP) ihtiyacının artması ve NAD^+-bağımlı enzimlerin artan aktivitesi sonucu, NAD^+ hızlıca tüketilmektedir [4]. Bu nedenle kanser hücreleri, normal hücrelere nazaran NAD^+ varlığına daha duyarlıdır ve hızlıca çoğalmanın sağlanabilmesi için NAD^+ sentezinin sıklıkla tekrarlanması gerekmektedir [5].

Biyokimyasal olarak ökaryotik hücrelerde NAD^+ sentezi için; (i) triptofanın prekürsör olarak kullanıldığı yolak; (ii) nikotinamit (NAM) kaynaklı yolak (Şekil 1.1); (iii) nikotinik asit (NA) kaynaklı yolak olmak üzere üç ana yolak [6] bulunmaktadır. Bu yolaklar arasından NAM'ın prekürsör olarak kullanıldığı yolak, hücresel NAD^+'ın ana kaynağını oluşturmaktadır [7]. Nikotinamit fosforiboziltransferazın (NAMPT) bu yolakta hız limitleyici enzim olduğu dikkate alındığında, NAMPT inhibisyonunun NAD^+ metabolizmasını ve kanser hücresinin aşırı ve zamansız çoğalmasını önemli ölçüde etkilediği görülmüştür [6,7]. Bu nedenle NAMPT, kansere karşı geliştirilen yeni stratejiler arasında ilgi çekici bir hedef haline gelmiştir.



Şekil 1.1. NAD^{+}'ın NAM kaynaklı sentez yolağı

Günümüze kadar literatürde kimyasal yapı olarak çeşitlilik gösteren, etkili NAMPT inhibitör moleküller bildirilmiştir [4,8,9]. Bu moleküller arasından FK866, CHS828 ve ön ilacı GMX1777 insan klinik denemelere girmiştir [10–12]. Fakat sebep oldukları trombositopeni ve çeşitli gastrointestinal yan etkiler, bu moleküllerin klinik denemelerde ilerlemelerine engel olmuştur [13,14]. Bu nedenle, yeni kimyasal yapı iskeletine sahip, etkili NAMPT inhibitörlerine ihtiyaç devam etmektedir.

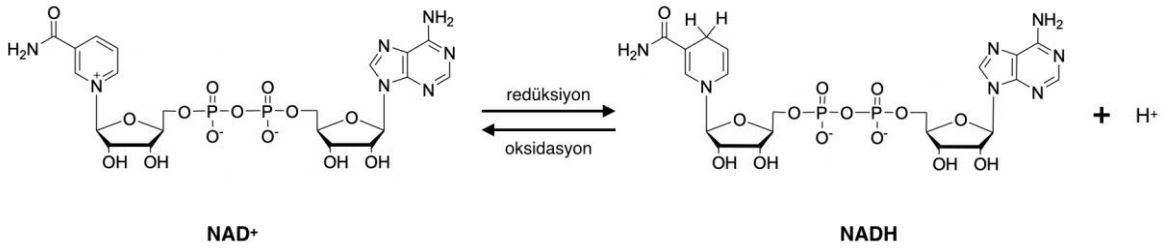
Yüksek lisans tez çalışmamız kapsamında son yıllarda kanser ve metabolik hastalıklarının tedavisi için yeni bir hedef haline gelen NAMPT enzimine karşı inhibitör etkili yeni yapıların keşfi amacıyla literatürde kayıtlı amit, üre ve siyanoguanidin türevi NAMPT inhibitörlerinden yola çıkılarak farmakofor-temelli sanal tarama çalışması yapılmıştır.

Çalışmamız sırasıyla; (i) literatürde NAMPT inhibitör aktivitesi bildirilmiş kimyasal yapıların derlenip veri tabanı oluşturulması, (ii) üç boyutlu yapısı çözümlenmiş insan NAMPT x-ray kristal yapılarının değerlendirilmesi, aktif bölgenin incelenmesi ve enzim yapısının uygulanacak moleküler modelleme teknikleri için uygun hale getirilmesi, (iii) insan NAMPT x-ray kristal yapılarında koligand olarak bulunan inhibitörlerin biyoaktif konformasyonları kullanılarak farmakofor modellerin elde edilmesi ve bu şekilde hem ligandlara ait yapısal özelliklerin hem de reseptör aktif bölgesinden elde edilecek elektrostatik ve sterik özelliklerin bir arada kullanılması, (iv) elde edilen farmakofor modellerin istatistiksel parametreler kullanılarak doğrulanması, (v) doğrulanmış farmakofor modellerin kullanılarak ZINC "drug-like" veri tabanına karşı sanal taraması çalışmasının yapılması, (vi) sanal tarama sonunda ulaşılan moleküllerin çeşitli filtreleme yöntemleri (Lipinski'nin 5 kuralı, sentezlenebilirlik, reaktivite, moleküler docking vb.) kullanılarak elenmesi ve satın alınacak hedef moleküllere ulaşılması, (vii) satın alınan sanal tarama çıktısı moleküllerin *in vitro* NAMPT inhibitör etkilerinin belirlenmesi basamaklarından oluşmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nikotinamit Adenin Dinükleotit (NAD^+) Metabolizması ve Kanser

NAD^+, DNA sentezi için gerekli bir koenzim olmasının yanı sıra, hücresel redoks reaksiyonlarında yer alarak glikoliz, sitrik asit döngüsü, mitokondriyal elektron transportu, oksidatif fosforilasyon ve serin biyosentezi gibi çeşitli metabolik yolaklarda önemli bir rol oynamaktadır. NAD^+ aynı zamanda pek çok NAD^+-bağımlı enzim için substrat görevi yapmakta ve özellikle PARP, SIRT ve ART gibi sinyal iletiminde rol oynayan enzimlerin aktiviteleri için gereklidir [15,16]. Bunun yanında 200'ün üstünde enzim geri dönüşümlü oksido-redüktif özelliklerinden dolayı NAD(H) ve fosforile hali olan NADP(H)'a gereksinim duymaktadır. Bu nedenle, NAD^+ metabolizması (Şekil 2.1) yani NAD^+/NADH oranı, bu enzimlerin aktivitesi üzerinden enerji metabolizması, DNA tamiri, gen ekspresyonu ve stres cevabı ile ilişkilendirilmektedir [17].



Şekil 2.1. NAD^+-NADH dönüşüm reaksiyonu

Glikolize bağımlılığın artması ve PARP, SIRT gibi NAD^+-bağımlı enzimlerin ekspresyon düzeylerinin veya aktivitelerinin yükselmesi malign hücreler için karakteristik bir durum olduğundan, normal hücrelere nazaran NAD^+ duyarlılığı daha fazladır [18]. Bu nedenle kanser hücresi, büyüme ve hızlı çoğalabilme ihtiyacını karşılamak için NAD^+ seviyesini yeniden gerekli düzeye ulaştırması gerekmektedir [4].

NAD^+, memeli hücrelerinde triptofan amino asidinden yeni yolak ile sentezlenebildiği gibi NAM'ın veya NA'nın veya nikotinamit ribozidin prekürsör olarak kullanıldığı üç kurtarma yolağından biri üzerinden de sentezlenebilmektedir [19].

Triptofandan hareketle gerçekleşen yeni sentez yolağında, düşük molekül ağırlıklı moleküllerden çoklu basamak şeklinde gerçekleşen bir seri enzimatik reaksiyon sonucu kinurenin yolağı üzerinden NAD^+ üretimi gerçekleşmektedir. Diyet ile vücuda alınan triptofanın %90'ı, triptofan dioksijenaz (TDO) ve indolamin-2,3-dioksijenaz (IDO) tarafından N-formilkinurenine dönüştürülmektedir. Meydana gelen N-formilkinurenin ise bir seri enzimatik basamak sonucu kinolinik asidi oluşturmaktadır [20,21]. Kinolinik asit, aşamalı olarak kinolinik asit fosforiboziltransferaz (QAPRT), nikotinik asit/nikotinamit mononükleotit adeniltransferaz (NMNAT) ve NAD^+ sentaz (NADS) enzimlerinin katalizi ile NAD^+ sentezlenmektedir [5].

Hücresel NAD^+ seviyesini artırmak için kullanılan diğer bir yolak, NA bağımlı Preiss-Handler yolağıdır. Diyet ile alınan NA, nikotinik asit fosforiboziltransferaz (NAPRT) aracılığı ile nikotinik asit mononükleotide (NAMN) ve daha sonra NMNAT sayesinde adenillenerek nikotinik asit adenin dinükleotide (NAAD) dönüşmektedir. Oluşan NAAD'den NADS aracılığıyla NAD^+ meydana gelmektedir [21].

Nikotinamit riboziten hareketle NAD^+ sentezlenen kurtarma yolağı; (i) nikotinamit ribozit kinaz (NRK) enziminin ATP kullanarak nikotinamit riboziti fosforillemesi ve nikotinamit mononükleotidi (NMN) oluşturması, (ii) purin nükleozit fosforilaz (PNP) enziminin nikotinamit ribozit yapısındaki glikozidik bağı kırmasıyla NAM'ın serbest hale geçmesi, serbest hale geçen NAM'ın NAMPT ile NMN'ye dönüşmesi şeklinde iki farklı basamak üzerinden yürüyebilmektedir [22,23]. Her iki basamak, NMNAT tarafından katalizlenen dinükleotit oluşumu sonucu NMN'nin NAD^+'a dönüştürüldüğü son basamakta birleşmektedir [21]. Memelilerde üç izoformu olan NMNAT [24], çekirdekte, golgi kompleksinde, sitoplazmada ve sınırlı bir oranda mitokondride bulunmaktadır. NMNAT1-3, NMN'nin okside veya redükte formlarının (NMNH) her ikisini de NAD^+ veya NADH sentezi için kullanmaktadır [25].

Bazı kanser hücreleri, triptofan-NAD^+ dönüşümünden sorumlu olan enzimlerinden en az biri eksik olduğunda yeni yolaktan faydalanarak NAD^+ sentezleyemezler [26,27]. Bunun yanında, bazı kanser hücrelerinde NAPRT ekspresyonunun eksikliği nedeniyle Preiss-Handler yolağı da sıklıkla inaktif haldedir [27–29]. NAPRT ekspresyonu olan kanser

hücreleri ise sistemik NA seviyeleri NAD^+ üretimi için yetersiz olduğundan NA-bağımlı sentez yolağını etkin bir şekilde kullanamamaktadır [30]. Bu nedenle bu tip kanser hücreleri, NAD^+ seviyelerini gerekli düzeyde tutabilmek için NAMPT enziminin hız limitleyici enzim olduğu sentez yolağına bağımlıdırlar [27,29,31].

2.2. Nikotinamit Fosforiboziltransferaz (NAMPT)

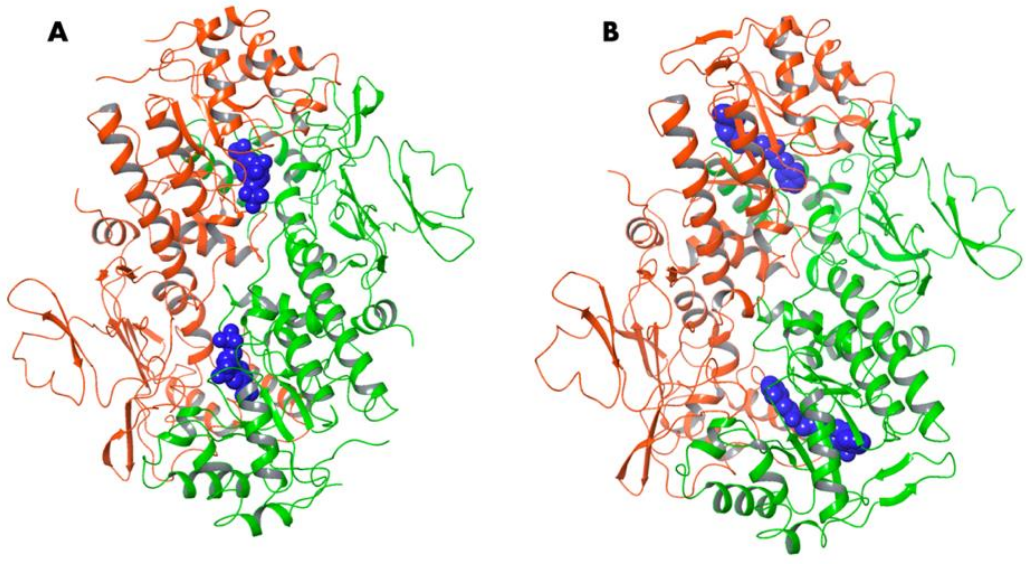
İnsan NAMPT enzimi, yaklaşık 55 kDa moleküler ağırlığına sahip, 491 amino asit içeren dimerik tip II fosforiboziltransferaz sınıfına mensup bir enzimdir [32,33]. Memelilerde NAM'ın deaminasyon üzerinden NA'ya dönmesi yerine, doğrudan NMN'ye çevrilmesini sağlayan NAMPT'ın NAD^+ biyosentetik enzimi olduğu bilgisi ilk olarak 1957 yılında Preiss ve Handler tarafından bildirilmiştir [34]. Bakteri ve omurgalılar arasında hiçbir organizmada belli bir NAMPT homoloğuna rastlanmamıştır [35]. Bakteriyel NAMPT'ı kodlayan *NadV* geni, ilk olarak 2001 yılında *Haemophilus ducreyi*'den izole edilmiş ve gen ürününün pre-B-hücresel koloni dönüşümünün artması üzerinde büyüme faktörü benzeri etkiye sahip olan insan pre-B-hücre koloni artırıcı faktöre (human pre-B-cell colony-enhancing factor, PBEF) anlamlı bir benzerlik taşıdığı bulunmuştur [36]. PBEF'nin memeli NAD^+ biyosentezinde NAMPT benzeri bir fonksiyonu olduğu da gösterilmiştir [37]. Daha sonra pek çok çalışma grubu NAMPT/PBEF'nin sitokin benzeri işlevlerini bildirmiştir. Bu yeni işlevler arasında en tartışmalı olanı, NAMPT'ın insülinmimetik etkilerinden dolayı visseral yağ dokusu kaynaklı bir hormon olan visfatin olarak tanımlanmasıdır. Bunun üzerine, NAMPT/PBEF/visfatin ile obezite ve tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıklarla ilişkisini inceleyen pek çok çalışma yapılsa da elde edilen sonuçlar birbiriyle tutarlı olmadığından bu proteine özgü daha hassas bir yöntem geliştirilip tekrar incelenmesi gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca, NAMPT/PBEF/visfatin isimlendirilmesinde karışıklık yaşanmaması adına, bu protein ve gen için resmi ismin NAMPT olmasına HUGO Gen Nomenklatür Komitesi (HGNC) ve Fare Genomik Nomenklatür Komitesi (MGNC) tarafından karar verilmiştir [38].

NAMPT, memelilerde intraselüler (iNAMPT) ve ekstraselüler (eNAMPT) olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. Sitoplazmada, çekirdekte ve kesin olmamakla beraber mitokondride bulunan iNAMPT formu, NAM'dan başlayan NAD^+ biyosentez yolağının esas

enzimi olarak tanımlanırken, plazmada bulunan eNAMPT formu ise PBEF ve visfatin veya ekstraselüler NAD^+ biyosentetik enzimi olarak tanımlanmaktadır. iNAMPT, çeşitli immün ve metabolik hastalıkların patogenezinde rol oynamakta, özellikle kolorektal, meme ve mide kanserlerinde upregüle veya overeksprese olduğu bilinmektedir [39]. Sitokin benzeri etki gösteren eNAMPT da immün sistemin düzenlenmesinde görev almakta ve sirküle eden miktarının romatoid artirit gibi enflamasyon durumlarında arttığı görülmektedir [40]. Ayrıca adiposit, hepatosit, miyosit, nöron gibi hücreler dışında kanser hücrelerinden de salındığı bilinen eNAMPT formunun, özellikle hepatoselüler kanserde rol oynadığı düşünülmektedir [41].

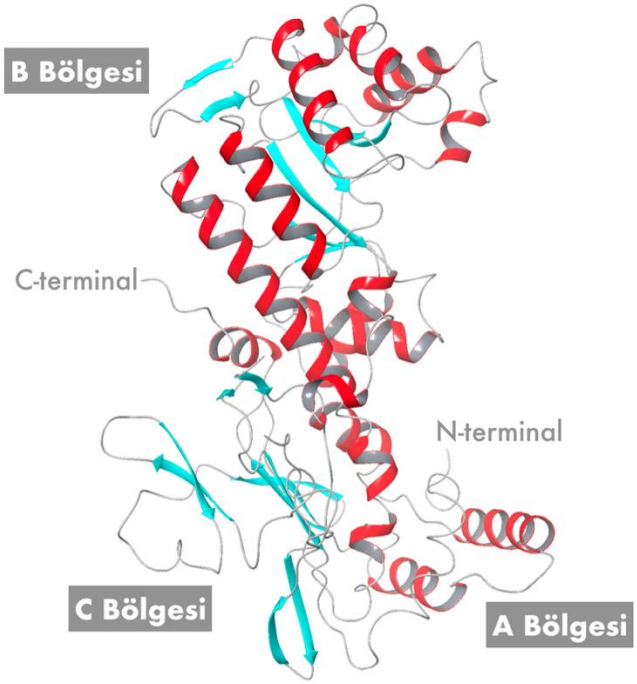
Tip II fosforiboziltransferaz enzim sınıfına ait *Thermoplasma acidophilum* kaynaklı NAPRT ve *Mycobacterium tuberculosis* kaynaklı QAPRT enzimleri yapısal olarak insan NAMPT enzimine benzemektedir [42,43]. Fare ve insan NAMPT enzimleri ise %90 oranında benzerlik göstermektedir [33]. NAMPT homologları üst üste çakıştırıldığında, aktif bölgeyi oluşturan amino asit kalıntılarının büyük ölçüde korunduğu görülmektedir [33].

İnsan NAMPT enziminin üç boyutlu yapısı ilk kez 2006 yılında Khan ve arkadaşları tarafından x-ray kristallografisi ile çözümlenmiş, NMN (PDB kodu: 2GVG) ve NAMPT inhibitörü FK866 (PDB kodu: 2GVJ) bağlı komplekslerinin x-ray kristal yapıları bildirilmiştir [44] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. İnsan NAMPT x-ray kristal yapıları: (A) PDB kodu: 2GVG , (B) PDB kodu: 2GVJ (A zinciri turuncu ile, B zinciri yeşil ile, NMN ve FK866 mavi ile gösterilmiştir).

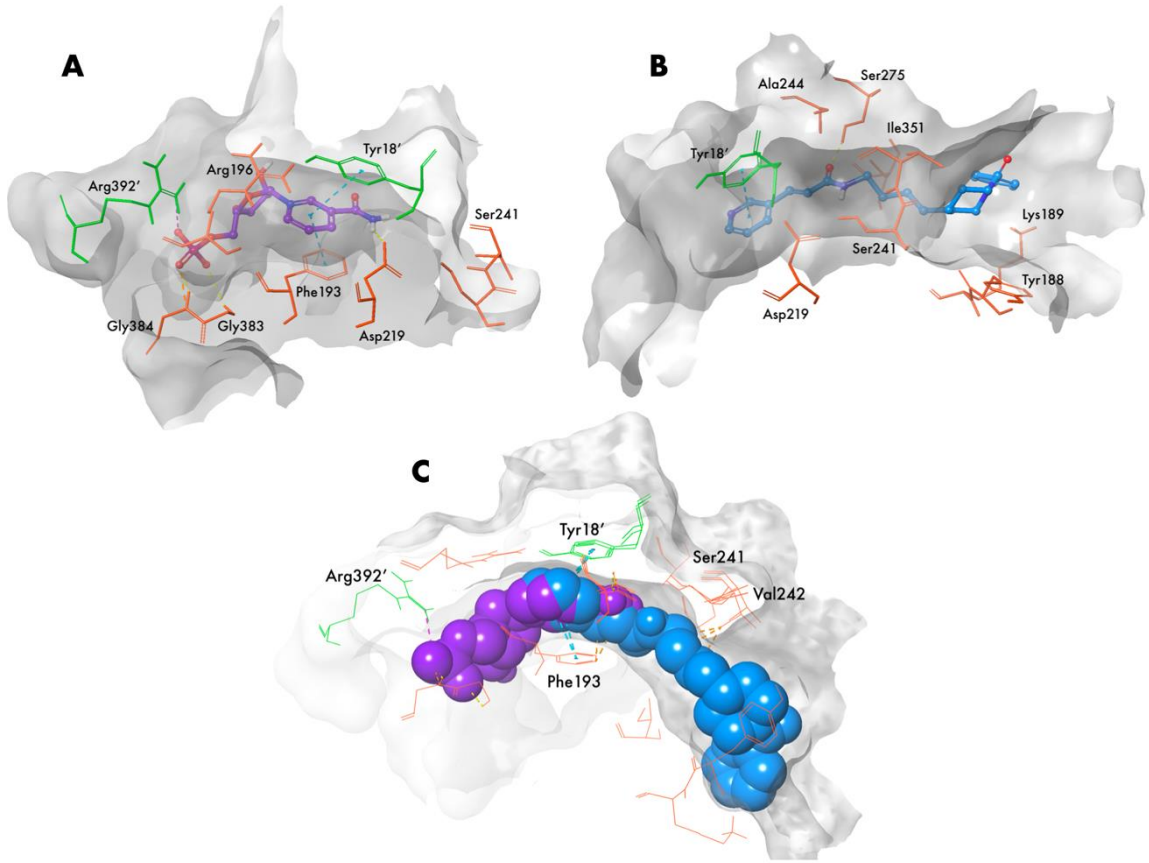
Homodimer yapıdaki NAMPT enziminin yaklaşık 4200 Å yüzey alanına sahip ve A, B ve C olmak üzere üç bölgeye bölünen her bir monomeri, 22 β-iplikçik ve 15 α-sarmalı içermektedir (Şekil 2.3). A bölgesi, 7 β-iplikçikli antiparalel düzlem ile 5 α-sarmalından oluşmaktadır. B bölgesi, 7 β-iplikçikli bir çekirdek içermektedir. Sarmal α-6, A ve B bölgeleri arasındaki bağlantıyı kurmaktadır. C bölgesi ise, 3 β-iplikçikli antiparalel düzlem içeren bölgedir [33].



Şekil 2.3. İnsan NAMPT monomeri ve bölgeleri

NAMPT enziminin dimerik ara yüzünde iki aktif bölge bulunmaktadır (Şekil 2.2) ve bu dimerizasyon katalitik aktivite için gerekmektedir. Ara yüz, her bir alt ünitenin on segmentinden oluşmaktadır. Eşit oranda dağılım gösteren 89 adet polar ve hidrofobik özellikteki amino asitin bulunduğu [33,45] dimerik ara yüzde, 15x6 Å boyutunda uzun ve dar bir tünel yer almaktadır. Ara yüz boyunca huni şeklindeki bir açıklığa uzanan bu tünelin girişinde, NAM bağlanma bölgesi bulunmaktadır [8]. İnhibitör moleküller tünele bağlanarak NAM substratının aktif bölgeye bağlanmasını engellemektedir. Dimer ara yüzde bulunan tünelin şekli nedeniyle her molekül bu tünele girememektedir [44] (Şekil

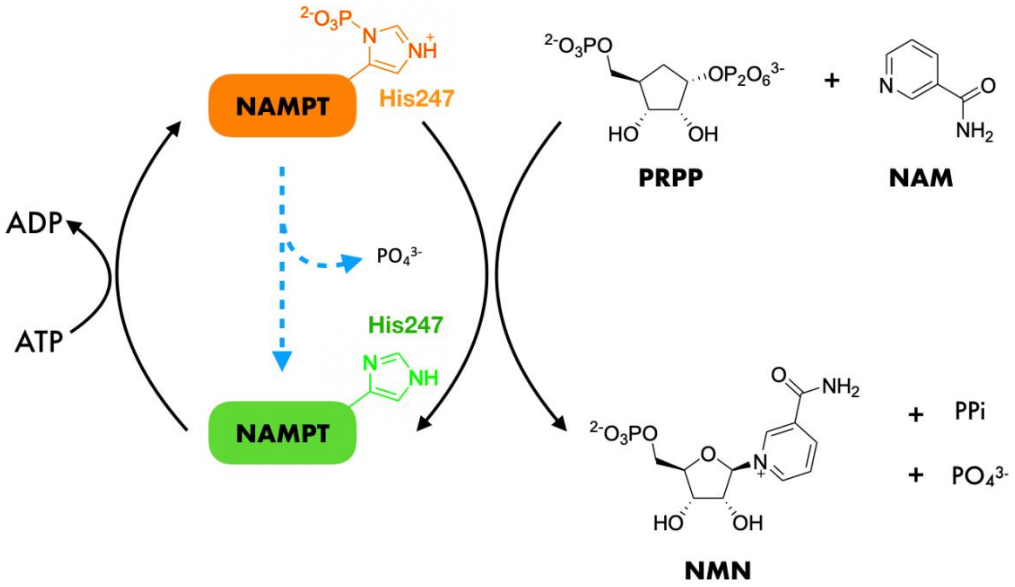
2.4). NAMPT aktif bölgesinde, inhibitör moleküllerin bağlanmasını sağlayan polar ve hidrofobik özellikte amino asitler bulunmaktadır. Aktif bölgenin bir ucunda bulunan NAM bağlanma bölgesinde NAM yapısındaki piridin halkası ile π-π etkileşimleri gösteren Tyr18' ve Phe193 amino asitleri bulunmaktadır. Aktif bölgenin orta kısımlarında hidrojen bağı yapabilecek Arg311, Ser241, Ser275, Asp219 ve Val242 amino asitleri, aktif bölgenin diğer ucunda ise alkil yan zincirleri ile hidrofobik etkileşimler gösterebilecek Ala379, Ile351, Ile309, Pro273 aminoasitleri ve hidrojen bağı yapabilecek Val350, Tyr188 amino asitleri yer almaktadır [44].



Şekil 2.4. İnsan NAMPT aktif bölgesi; (A) NMN-aktif bölge etkileşimleri, (B) FK866-aktif bölge etkileşimleri, (C) NMN (mor) ve FK866'nın (mavi) aktif bölgedeki konumlarının üst üste çakıştırılmış hali

NAMPT, riboz grubunun geri dönüşümlü olarak PRPP'den NAM'a transferini katalizleyerek NMN oluşturmaktadır. Aktif bölgede bulunan His247 amino asitinin ATP-fosforilasyonu NAMPT enziminin katalitik aktivasyonuna yol açmakta ve böylece NAM yani substrat afinitesi 160000 kat, enzim aktivitesi ise 1100 kat artmaktadır [46]. His247 fosforilasyonu

ile meydana gelen NAMPT aktivasyonu, enzim-PRPP kompleksinin daha kararlı olmasına ve NAM bağlanmasının daha verimli olmasına olanak sağlamaktadır [47] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. NAM'dan NAMPT katalizli NMN oluşumu

NAMPT katalitik aktivitesinin ATP-bağımlı olmamasına rağmen ATP hidrolizi ile NMN sentezini birleştirebilme özelliğine sahiptir. NAMPT, ATP hidrolizi sırasında daha verimli çalışmaktadır. Bu sayede NMN oluşumundaki istenmeyen termodinamik dengenin üstesinden gelinmekte, ATP yokluğuna göre 35 katı fazla konsantrasyonlarda NMN oluşumunu sağlayan bir enzimatik sistem meydana gelmektedir [47].

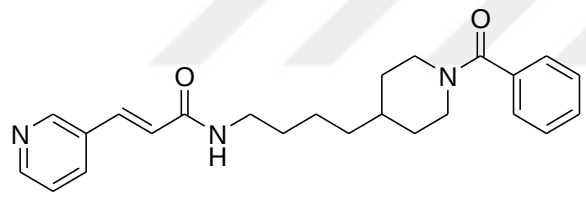
2.3. NAMPT İnhibitörleri

NAMPT enzimi, başta hücre yaşamı üzerinde önemli bir rol oynayan NAD^+ sentezi ile enerji sağlama olmak üzere pek çok biyolojik fonksiyona sahiptir. Hücresel patofizyolojik süreçlerdeki önemi, tümör oluşumu ve gelişimi ile de yakından ilişkilendirilmiştir [48]. Kolorektal, ovaryum, meme, mide, prostat, tiroit, endometriyum karsinomları, miyelom, melanom, gliom ve astrositom gibi çeşitli insan malign tümörlerinin yanı sıra büyük B-hücreli lenfoma, foliküler B-hücreli lenfoma, Hodgkin lenfoma ve periferal T-hücreli lenfoma gibi malign lenfomalarda da NAMPT ekspresyonunun aşırı olduğu gözlenmiştir [41]. NAMPT inhibisyonunun tümör büyümesini azalttığı ve apoptozu indüklediği

görülmüştür. Bu nedenle, NAMPT etkili ve yeni antikanser ajanların geliştirilmesi için ümit vaad eden bir hedef haline gelmiştir [49].

NAMPT inhibitörleri ile ilgili ilk çalışmalar 1972 yılında başlamıştır ve bir seri piridin bazının ve NAM analoğunun fare karaciğer NAMPT'ı üzerinde inhibe edici etkisi olduğu belirlenmiştir. Fakat bu çalışmalar, saf enzim olmaması, mekanizmanın tam olarak aydınlatılmamış olması gibi nedenlerden dolayı sınırlı düzeyde kalmıştır [50].

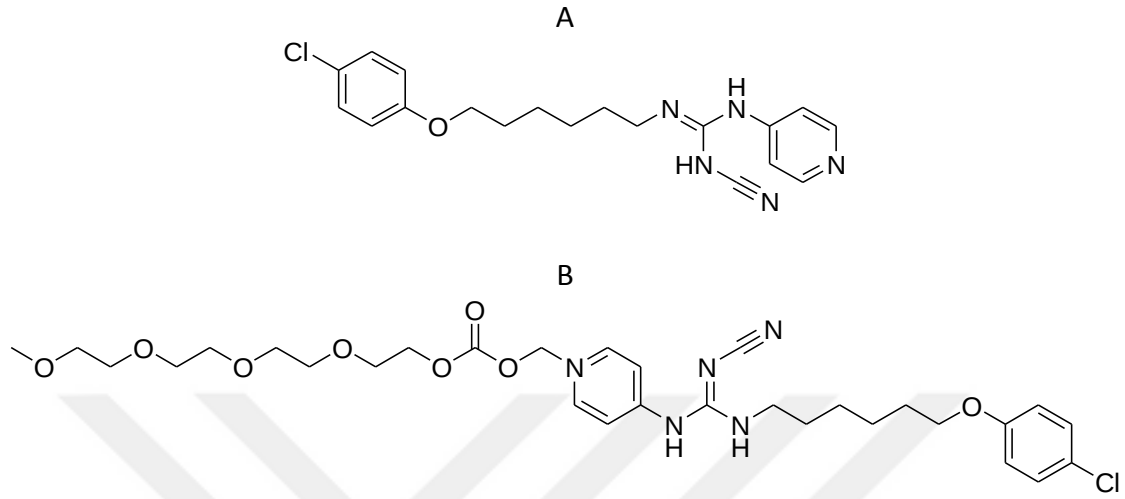
2002 yılında ilk NAMPT inhibitörü FK866 (Şekil 2.6) keşfedilmiştir (IC_{50}<10 nM). İlk çalışmalarda FK866'ın enzim üzerinde nonkompetitif inhibisyon yaptığı düşünülmüş, fakat 2006 yılında kompetitif bir inhibitör olduğu bildirilmiştir [44]. Aynı çalışma sonunda insan ve fare kaynaklı NAMPT enziminin apo formunun, NMN bağlı ve FK866 bağlı komplekslerinin yapıları x-ray kristallografisi ile çözümlenmiştir [44]. FK866-NAMPT afinitesinin NAM ve NMN afinitesinden daha fazla olduğu bildirilmiştir [45].



Şekil 2.6. FK866 kimyasal yapısı

Aynı zamanda FK866'nın NAMPT inhibisyonu ile insan HepG2 karaciğer karsinoma hücrelerinde apoptozu indüklediği gözlenmiştir [10]. 2009 ve 2010 yılında yapılan çalışmalarda ise FK866'nın primer lösemi hücrelerinde ve lenfoma hücrelerinde hücre ölümlerine neden olduğu, renal karsinoma hücrelerinde antimetastatik ve antitümör özelliklerinin olduğu bildirilmiştir [51,52].

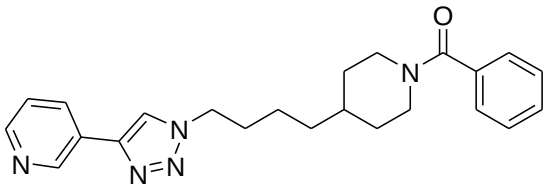
2008 yılında antihipertansif olarak geliştirilen piridil siyanoguanidin yapısındaki CHS828'in (Şekil 2.7) daha sonra NAMPT inhibitör etkisi olduğu da bildirilmiş [31], intravenöz uygulama yapılabilmesi amacıyla ön ilacı GMX1777 (Şekil 3.2) geliştirilmiştir [12].



Şekil 2.7. CHS828 (A) ve GMX1777 (B) kimyasal yapıları

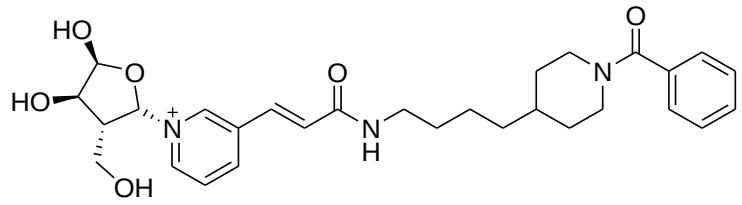
FK866, kutanöz T-hücreli lenfoma, melanoma ve B-kronik lenfositik lösemi gibi kanser türlerine karşı, CHS828 ise metastazik melanoma için faz-I/II klinik denelemelere bulunmuş fakat kanser hücrelerinde NAMPT ve/veya NAD^+ sentezini güçlü bir şekilde inhibe ederek hücre ölümünü indükleseler de doz sınırlayıcı toksisite nedeniyle kanser hastalarında sürekli bir etki oluşturamamışlardır. Trombositopeni ve gastrointestinal toksisite en yaygın yan etkileri olarak belirlenmiştir [13,14].

2008 yılında Galli ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, FK866 yapı analogları geliştirmek amacıyla FK866 molekülündeki amit grubu yerine biyoizosteri triazol grubunun getirilmesiyle bir seri molekül tasarlanmış ve FK866'ya en yakın etki gösteren molekülün TRON-8 (Şekil 2.8) olduğu bildirilmiştir [53].



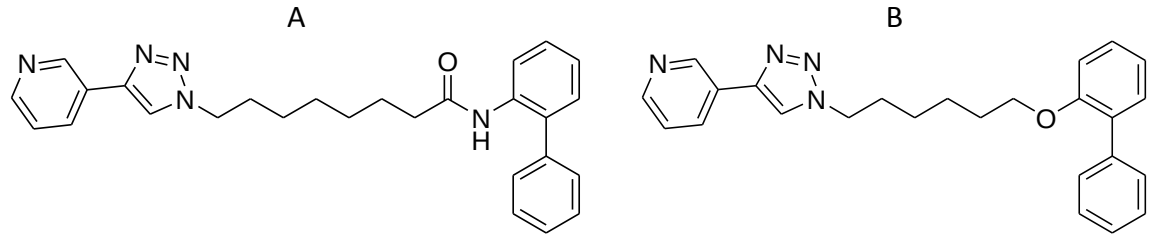
Şekil 2.8. TRON-8 kimyasal yapısı

2009 yılında Kang ve arkadaşları, FK866 yapısındaki piridin halkasına riboz grubunu ekleyerek IS001 (Şekil 2.9) molekülünü elde etmiş fakat riboz halkasının moleküle ait çözünürlük ve enzim etkileşimi özelliklerini geliştirmediğini bildirmişlerdir [54].



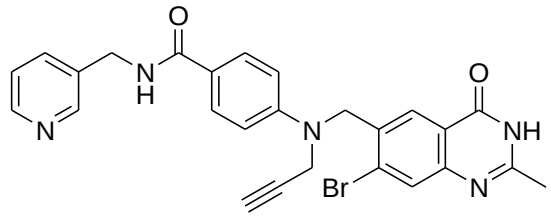
Şekil 2.9. IS001 kimyasal yapısı

2010 yılında triazol içeren bir seri yeni FK866 analogları sentezlenmiş ve bunlardan bazılarının çeşitli kanser hücrelerinde sitotoksik etkisi olduğu ve NAD^+ seviyesinde azalma meydana getirdiği gösterilmiştir [55]. Daha sonraki yıllarda sentezlenen bu moleküllerden GPP78'in (Şekil 2.10) suda çözünürlüğünün az olması ve *in vitro* stabilitesinin düşük olması nedeniyle molekül üzerinde çeşitli değişiklikler yapılmıştır. Triazol halkası yerine çeşitli heteroaromatik halkalar; amit grubu yerine ise hidrolize daha dayanıklı eter, ters amit, sülfonamit gibi gruplar kullanılarak sitotoksik aktiviteleri ölçülmüştür. Triazol halkasının çeşitli başka halkalar ile değiştirilmesinin aktiviteyi azalttığı görülmüştür. Yeni GPP78 analogları arasında eter grubu içeren molekülün (Şekil 3.5) hem etkili bir NAMPT inhibitörü (IC_{50}=3.8 nM) olduğu hem de metabolik olarak stabilitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir [56].



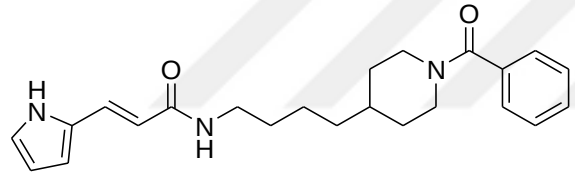
Şekil 2.10. GPP78 (A) ve eter analoğu (B) kimyasal yapısı

2010 yılında yapılan başka bir çalışmada, daha önce sitotoksik etkisi olduğu bilinen CB30865 kodlu molekülün (Şekil 2.11) NAMPT enzimini nanomolar düzeyde inhibe ettiği gösterilmiştir [57].



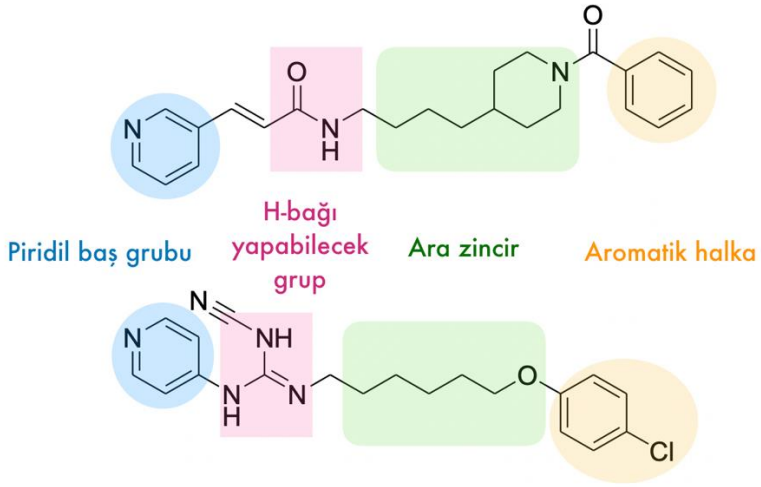
Şekil 2.11. CB30865 kimyasal yapısı

2011 yılında You ve arkadaşları, FK866 yapısındaki piridin halkası yerine aktif bölgede riboz grubu gibi etkileşim gösterebilen basit heteroaromatik halka kombinasyonları denemişlerdir [45,54,58]. En aktif FK866 analoğu olan Bileşik 1 (IC_{50}=1.4 µM) (Şekil 2.12) lösemi hücrelerine karşı FK866'dan (IC_{50}>20 µM) daha iyi bir sitotoksik etki göstermiş, bunun nedeninin de pirol halkasının azot atomunun aktif bölgede Asp219 ile gösterdiği ek etkileşimler olduğu öne sürülmüştür [58].



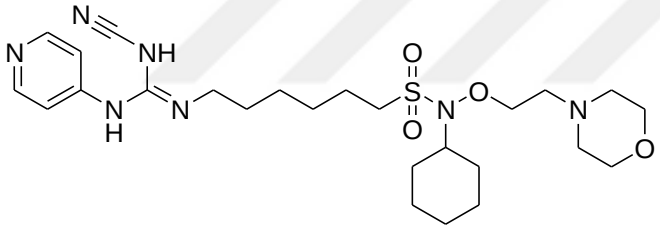
Şekil 2.12. Bileşik 1 kimyasal yapısı

2013 yılında Christensen ve arkadaşları, FK866 ve CHS828 moleküllerinin NAMPT ile etkileşimde önemli olduğu düşünülen ortak kimyasal yapılarından yola çıkarak yeni NAMPT inhibitörleri tasarlamışlar, sentezlenen bileşikleri kullanarak bir yapı-aktivite çalışması yapmışlardır. Yapı-aktivite çalışmaları için CHS828 molekülündeki aromatik halka yerine hidroksamik asit esterleri; piridil baş grubu yerine fenil ve piridil türevleri; hidrojen bağı yapabilecek fonksiyonel grup yerine siyanoguanidin, skuarik asit ve üre; ara zincirde ise karbon zincirinin optimizasyonu ve zincir sonuna üre veya skuarik asit eklenmesi gibi çeşitli modifikasyonlarla bir seri molekül sentezlenmiştir (Şekil 2.13) [18].



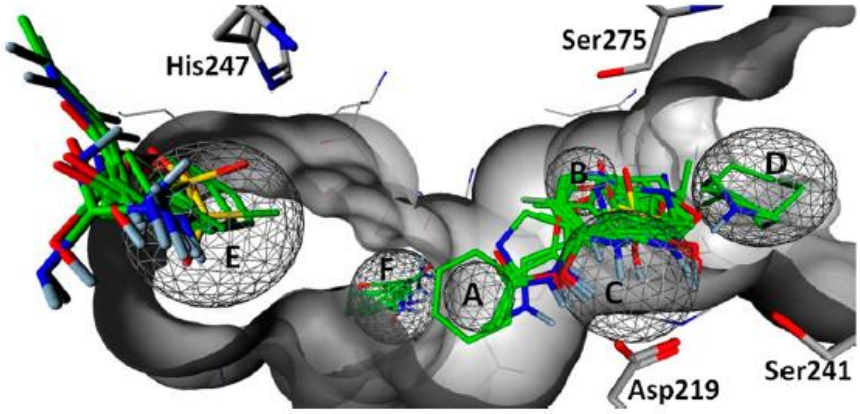
Şekil 2.13. FK866 ve CHS828 moleküllerinin etkiden sorumlu ortak yapıları

Bu çalışmada elde edilen yeni molekül Bileşik 2 (Şekil 2.14), çeşitli kanser hücrelerinde *in vivo* ve *in vitro* ortamda FK866 ve CHS828 moleküllerinden daha iyi antiproliferatif etki göstererek nanomolar seviyede NAMPT inhibisyonu gerçekleştirdiği bildirilmiştir [18].



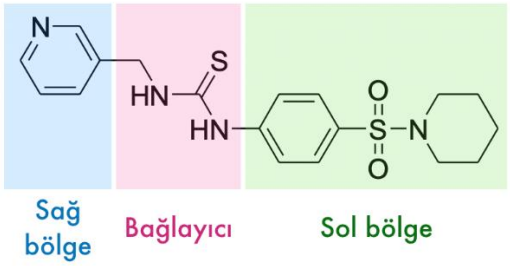
Şekil 2.14. Bileşik 2 kimyasal yapısı

2013 yılında Zheng ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, FK866 yapısındaki piperidin halkasının NAM bağlanma bölgesi ile çakışması nedeniyle bu bölgenin kompetitif inhibisyon için bir hedef olabileceği, bununla beraber ATP bağlanma bölgesi ile de NAM ve PRPP bağlanma bölgelerinin çakıştığı bildirilmiştir. CS-Map yazılımı kullanarak çakışan bölgeleri de içeren altı adet farmakofor bölge (A: piridin, B: hidrojen bağı akseptörü, C: hidrojen bağı donörü, D: herhangi bir halka, E: herhangi bir polar atom, F: herhangi bir polar atom) tanımlanmıştır (Şekil 2.15) [59]. A, B ve C farmakofor gruplarının dahil olduğu üç farklı farmakofor model (ABCD, EABC ve FABC) ile sanal tarama çalışması gerçekleştirilmiş, ABCD farmakofor modeli ile ulaşılan moleküllere ait NAMPT inhibitör aktivitelerinin en iyi olduğu bildirilmiştir.



Şekil 2.15. CS-Map yazılımı kullanılarak elde edilen farmakofor bölgeler [59]

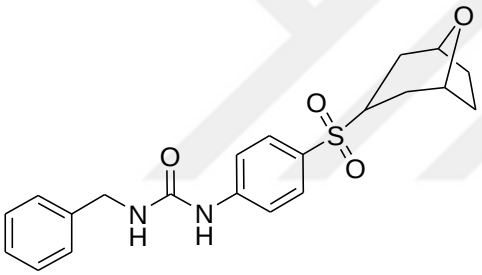
ABCD farmakofor modeli ile ulaşılan sanal tarama çıktılarından Bileşik 3'ün (Şekil 3.11) NAMPT inhibisyonunu nanomolar düzeyde (NAMPT IC_{50}=7 nM) gerçekleştirdiği bildirilmiş ve Bileşik 3 lider bileşik olarak seçilmiştir. Bu bileşiğin NAMPT etkileşimlerinin daha iyi anlaşılabilmesi ve yapı-aktivite çalışmaları ile yeni moleküllere ulaşılması amacıyla NAMPT:Bileşik 3 kompleksinin x-ray kristali elde edilmiştir (PDB kodu: 4JR5). Elde edilen kompleksten yola çıkılarak NAMPT inhibitörleri için üç ana gruptan oluşan genel bir yapı belirlenmiş (Şekil 2.16) ve bu gruplar üzerinde yapılan modifikasyonlarla yeni NAMPT inhibitörlerine ulaşmak amaçlanmıştır [59].



Şekil 2.16. Bileşik 3 kimyasal yapısı ve üç ana etkileşim bölgesi

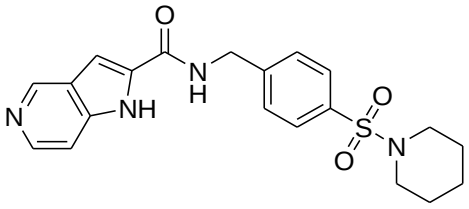
Sol bölgede bulunan piridil grubu fenil halkası ile yer değiştirildiğinde aktivitede düşüş gözlenmiş, fakat azot atomu aromatik halkanın dışında olduğunda aktivitede düşüş olmamıştır. Piridin halkasının elektronca fakir olması nedeniyle yerine konulan fenil halkasının farklı konumlarına flor eklenmiş fakat aktivitede düşüş meydana gelmiştir. Piridin halkası üzerinde yapılan değişiklikler sonucu nükleofilik azot atomunun sol bölgede aktivite için önemli olduğu anlaşılmış ve PRPP ile etkileşim için gerekli olduğu

düşünülmüştür. NAMPT:Bileşik 3 kompleksinin yapısına göre Bileşik 3'ün bağlayıcı bölgesinde bulunan tiyoüre grubunun kükürt atomu Ser275 amino asidi ile hidrojen bağı yapmadığı için daha uygun bir bağlanma geometrisi oluşturacağı düşünülen üre ile değiştirilmiş ve aktivitede artış gözlenmiştir. Daha sonra üre fonksiyonel grubunun piridin halkasına uzaklığı değiştirilmiş ve optimal uzaklığın bir karbon sayısı kadar olduğu anlaşılmıştır. Sağ bölgede bulunan fenil halkasının dar bir bölgede bulunması nedeniyle meta ve orto konumlarda bulunan sübstitüentlerin sterik olarak aktif bölgeye yerleşmeyi engellediği düşünülmüştür. Sülfon grubu ise eter, keton ve amit grupları ile yer değiştirildiğinde aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Terminal bölgede bulunan piperidin grubu çeşitli gruplar ile değiştirilmiş ve sonuç olarak çözünürlük, aktivite ve mikrozomal stabilite açısından ulaşılan en uygun molekülün Bileşik 4 (NAMPT IC_{50}=0.007 µM) (Şekil 2.17) olduğu bildirilmiştir [59].



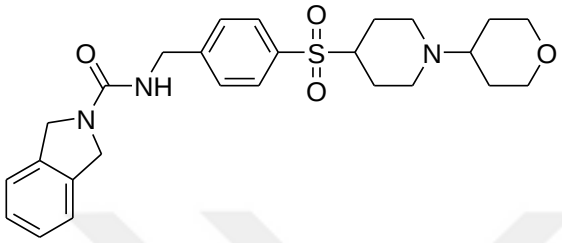
Şekil 2.17. Bileşik 4 kimyasal yapısı

NAMPT:Bileşik 3 kompleksine ait x-ray kristal yapısı incelendiğinde, Bileşik 3'ün taşıdığı tiyoüre grubunun Asp219 ve Ser241 ile su-aracılı hidrojen bağı yaptığı görülmektedir. Bu amino asitlerle doğrudan hidrojen bağı oluşturmak ve böylece daha sıkı bir bağlanma sağlamak amacıyla tiyoüre, azaindol halkasına bağlı amit grubu ile değiştirilmiştir. Fenil halkası ile amit grubu arasına metilen grubu eklenerek Bileşik 5 (NAMPT IC_{50}=9 nM) (Şekil 2.18) elde edilmiş, NAMPT ile oluşturduğu kompleksin x-ray kristali yayınlanmıştır (PDB kodu: 4KFN) [60].



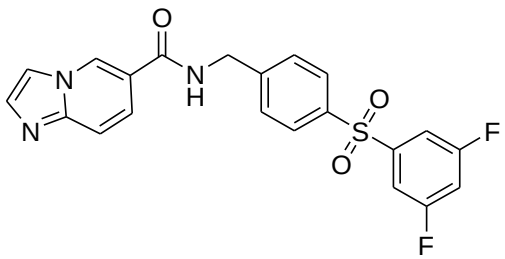
Şekil 2.18. Bileşik 5 kimyasal yapısı

Üre türevi NAMPT inhibitörlerinin suda çözünürlüklerinin az olması nedeniyle iç/dış hidrojen bağ özelliklerini değiştirmek amacıyla 2,3-dihidro-1*H*-pirolo[3,4-c]piridin yapısında üre türevi moleküller elde edilmiştir. Bu moleküller arasında Bileşik 6 ile (NAMPT IC_{50}=0.010 μM) (Şekil 2.19) çözünürlük sorununun çözüldüğü bildirilmiştir [61].



Şekil 2.19. Bileşik 6 kimyasal yapısı

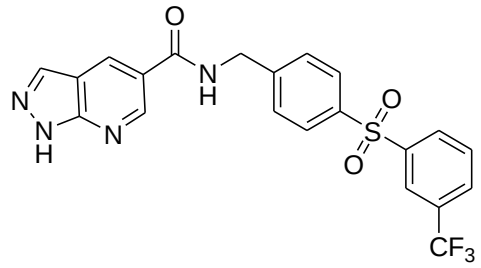
Yapı-aktivite çalışmaları ile azaindol halkası yerine farklı 5(6)-heterosiklik halkalar içeren çeşitli moleküllere ulaşılmış, bu moleküller arasında imidazolopiridin halkası içeren sülfon türevi Bileşik 7'nin (NAMPT IC_{50}=0.005 μM) (Şekil 2.20) çeşitli insan tümör hücrelerine karşı *in vivo* ve *in vitro* ortamda sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir [60].



Şekil 2.20. Bileşik 7 kimyasal yapısı

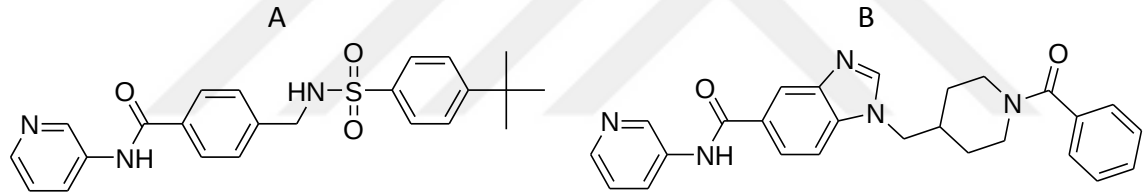
NAM-NAD^+ dönüşümünün inhibe edilmesinin retinal dokuya zarar verebileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [62]. Bu nedenle Zheng ve arkadaşları, retinal penetrasyonu azaltmak için daha az bazik özellikte indazol türevi moleküller elde etmişler, bu moleküllerden yola çıkılarak yapılan yapı-aktivite çalışmaları için 1*H*-pirazolo[3,4-b]piridin türevi çeşitli sülfonamit ve biaril sülfon yapısında moleküller geliştirmişlerdir. Biaril sülfon yapısındaki GNE-618 bileşiğinin (Şekil 2.21) nanomolar seviyede hem biyokimyasal ve

hücresel olarak NAMPT inhibisyonu (NAMPT IC_{50}=0.0061 µM) yaptığı hem de retinal toksisitenin imidazopiridin türevlerine göre daha az olduğu bildirilmiştir [63].



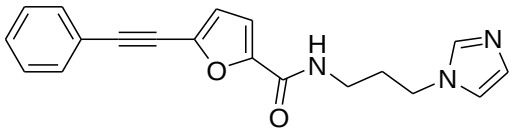
Şekil 2.21. GNE-618 kimyasal yapısı

Daha önce keşfedilen etkili NAMPT inhibitörlerine göre yapısal olarak farklı moleküllerin keşfi amacıyla Dragovich ve arkadaşları, bir seri 3-aminopiridin türevi molekül elde etmişler, bu moleküllerden Bileşik 8 (NAMPT IC_{50}=19 nM) ve Bileşik 9'un (NAMPT IC_{50}=15 nM) (Şekil 2.22) güçlü NAMPT inhibitörü olduğunu bildirmişlerdir [64].



Şekil 2.22. Bileşik 8 (A) ve Bileşik 9 (B) kimyasal yapıları

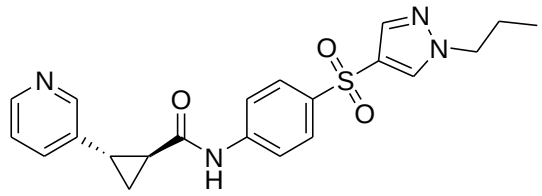
2014 yılında yapılan bir çalışmada, NAMPT:FK866 kompleksi ile elde edilen farmakofor model kullanılarak yapılan sanal tarama çalışması sonucu etkili bir NAMPT inhibitörü olan AS1604498 bileşiğine (NAMPT IC_{50}=44 nM) (Şekil 2.23) ulaşılmıştır [65].



Şekil 2.23. AS1604498 kimyasal yapısı

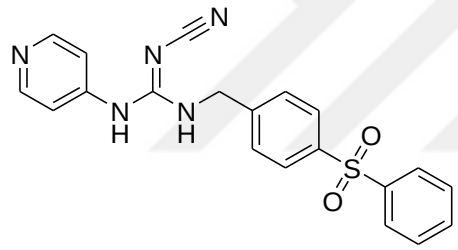
Gianetti ve arkadaşları tarafından farklı yapıda NAMPT inhibitörleri geliştirmek amacıyla fragman-temelli tarama yöntemi kullanılarak çeşitli fragmanların x-ray kristal yapıları elde edilmiş ve aktif bölgedeki etkileşimleri incelenmiştir. Bu taramalar sonucunda öncü

fragman olarak *trans*-2-(piridin-3-il)siklopropan karboksilik asit seçilmiş ve Bileşik 10 (NAMPT IC_{50}=5.1 nM) (Şekil 2.24) geliştirilmiştir [66].



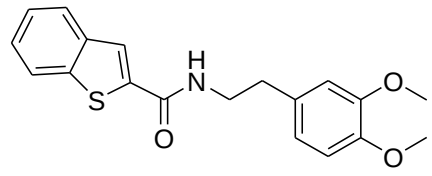
Şekil 2.24. Bileşik 10 kimyasal yapısı

Zheng ve arkadaşları tarafından daha önce bildirilen amit içeren biaril sülfon türevi aktif bir molekülün [63] amit grubu yerine CHS828 yapısındaki siyanoguanidin grubu getirilmiş, elde edilen molekülün sağ bölgesinde yer alan terminal fenil grubu çeşitli halkalarla değiştirilerek gerçekleştirilen yapı-aktivite çalışması sonucu Bileşik 11 (NAMPT IC_{50}=2.5 nM) (Şekil 2.25) gibi etkili NAMPT inhibitörlerine ulaşıldığı bildirilmiştir [67].



Şekil 2.25. Bileşik 11 kimyasal yapısı

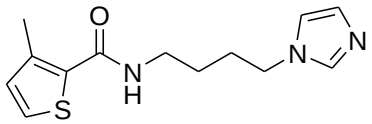
Zu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen sanal tarama çalışması sonucu benzotiyofen türevi Bileşik 12'ye (NAMPT IC_{50}=0.15 µM) (Şekil 2.26) ulaşılmıştır [9].



Şekil 2.26. Bileşik 12 kimyasal yapısı

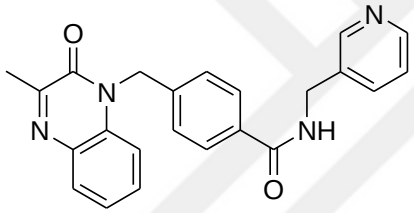
Bu çalışmanın ardından 2015 yılında Chen ve arkadaşları, benzotiyofen halkası içeren yeni NAMPT inhibitörleri sentezlemişler, benzotiyofen yerine sübstitüe-tiyofen halkası yerleştirildiğinde de NAMPT inhibisyonunun devam ettiğini göstermişlerdir. Tiyofen türevi moleküllerden Bileşik 13 (NAMPT IC_{50}=0.17 µM) (Şekil 2.27), etkili bir NAMPT inhibitörü

olarak bulunmuş, aynı zamanda HepG2 kanser hücrelerine karşı *in vitro* ortamda sitotoksik aktivite gösterdiği (IC_{50}=3.9 µM) bildirilmiştir [2].



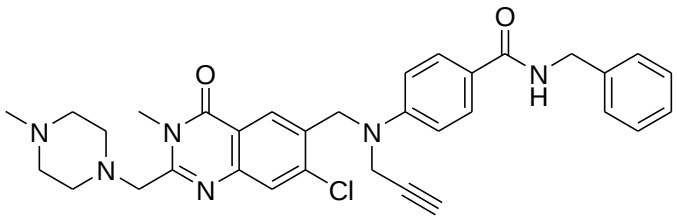
Şekil 2.27. Bileşik 13 kimyasal yapısı

2015 yılında Wang ve arkadaşları, NAMPT enzimini hedef alarak yüksek çıktılı tarama (high throughput screening, HTS) sistemi ile yaptıkları bir çalışma sonucu F671-0003 bileşiğine (Şekil 2.28) NAMPT inhibitörü (NAMPT IC_{50}=85 nM) olarak ulaşmışlar, HepG2 kanser hücrelerine karşı *in vitro* ortamda sitotoksik aktivite gösterdiği de bildirmişlerdir [68].

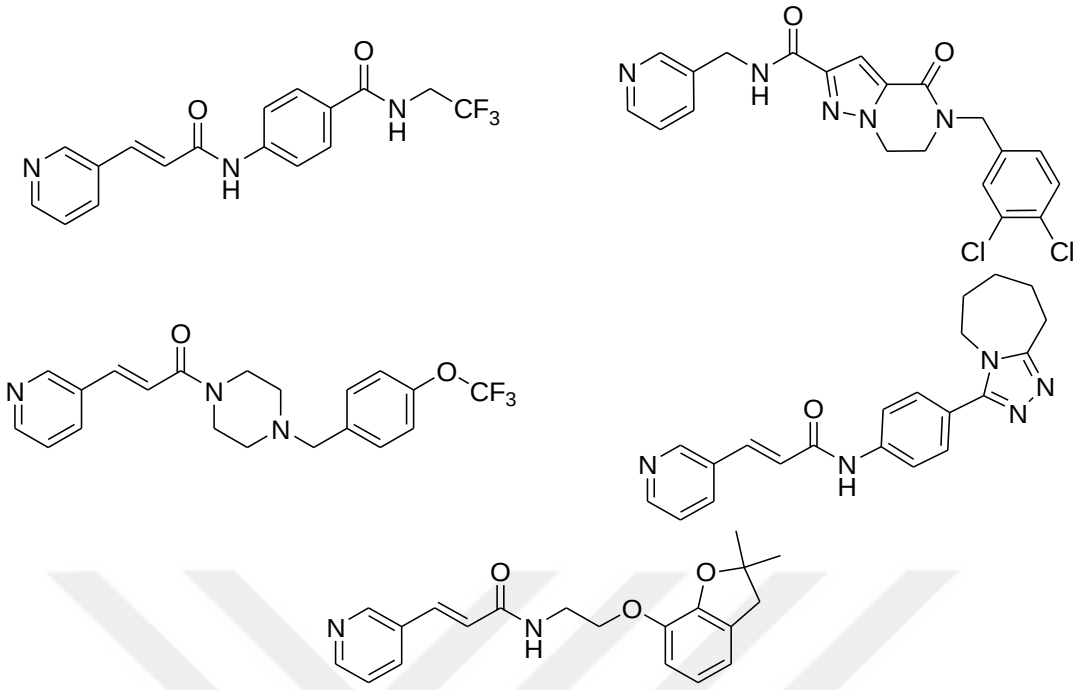


Şekil 2.28. F671-0003 kimyasal yapısı

2016 yılında Clark ve arkadaşları, yapı- ve ligand-temelli sanal tarama yöntemi kullanarak yeni NAMPT inhibitörleri keşfetmişlerdir. Yapı-temelli sanal tarama yöntemi sonucu 630 molekül seçilmiştir. Ligand-temelli sanal tarama için ise yapısal olarak farklı NAMPT inhibitörleri MPI-0479626 (Şekil 2.29) ve FK866 kullanılmış ve 417 moleküle ulaşılmıştır. Çeşitli filtreleme basamaklarından sonra ulaşılan 5 adet bileşik (Şekil 2.30) NAMPT inhibitörü olarak (NAMPT IC_{50}=100 nM-1 µM) bildirilmiştir [57,69].

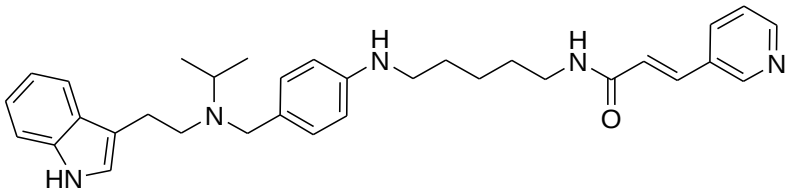


Şekil 2.29. MPI-0479626 kimyasal yapısı



Şekil 2.30. Sanal tarama sonucu keşfedilen NAMPT inhibitörleri

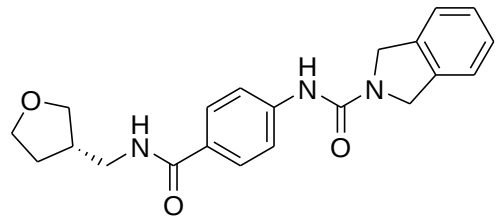
NAMPT aktif bölgesinin çoğunlukla hidrofobik özellikte olduğu ve NAMPT inhibitörlerinin sağ bölgesinde bulunan kuyruk kısmının hidrofobik etkileşimlerde önemli rolü olduğu bilinmektedir [32]. Bai ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği yapı-temelli ilaç keşfi çalışmaları sonucu, FK866 yapısındaki 3-(piridin-3-il)akrilamit kalıntısını koruyarak, bağlayıcı uzunluğu ve kuyruk kısmının esnekliğini değiştirerek çeşitli moleküllere ulaşılmıştır. Bu moleküller arasından Bileşik 14'ün güçlü NAMPT inhibitörü özelliği (NAMPT IC_{50}=25.3 nM) (Şekil 2.31) gösterdiği bildirilmiş, elde edilen aktiviteye hidrofobik etkileşimler gösteren azot atomuna bağlı olan izopropil grubunun ve optimal bağlayıcı uzunluğunun sebep olduğu belirtilmiştir [70].



Şekil 2.31. Bileşik 14 kimyasal yapısı

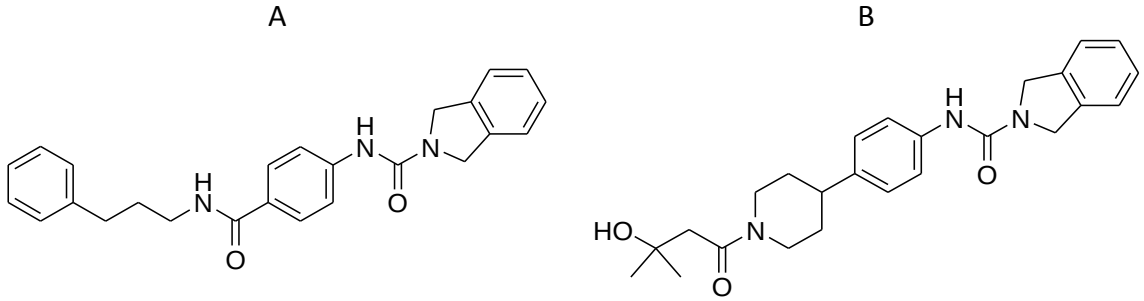
Wilsbacher ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada, tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki için yarışmalı inhibitörlerin NAMPT ile doğrudan fosforibozil katım

ürünü oluşturmasına gerek olmadığı bildirilmiştir. Çalışma, fosforilasyon için gerekli olduğu düşünülen aromatik azot atomu içermeyen izoindol türevi A-1293201 (Şekil 2.32) kullanılarak gerçekleştirilmiştir [71].



Şekil 2.32. A-1293201 kimyasal yapısı

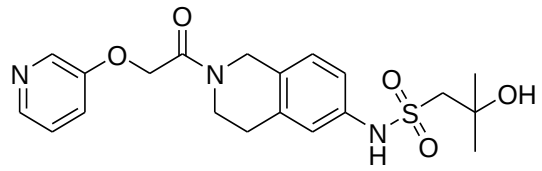
Aynı çalışma grubu tarafından izoindol üre türevi bir seri molekül üzerinde yapı-etki çalışmaları yapılmış, klinik çalışmalarda yer alan FK866 ve GMX1778 moleküllerinde yaşanan oral biyoyararlanım sorununu çözmek amaçlanmıştır. Çalışmada Bileşik 15 çıkış noktası olarak seçilerek, daha iyi oral biyoyararlanıma sahip NAMPT inhibitörleri Bileşik 15 ve Bileşik 16'ya ulaşıldığı bildirilmiştir (Şekil 2.33) [80].



Şekil 2.33. Bileşik 15 (A) ve Bileşik 16 (B) kimyasal yapıları

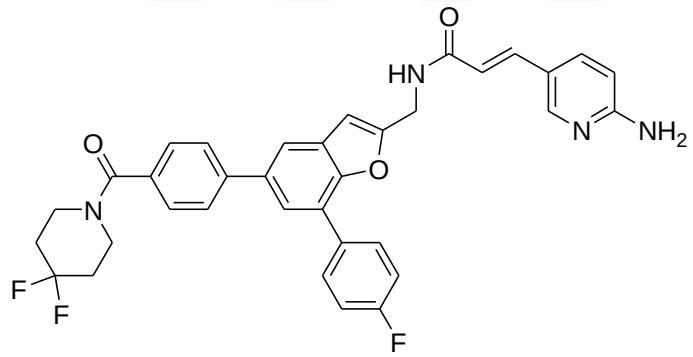
2017 yılında Zhao ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, farmakofor model-temelli sanal tarama sonucu ulaşılan NAMPT inhibitörlerinin hematolojik ve retinal toksisite gösterdiği bulunmuş, hematolojik toksisite ortama eklenen nikotinik asit ile elimine edilirken retinal toksisite azaltılamamıştır. Retina bariyerine geçişin ve bunun sonucunda oluşan retinopatinin önlenmesi amacıyla ile permeabilitenin azaltılması ve polaritenin arttırılması düşünülmüştür. Bu hipoteze dayanılarak keşfedilen selektif, etkili ve oral aktif LSN3154567 molekülü (NAMPT IC_{50}=3.1 nM) (Şekil 2.34) *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda

kanser hücreleri üzerine yüksek antiproliferatif özellik gösterirken retinal hücrelerde toksisitenin oluşmadığı bildirilmiştir [49].



Şekil 2.34. LSN3154567 kimyasal yapısı

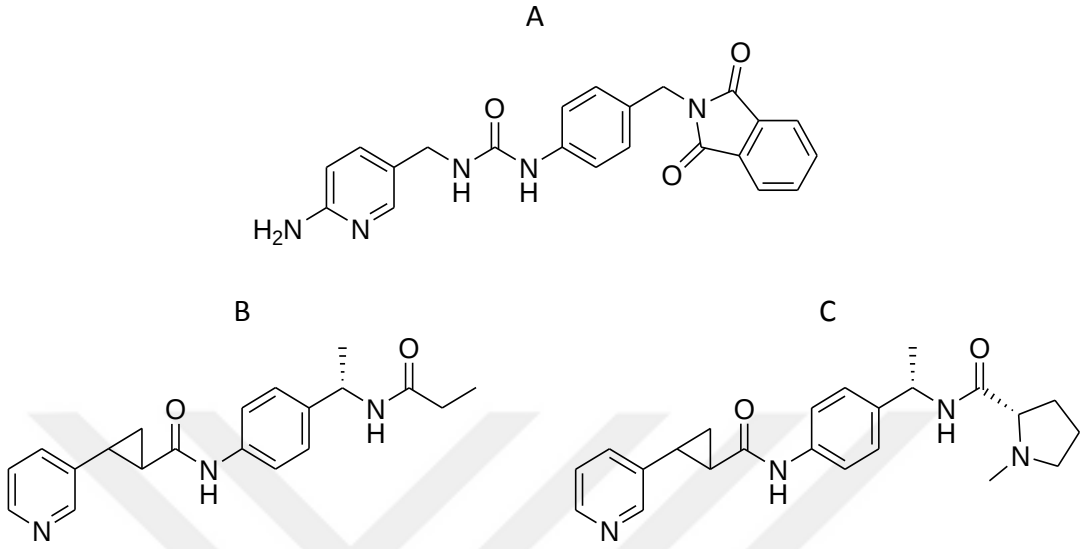
Neggers ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yayınlanan bir çalışmada, temel genlerin CRISPR-Cas-temelli mutagenez taraması sonucu KPT-9274 molekülünün (Şekil 2.35) iyileştirilmiş farmakokinetik özelliklere sahip yeni bir NAMPT inhibitörü sınıfının temsilcisi olduğu bildirilmiş, NAMPT:KPT-9274 kompleksinin x-ray kristal yapısı (PDB kodu: 5NSD) aydınlatılmıştır [73]. Ayrıca pek çok çalışma ile *in vitro* olarak ve preklinik modellerde antikanser etkisi kanıtlanmış ve faz I klinik denemelere alınmıştır (clinicaltrials.gov: NCT02702492).



Şekil 2.35. KPT-9274 kimyasal yapısı

Palacios ve arkadaşları, NAMPT x-ray kristal yapıları ve kendi molekül kütüphanelerini kullanarak moleküler docking çalışmaları ile yaptıkları fenotipik tarama sonucu NAMPT inhibitörü olan Bileşik 17'ye (A2780 CTG testi ile NAMPT IC_{50}=7 nM) (Şekil 3.31) ulaşmışlardır. Bu molekül üzerinden gerçekleşen yapı-temelli ilaç tasarımı çalışmaları ile iyi derecede hücresel NAMPT inhibitör etkisi yarattığı öne sürülen iki motife ulaştıklarını bildirmişlerdir; (*S,S*)-siklopropil karboksamit ve (*S*)-1-N-feniletilamit. Bu hipoteze göre elde

ettikleri Bileşik 18 (A2780 CTG testi ile NAMPT IC_{50}=5 nM) ve Bileşik 19 (A2780 CTG testi ile NAMPT IC_{50}=1 nM) (Şekil 2.36), NAMPT inhibitörü olarak bildirilmiştir [74].



Şekil 2.36. Bileşik 17 (A), Bileşik 18 (B) ve Bileşik 19 (C) kimyasal yapıları

3. YÖNTEM

3.1. Farmakofor Modelleme

Farmakofor modelleme çalışmaları, Schrödinger Küçük Molekül ilaç Keşfi programı (Small-Molecule Drug Discovery Suite 2018-1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018) kullanılarak yapılmıştır.

3.1.1. Veri seti oluşturma ve moleküllerin hizalanması

Farmakofor model oluşturmak amacıyla daha önce insan NAMPT enzimi üzerinde inhibitör etkileri bildirilmiş siyanoguanidin, üre ve amit türevi toplamda 27 adet NAMPT inhibitörü literatürden derlenmiş [2,59–61,63,64,67,69,70,75–77] ve veri seti oluşturulmuştur. Moleküller, Schrödinger programının Maestro ara yüzünde çizilmiş ve LigPrep (Schrödinger Release 2018-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018) modülü ile varsayılan değerler kullanılarak üç boyutlu yapılar hazırlanmıştır.

Farmakofor model oluşturma sürecinden önce, moleküllerin hizalanması gerçekleştirilmiştir. İnsan NAMPT x-ray kristal yapılarına bağlı olarak bulunan siyanoguanidin türevi (PDB kodu: 4LTS) [67], üre türevi (PDB kodu: 4JNM) [75] ve amit türevi (PDB kodu: 4M6P) [63] koligandlara ait biyoaktif konformasyonlar sabit tutularak, hizalamalarda referans olarak kullanılmış, işlem sonunda hizalanmış üç ayrı molekül seti elde edilmiştir: i) Siyanoguanidin türevi koliganda hizalanmış veri seti, ii) Üre türevi koliganda hizalanmış veri seti ve iii) Amit türevi koliganda hizalanmış veri seti. Moleküllerin hizalanması, Scrödinger programının Flexible Ligand Alignment modülü ile ortak yapı iskeletleri temel alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Farmakofor model oluşturma

Oluşturulan tüm farmakofor modeller için belirlenmesi istenilen farmakofor özellikler, hidrojen bağı akseptörü (A), hidrojen bağı donörü (D), hidrofobik grup (H), negatif yüklü grup (N), pozitif yüklü grup (P) ve aromatik halka (R) olarak tanımlanmıştır.

Ortak farmakofor yöntemi

Elde edilen hizalı molekül setleri kullanılarak Schrödinger programının Phase modülünde yer alan "Developing Pharmacophore Model" protokolü ile üç adet farmakofor model elde edilmiştir. Modelleri oluşturmak için kullanılan veri seti moleküllerinin IC_{50} olarak bildirilen *in vitro* NAMPT inhibisyon değerleri pIC_{50} ($-\log(IC_{50})$) değerlerine çevrilmiş, moleküller aktif (19 molekül) ve inaktif set (9 molekül) olarak gruplandırılmıştır (pIC_{50} değeri > 5,5: aktif; pIC_{50} değeri < 5,5: inaktif). Ortak farmakofor hipotezleri oluşturulmuş, puanlanmış, aktif ve inaktif moleküllerin katkısı temel alınarak sıralanmıştır. Bu sıralamada en iyi sonuçları veren hipotezler, farmakofor model olarak belirlenmiştir.

E-farmakofor yöntemi

Schrödinger programının Phase modülünde yer alan ve ligand atomlarının aktif bölge ile etkileşim enerjilerini temel alan E-Farmakofor yöntemi [78] kullanılarak üç NAMPT: inhibitör kompleksi için farmakofor modeller elde edilmiştir.

3.1.2. Farmakofor model doğrulama

Seçilen farmakofor modeller, performanslarının değerlendirilmesi için doğrulama işlemine tabi tutulmuşlardır. Decoy finder programı [79] ile ZINC "drug-like" bileşik kütüphanesi üzerinden 1240 adet insan NAMPT enzimine karşı aktivitesi olmayan molekül elde edilmiştir. Bunun yanında, veri setine eklenmeyen fakat literatürde insan NAMPT inhibitör aktivitesi bildirilen 50 adet inhibitör seçilmiştir. Bu iki molekül seti birleştirilerek toplamda 1290 adet (50 aktif, 1240 inaktif) molekülden oluşan doğrulama seti elde edilmiş ve farmakofor modeller kullanılarak tarama yapılmıştır. Tarama sonuçları, farmakofor modellerin verimini ve yeterliliğini ortaya koyan doğruluk, hassasiyet, EF ve GH gibi göstergeler hesaplanmış, ROC analizleri gerçekleştirilmiştir. ROC analizleri sonunda RIE,

ROC, BEDROC ve AUAC gibi parametreler hesaplanmış, farmakofor modellerin performansları bu parametreler üzerinden değerlendirilmiştir. Ayrıca sanal tarama basamağında kullanılmak üzere ROC grafiklerinde, her model için "model yorulma noktası" belirlenmiştir.

3.2. Sanal Tarama

Sanal tarama basamağı, doğrulanmış farmakofor modeller ile yaklaşık 13 milyon molekülden oluşan ZINC "drug-like" sanal kütüphanesi kullanılarak hızlı esnek arama yöntemi üzerinden gerçekleştirilmiş, doğrulanmış farmakofor modelin taşıdığı özellikleri karşılayan moleküller tarama çıktısı olarak belirlenmiş ve farmakofor uyum puanına göre sıralanmıştır. Elde edilen sanal tarama çıktısı moleküller, filtreleme basamağına geçirilmiş, ilk filtre olarak ROC analizlerinde [80] her farmakofor model için belirlenen "model yorulma noktası" uygulanmıştır. Doğrulanmış modellere ait performansların bozulma gösterdiği yüzdeye göre sanal tarama çıktısı moleküllerin ilgili yüzdelik dilimleri değerlendirmeye alınmıştır. Daha sonra Lipinski'nin beş kuralı, ADMET, sentezlenebilme, reaktivite ve görsel inceleme gibi filtrelerle ikinci bir inceleme gerçekleştirilmiş ve tüm filtrelerden geçen sanal tarama çıktıları moleküler docking basamağına iletilmiştir.

3.3. Moleküler Docking

3.3.1. Protein hazırlama ve aktif bölge tanımlama

İnsan NAMPT x-ray kristal yapıları (PDB kodları: 4LTS, 4JNM, 4M6P), RCSB Protein Data Bank veri tabanından indirilmiş, Schrödinger programının Protein Preparation Wizard modülü kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlık aşamasında aktif bölgedeki kristal su molekülleri (HOH709, HOH715, HOH722, HOH731, HOH737, HOH743, HOH769, HOH826, HOH873, HOH894, HOH988, HOH1005, HOH1006, HOH1013, HOH1014) hariç tüm su molekülleri silinmiş, hidrojen atomları eklenmiş, eksik veya yanlış atom tipleri düzeltilmiştir. OPLS-2005 kuvvet alanı uygulanarak RMSD değeri en fazla 0,3 Å olacak şekilde enerji minimizasyonu yapılmıştır. Enzim x-ray kristal yapısına bağlı inhibitör

molekül seçilerek, inhibitörün çevresinde aktif bölgeyi koordinatlarıyla tanımlayan 20 Å'luk bir kutu (grid), "receptor grid generation" paneli ile oluşturulmuştur. Bu aşamada kuvvet alanı olarak yine OPLS-2005 kullanılmış, Van der waals ölçeklendirme faktörü 1,00 ve yük parçalı kesme noktası 0,25 olarak tanımlanmıştır. Elde edilen reseptör grid dosyaları moleküler docking çalışmasında kullanılmak üzere kaydedilmiştir.

3.3.2. Sanal tarama iş akışı (virtual screening workflow) protokolü

Moleküler docking çalışmaları, Schrödinger programının Glide modülüne ait sanal tarama iş akışı protokolüne [81] göre gerçekleştirilmiştir. Protokol çok basamaklı bir iş akışından oluşmaktadır: (i) Glide yüksek çıktılı sanal tarama (HTVS), ii) standart duyarlılık (SP) ile docking, iii) ekstra duyarlılık (XP) ile docking ve iv) MM-GBSA ile işlem sonrası değerlendirme. Filtreleme basamağından başarıyla geçen sanal tarama çıktısı moleküller, ilgili insan NAMPT kristal yapısına sanal tarama iş akışı protokolü ile yerleştirilmiş, elde edilen bağlantı modları XP Gscore ile puanlandırılmıştır. Protokolün ilk basamağında (HTVS) elde edilen en iyi konformasyonların 5 tanesi ikinci basamağa geçebilmiştir. SP puanlama fonksiyonu ile gerçekleşen basamaktan ise en iyi 3 konformasyonun XP basamağına geçmesine izin verilmiştir. SP puanlama fonksiyonu ile gerçekleşen basamaktan geçebilen bağlantı modları MM-GBSA hesaplaması ile o molekül için final bağlantı modunu oluşturmuş, XP Gscore üzerinden sıralanmıştır. XP Gscore puanı -5 kkal/mol değerinden yüksek olan bağlantı modlarına sahip moleküller elenmiştir. Kalan moleküller ise aktif bölgeyi oluşturan amino asitlerle beklenen etkileşimleri sağlayıp sağlamadığına ve aynı zamanda ilgili farmakofor modele de uyumu sağlamasına göre tekrar incelenmiş, sonuç olarak 31 adet moleküle ulaşılmıştır. Bu moleküllerden 10 adeti aday molekül olarak seçilmiş ve satın alınmıştır.

3.4. *İn Vitro* NAMPT İnhibisyon Testi

Sanal tarama çıktısı bileşiklerin *in vitro* NAMPT inhibitör etkilerinin belirlenmesinde BPS Bioscience NAMPT Inhibitor Screening Assay Kiti (Katalog No: 71276) [82] üretici firmanın belirlediği protokole uyularak kullanılmıştır. Referans bileşik olarak NAMPT inhibitörü

FK866 seçilmiştir. Sanal tarama bileşikleri ve FK866, 300, 100, 30 ve 10 µM olmak üzere dört konsantrasyonda taranmıştır. Substratlardan oluşan ana karışım 12,5 µl NAMPT test tamponu + 2,5 µl ATP + 2,5 µl nikotinamit + 2,5 µl PRPP + 2,5 µl %30'luk etanol + 12,5 µl su olacak şekilde hazırlanmıştır. 96-kuyucuklu plakaya ana karışımdan 30 µl/kuyucuk konmuştur. Kör ve pozitif kontrol kuyucukları dışındaki kuyucuklara 10 µl/kuyucuk miktarında sanal tarama bileşiklerinin DMSO-su karışımındaki çözeltileri eklenmiştir. Final konsantrasyonda DMSO miktarı, en fazla %1 olacak şekilde belirlenmiştir. Kör ve pozitif kontrol kuyucuklarına 10 µl/kuyucuk olacak şekilde sanal tarama çıktısı bileşiklerin çözücüsü olan DMSO-su karışımı eklenmiştir. En son olarak da NAMPT dilüsyon tamponu ile seyreltilen 30 ng/µl konsantrasyonundaki insan rekombinant NAMPT enzimi (Katalog No: 91004) kör dışındaki tüm kuyucuklara 10 µl miktarında konmuştur. Karışım, 2 saat süreyle 30 ^{o}C'de inkübe edilmiş, süre sonunda floresan ışıma eksitasyon 340 nm, emisyon 460 nm dalga boylarında SpectraMax i3 (Molecular Devices) marka cihazda okunmuştur. Elde edilen değerler, kör kuyucuklarından okunan floresans değerlerine göre normalize edilmiş ve enzim %inhibisyon değerleri aşağıda verilen eşitliğe (Eş. 3.1) göre hesaplanmıştır. Her bir deney iki defa tekrarlanmıştır. IC_{50} değerleri GraphPad Prism programı (v7.04, demo, GraphPad Software Inc., San Diego, CA) ile nonlinear regresyon (inhibitor vs responce) yöntemi üzerinden hesaplanmıştır.

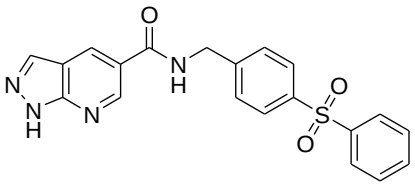
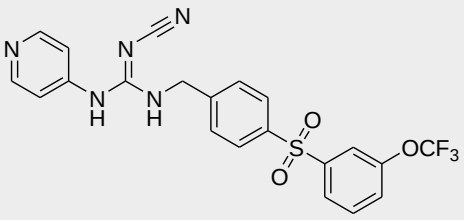
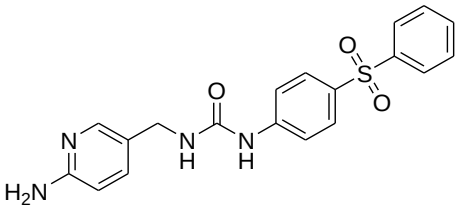
$$\%\ inhibisyon = 1 - \left(\frac{Enzim\ aktivitesi_{bileşik} - Kör}{Enzim\ aktivitesi_{kontrol} - Kör} x100\right) \qquad (3.1)$$

4. BULGULAR

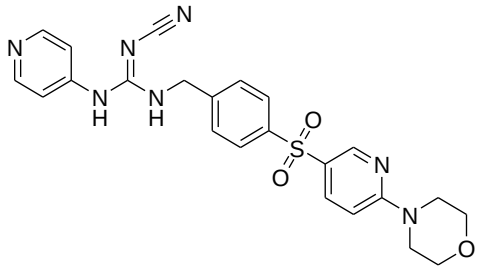
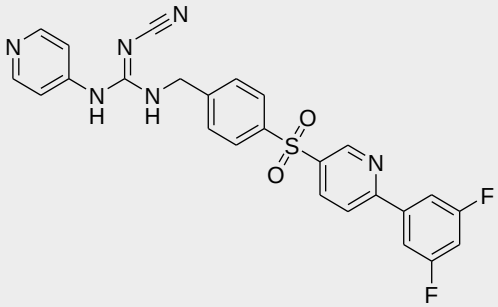
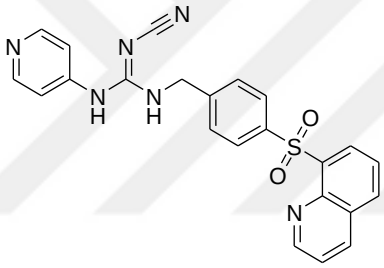
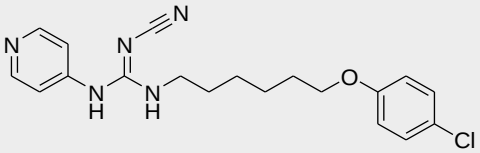
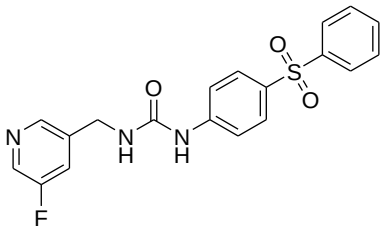
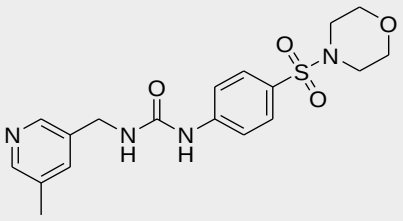
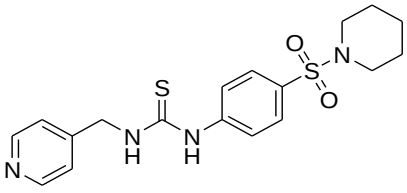
4.1. Moleküler Modelleme Bulguları

Moleküllerin NAMPT enzimine karşı gösterdikleri inhibitör etkiden sorumlu ana grupları ve bu grupların konumlarını belirleyen farmakofor modellerin oluşturulması için literatürde insan NAMPT enzimi üzerinde inhibitör etkileri bildirilmiş amit, siyanoguanidin ve üre türevi toplamda 28 molekül [2,59–61,63,64,67,69,70,75–77] (V1-27) pIC_{50} değerlerine göre aktif (19 molekül) ve inaktif (9 molekül) olarak gruplandırılarak kullanılmıştır. Farmakofor hipotezi oluşturma basamağının öncesinde, ortak yapıların üst üste gelmesini sağlamak amacıyla yapılan molekül hizalaması için referans konformasyon olarak insan NAMPT x-ray yapısındaki üç koligand inhibitörün (A-ref, S-ref, U-ref) biyoaktif konformasyonları seçilmiştir (Çizelge 1).

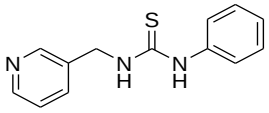
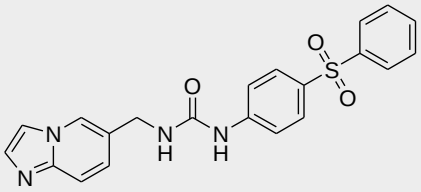
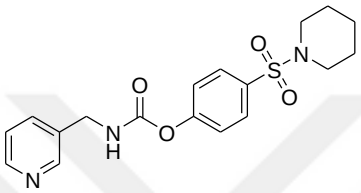
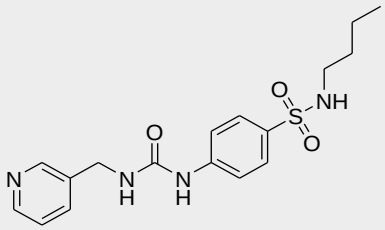
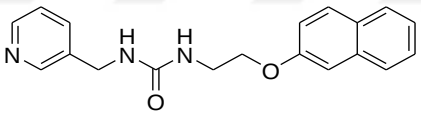
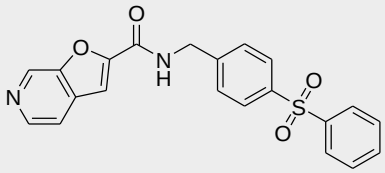
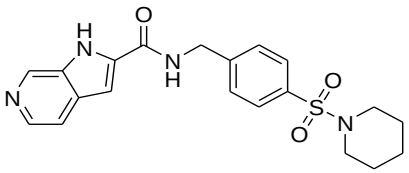
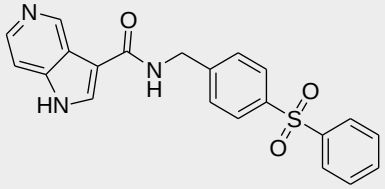
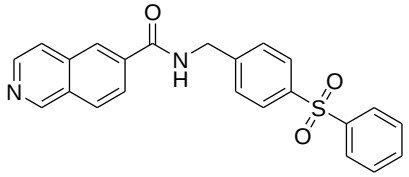
Çizelge 4.1. NAMPT inhibitörlerinden oluşan veri seti

Kod	Molekül	pIC_{50}	Farmakofor uyum puanı		
			Model 1	Model 2	Model 3
A-Ref (PDB kodu: 4M6P)		7,27 (aktif)	2,16	-	-
S-Ref (PDB kodu: 4LTS)		8,36 (aktif)	-	1,81	-
U-Ref (PDB kodu: 4JNM)		8,52 (aktif)	-	-	3,00

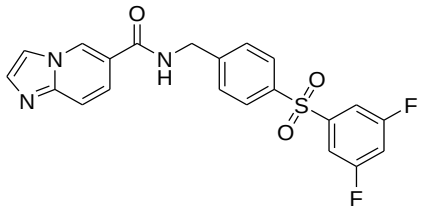
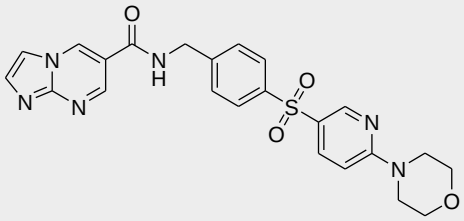
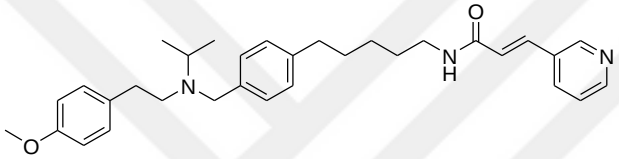
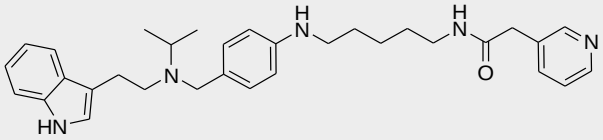
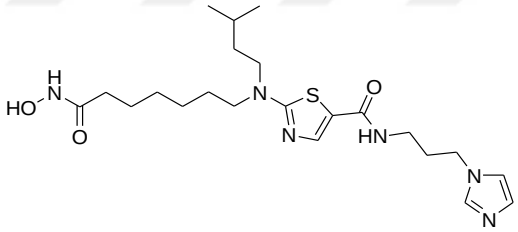
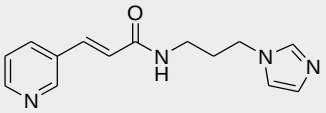
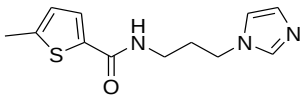
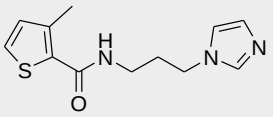
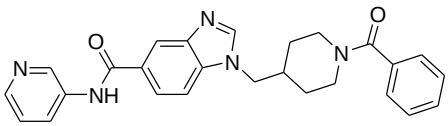
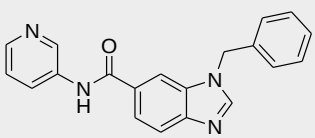
Çizelge 4.1. (Devam) NAMPT inhibitörlerinden oluşan veri seti

Kod	Molekül	pIC_{50}	Farmakofor uyum puanı		
			Model 1	Model 2	Model 3
V1		8,76 (aktif)	2,03	1,80	2,56
V2		9,22 (aktif)	1,99	1,76	2,31
V3		8,44 (aktif)	2,08	1,85	2,67
V4		8,69 (aktif)	-	-	-
V5		7,88 (aktif)	3,00	1,67	2,96
V6		7,39 (aktif)	2,90	1,68	-
V7		4,95 (inaktif)	2,88	2,05	-

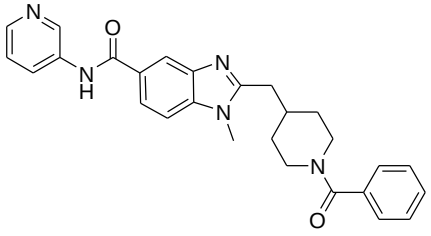
Çizelge 4.1. (Devam) NAMPT inhibitörlerinden oluşan veri seti

Kod	Molekül	pIC_{50}	Farmakofor uyum puanı		
			Model 1	Model 2	Model 3
V8		4,95 (inaktif)	-	-	-
V9		8,52 (aktif)	2,95	2,12	2,95
V10		5,31 (inaktif)	2,24	2,37	-
V11		8,04 (aktif)	1,42	3,00	-
V12		5,30 (inaktif)	-	-	-
V13		8,04 (aktif)	2,19	2,20	2,50
V14		6,00 (aktif)	2,15	2,09	-
V15		5,72 (aktif)	2,15	1,96	2,64
V16		4,95 (inaktif)	2,17	1,98	-

Çizelge 4.1. (Devam) NAMPT inhibitörlerinden oluşan veri seti

Kod	Molekül	pIC_{50}	Farmakofor uyum puanı		
			Model 1	Model 2	Model 3
V17		8,30 (aktif)	2,14	2,03	2,51
V18		9,00 (aktif)	2,08	1,88	2,38
V19		9,00 (aktif)	-	-	-
V20		7,59 (aktif)	-	-	-
V21		7,82 (aktif)	-	-	-
V22		4,95 (inaktif)	-	-	-
V23		4,95 (inaktif)	-	-	-
V24		6,76 (aktif)	-	-	-
V25		7,82 (aktif)	-	-	-
V26		4,00 (inaktif)	1,09	-	-

Çizelge 4.1. (Devam) NAMPT inhibitörlerinden oluşan veri seti

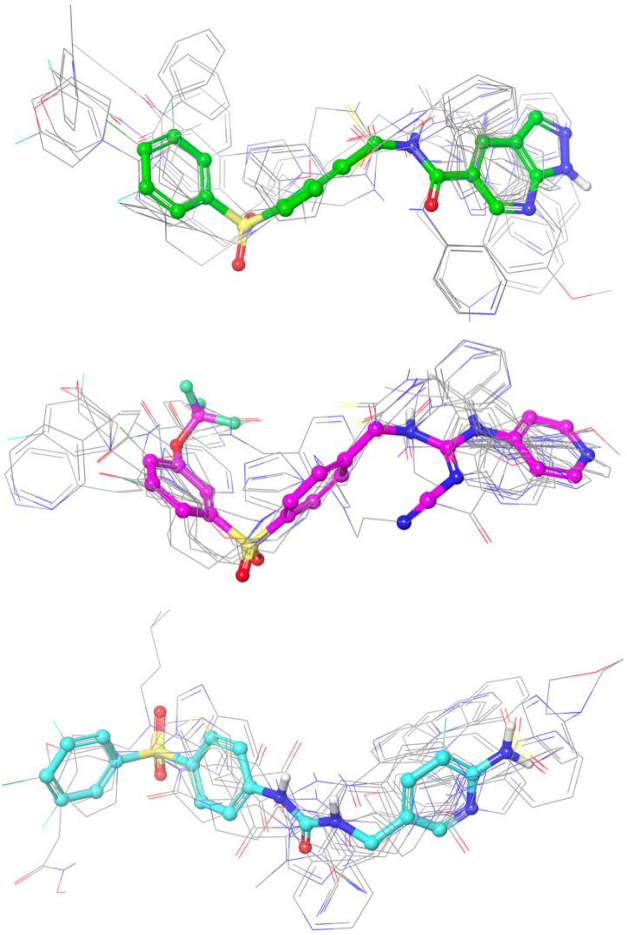
Kod	Molekül	pIC_{50}	Farmakofor uyum puanı		
			Model 1	Model 2	Model 3
V27		4,00 (inaktif)	-	-	-

Her bir biyoaktif konformasyona veri setini oluşturan 28 molekül, Schrödinger programı Flexible Ligand Alignment modülü ile hizalanmıştır. Hizalı 28 molekülden oluşan üç farklı molekül seti (Şekil 4.1) ortak farmakofor yöntemi ile farmakofor hipotezlerin elde edilmesinde kullanılmıştır.

A

B

C



Şekil 4.1. V1-27 moleküllerinin (A) A-ref molekülüne, (B) S-ref molekülüne, (C) U-ref molekülüne hizalanmış gösterimi

Üç grup altında toplanan hipotezler, Çizelge 2'de verilen puanlara göre değerlendirilmiş ve her gruptan en iyi puanlara sahip olan hipotez, final farmakofor model (Model 1-3) olarak seçilmiştir. Model 1, amit türevi koligandın; Model 2, siyanoguanidin türevi koligandın; Model 3 ise üre türevi koligandın kullanıldığı hizalama ile elde edilen farmakofor modelleri göstermektedir.

Çizelge 4.2. Farmakofor model belirlemede kullanılan puan türleri

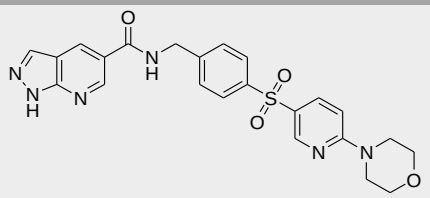
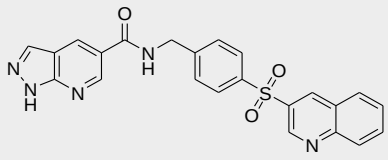
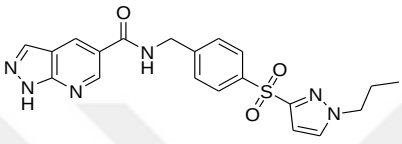
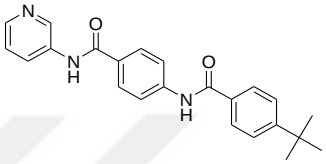
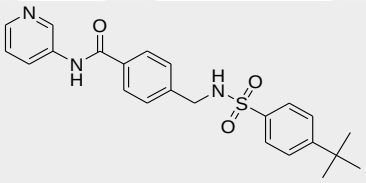
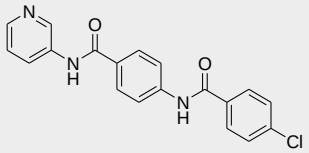
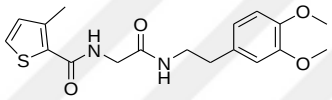
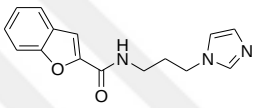
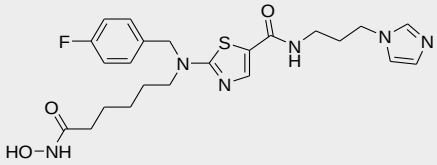
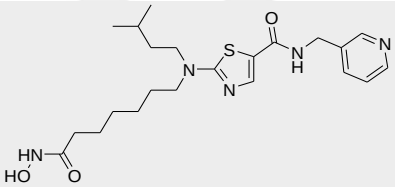
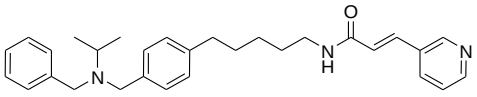
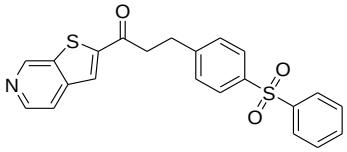
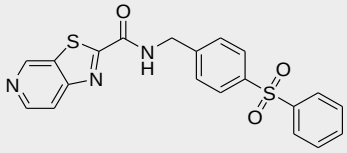
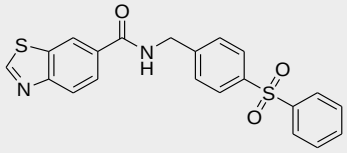
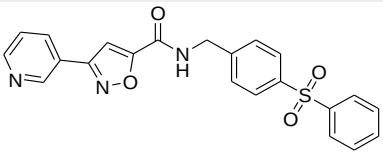
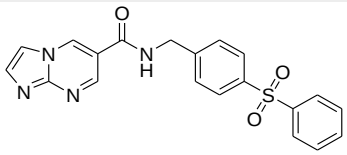
Puan türleri	Farmakofor model		
	Model 1	Model 2	Model 3
İdame puanı (survival score)	4,38	4,20	4,75
Bölge puanı (site score)	0,57	0,42	0,98
Vektör puanı (vector score)	0,94	0,90	0,99
Hacim puanı (volume score)	0,68	0,58	0,66
İnaktif puanı (inactive score)	2,09	2,13	2,32

Ortak farmakofor yöntemi ile elde edilen modellere ek olarak, ligand atomlarının aktif bölge ile etkileşim enerjilerini temel alan E-Farmakofor yöntemi [78] aracılığıyla da farmakofor modeller (Model 4-6) üretilmiştir. Bu modeller için üç ayrı insan NAMPT:inhibitör kompleksi (PDB kodları: 4M6P, 4LTS, 4JNM) kullanılmıştır. E-farmakofor yöntemi, farmakofor modellere bağlanma bölgesinin sınırlarını belirleyen özellikte hacimler (excluded volume, eV) eklemektedir. Ortak farmakofor yöntemi ile elde edilen modellere de, referans koligandı temel alınarak eşleştiği e-farmakofor modellerindeki aktif bölge sınırlayıcı hacimler transfer edilmiştir. Sonuç olarak, üç adeti ortak farmakofor yöntemi ile, üç adeti e-farmakofor yöntemi ile olmak üzere toplamda altı adet farmakofor model (Model1-6) elde edilmiştir.

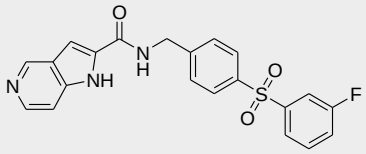
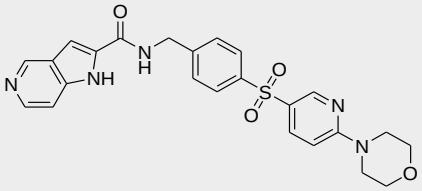
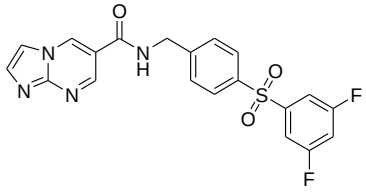
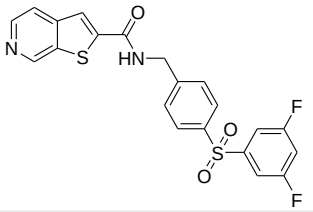
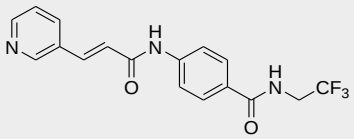
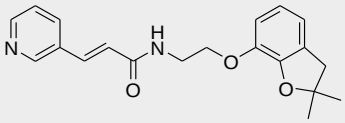
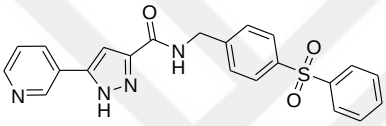
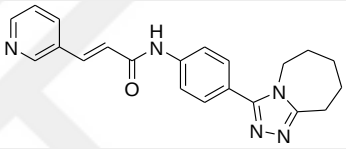
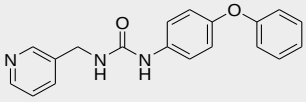
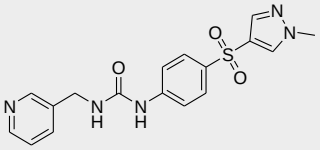
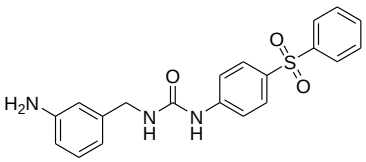
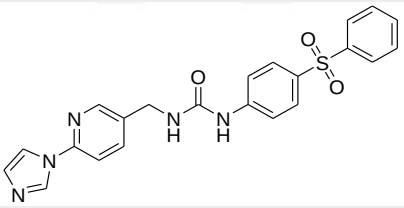
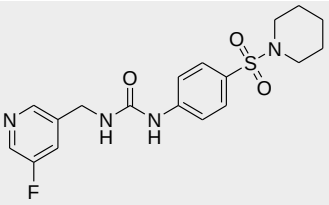
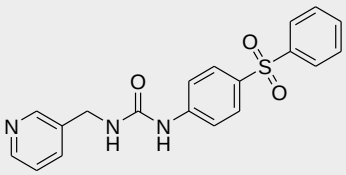
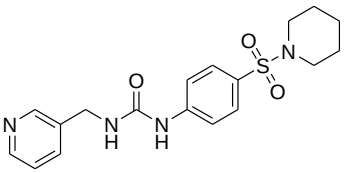
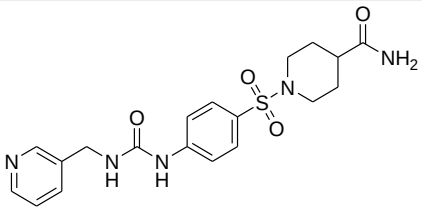
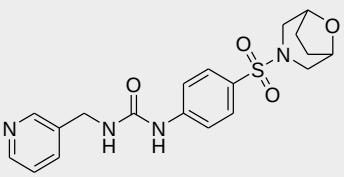
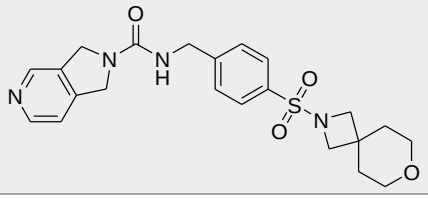
Elde edilen farmakofor modellerin sanal tarama basamağından önce doğrulanması gerekmektedir. Bu amaçla, literatürde insan NAMPT inhibitör aktivitesi bildirilen ve veri setine dahil edilmeyen 50 adet NAMPT inhibitörü (Çizelge 3) ve Decoy Finder programı [79] ile oluşturulan 1240 adet NAMPT inhibitör aktivite göstermeyen tuzak (decoy) molekülleri ile doğrulama seti oluşturulmuş, Schrödinger programının ConfGen modülü [83] ile konformasyon dosyası yaratılmıştır. Daha sonra bu doğrulama setinden elde edilen 7359 adet konformer, farmakofor modellere karşı taranmıştır [84]. Tarama

sonucunda 1290 molekül, farmakofor uyum puanına göre sıralanmış, üst sıralarda aktif moleküllerin yer alıp almadığı değerlendirilmiştir.

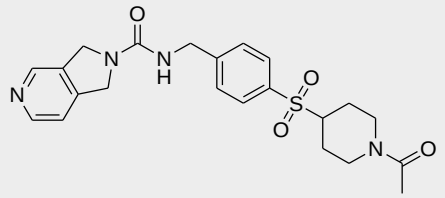
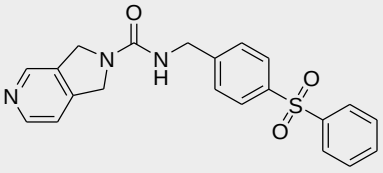
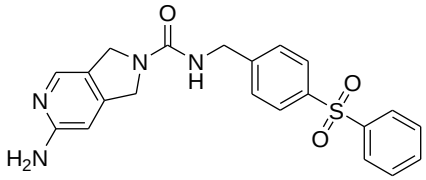
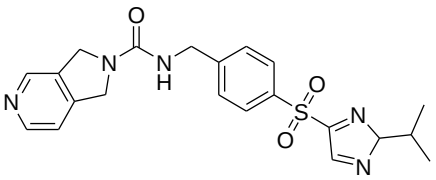
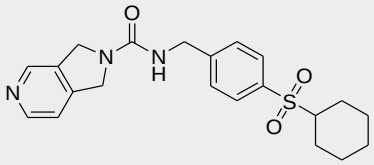
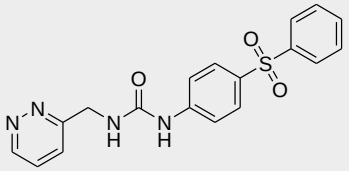
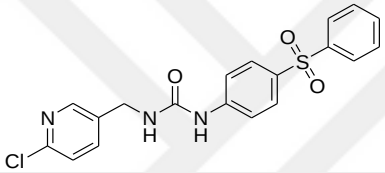
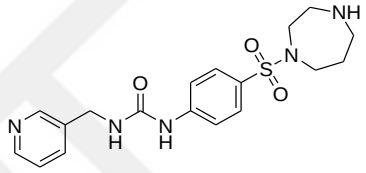
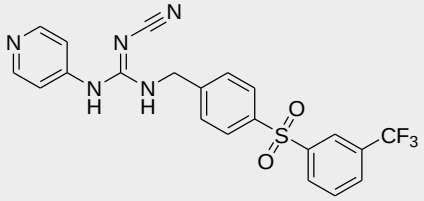
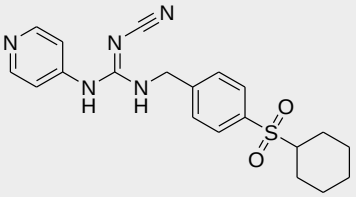
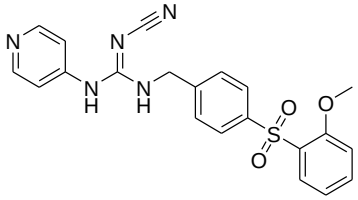
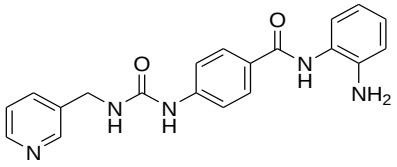
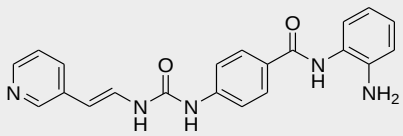
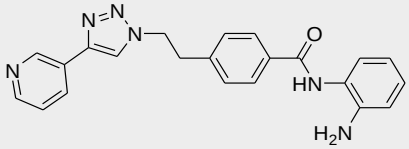
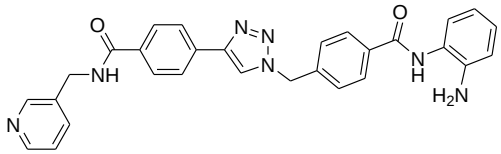
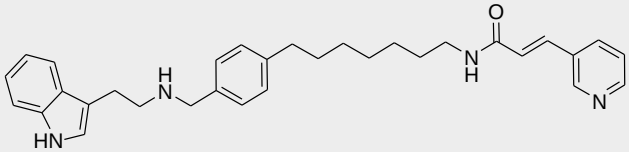
Çizelge 4.3. Farmakofor model doğrulama için kullanılan aktif bileşikler

Kod	Molekül	Kod	Molekül
D1		**D2**	
D3		**D4**	
D5		**D6**	
D7		**D8**	
D9		**D10**	
D11		**D12**	
D13		**D14**	
D15		**D16**	

Çizelge 4.3. (Devam) Farmakofor model doğrulama için kullanılan aktif bileşikler

Kod	Molekül	Kod	Molekül
D17		**D18**	
D19		**D20**	
D21		**D22**	
D23		**D24**	
D25		**D26**	
D27		**D28**	
D29		**D30**	
D31		**D32**	
D33		**D34**	

Çizelge 4.3. (Devam) Farmakofor model doğrulama için kullanılan aktif bileşikler

Kod	Molekül	Kod	Molekül
D35		**D36**	
D37		**D38**	
D39		**D40**	
D41		**D42**	
D43		**D44**	
D45		**D46**	
D47		**D48**	
D49			
D50			

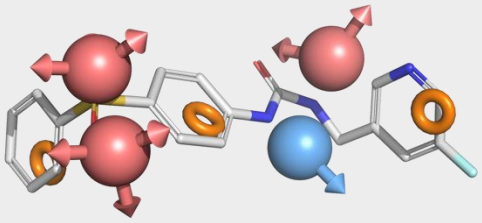
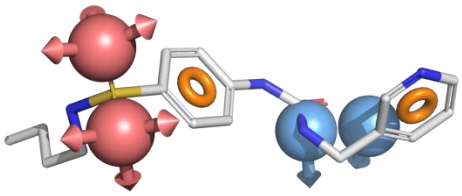
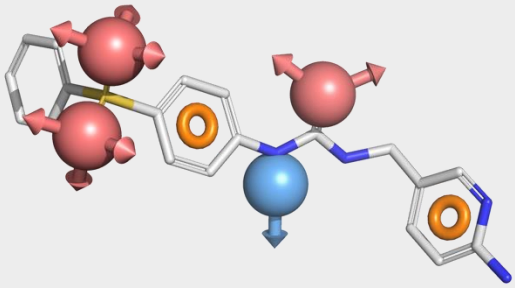
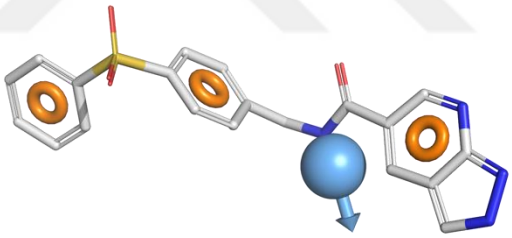
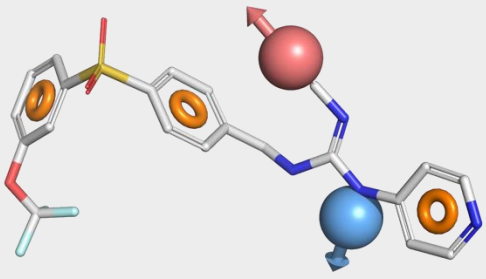
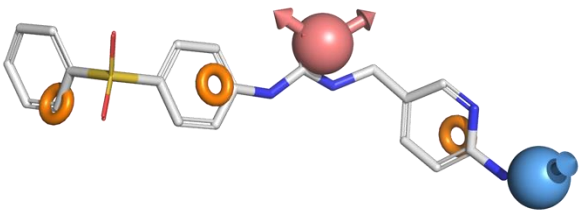
Farmakofor modeller üzerinde aktif molekül seçiciliğini artırmak için, farmakofor özelliklerine ait toleransların değiştirilmesi, sınırlayıcı hacimlerin (eV) eklenmesi, aromatik halka özelliklerine hidrofobik özelliklerin de eklenmesi gibi modifikasyonlar yapılmıştır. Farmakofor model doğrulama basamağı sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 4'te, ulaşılan final farmakofor modellerin özellikleri ise Çizelge 5 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Farmakofor model performansını belirleyen parametreler

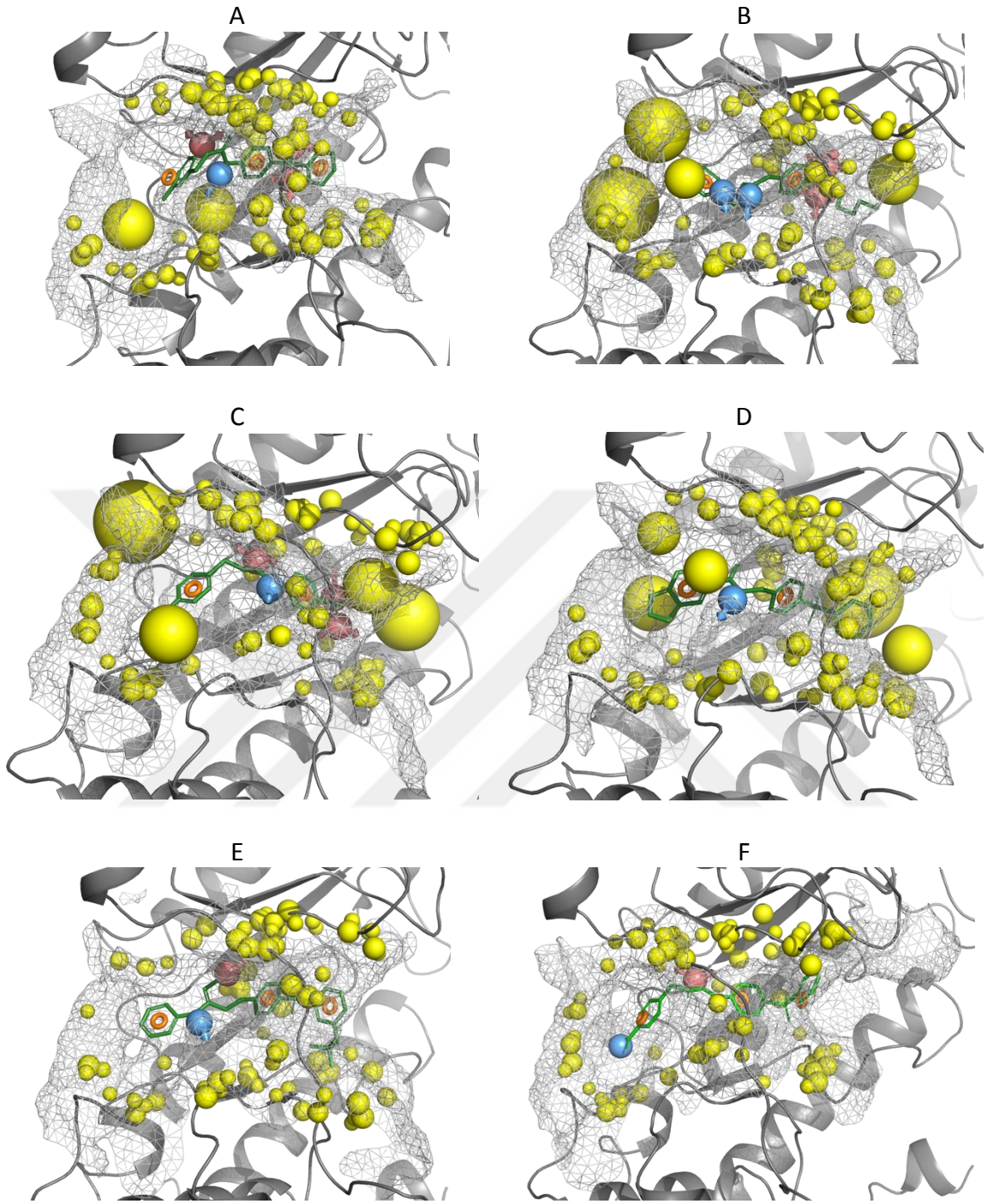
Parametreler*	Farmakofor Modeller					
	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6
D	1290	1290	1290	1290	1290	1290
A	50	50	50	50	50	50
H	23	27	35	17	58	49
TP	20	21	28	15	22	24
FN	30	29	22	35	28	26
FP	3	6	7	2	36	25
TN	1237	1234	1233	1238	1204	1215
%Aktif verim	87	78	80	88	38	49
%Aktif oran	40	42	56	30	44	48
Se	0,40	0,42	0,56	0,30	0,44	0,48
Sp	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97	0,98
Doğruluk	0,97	0,97	0,98	0,97	0,95	0,96
Kesinlik	0,87	0,78	0,80	0,88	0,38	0,49
GH	0,75	0,69	0,74	0,74	0,38	0,48
ROC	0,40	0,42	0,56	0,30	0,44	0,48
BEDROC (α=20)	0,48	0,50	0,63	0,38	0,51	0,55
BEDROC (α =160)	0,85	0,87	0,92	0,81	0,87	0,91
RIE	6,75	7,01	8,92	5,30	7,11	7,79
AUAC	0,69	0,70	0,77	0,64	0,70	0,73
EF (manuel)	22,61	20,22	20,80	22,94	9,86	12,73
EF (% 1)	22	24	26	22	26	26

*D: Veri tabanındaki toplam molekül sayısı; A: Veri tabanındaki toplam aktif molekül sayısı; H: Veri tabanının taranması sonucu ulaşılan çıktı molekül sayısı; TP (true positive): Aktif çıktı moleküllerin sayısı; FN (false negative): Veri tabanındaki çıktı olarak verilmeyen aktif molekül sayısı; FP (false positive): Veri tabanındaki çıktı olarak görülen inaktif molekül sayısı; TN (true negative): Veri tabanındaki çıktı olarak verilmeyen inaktif molekül sayısı; %Aktif verim: [(TP/H)x100]; %Aktif oran: [(TP/A)x100]; Se (Sensitivity): [TP/(TP+FN)]; Sp (Specifity): [TN/(TN+FP)]; Doğruluk: [(TP+TN)/D]; Kesinlik: [TP/(TP+FP)]; GH (goodness of hit score): [(TP/4HA)(3A+H)(1-((H-TP)/(D-A)))]; ROC: Receiver Operating Characteristic; BEDROC: Boltzmann-geliştirilmiş ROC ayrımı; RIE: Robust Initial Enhancement; AUAC: Kümelenmiş eğri altında kalan alan; EF (Enrichment factor): [(TP/H)/(A/D)].

Çizelge 4.5. Elde edilen farmakofor modeller

Farmakofor model	Bileşenleri	Referans molekül ile gösterimi*
Model 1	AAADRRR	
Model 2	AADDRR	
Model 3	AAADRR	
Model 4	DRRR	
Model 5	ADRRR	
Model 6	ADRRR	

*Hidrojen bağı akseptörü (A) kırmızı, hidrojen bağı donörü (D) mavi, aromatik halka (R) turuncu renk ile gösterilmiştir.

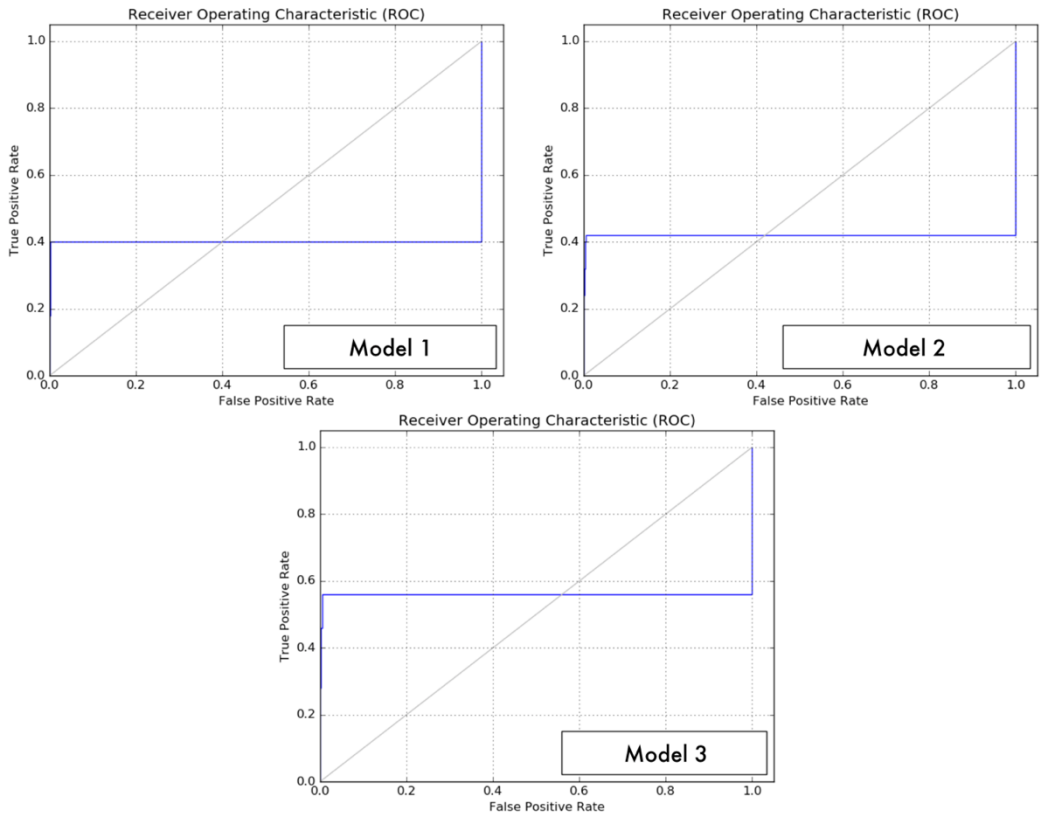


Şekil 4.2. Farmakofor modellerinin eV bileşenleriyle (sarı) birlikte insan NAMPT aktif bölgesindeki (PDB kodu: 4M6P) konumları (A: Model 1; B: Model 2; C: Model 3; D: Model 4; E: Model 5; F: Model 6)

Farmakofor model doğrulaması basamağı sonucu hesaplanan parametreler incelendiğinde, Model 4-6'nın iyi performans sergileyemediği, tarama sonucu aktif moleküllerin ağırlıklı olarak bulunamadığı gözlenmiştir. Bu nedenle sanal tarama basamağına, hesaplanan parametreleri kabul edilir düzeyde bulunan Model 1-3 geçmiştir.

Sanal tarama basamağı, veri tabanı olarak yaklaşık 13 milyon molekül içeren ZINC “drug-like” sanal kütüphanesi [85] kullanılarak Schrödinger programının Phase modülüne ait “Ligand Database Screening” paneli üzerinden gerçekleştirilmiştir [84].

Model 1 için tarama sonunda farmakofor modele uyum gösteren 141271 adet molekül elde edilmiştir. Modelin ROC grafiği (Şekil 4.3) incelendiğinde doğrulama seti ile yapılan taramada sonuçlarının ilk %4’lük kısmını gerçek aktif moleküllerin oluşturduğu, daha sonraki oranlarda daha rastgele seçimlerin olduğu görülmüştür. Bu nedenle model 1 ile ulaşılan 141271 adet çıktı molekülün ilk %3’lük kısmı seçilmiştir. Bu şekilde ilk filtreleme ile molekül sayısı 4238’e düşürülmüştür. Model 2 için tarama sonucunda 423481 adet moleküle ulaşılmış, ROC eğrisinden (Şekil 4.3) elde edilen “model yorulma noktası” [86] ile molekül sayısı 8469’a indirilmiştir. Model 3 için ise sanal tarama çıktısı olarak 338220 adet molekül elde edilmiş, ROC eğrisine göre %4 olarak belirlenen sınır, molekül sayısının fazlalığı nedeniyle %2’ye düşürülmüş ve toplamda 6764 adet molekül seçilmiştir.



Şekil 4.3. Model 1-3 için çizilen ROC grafikleri

Bir sonraki filtreleme basamağında moleküllere, Lipinski'nin beş kuralı (molekül ağırlığı ≤ 500 Da, LogP ≤ 5, hidrojen bağ donörü sayısı ≤ 5, hidrojen bağ akseptörü sayısı ≤ 10, dönebilen bağ sayısı ≤ 10, polar yüzey alanı ≤ 150 $Å^2$) [87] uygulanmıştır. Ayrıca kiralite (kiral atom sayısı ≤ 1), ADMET, reaktif atom taşıma, sentezlenebilirlik gibi kriterler de değerlendirilmiş, uygun olmayan moleküller elenmiştir. Uygulanan filtreler sonucunda Model 1 için 4044 molekül, Model 2 için 4497 molekül, Model 3 için ise 5734 molekül elde edilmiş, aktif bölge tanımlama dosyaları hazırlanmış insan NAMPT x-ray kristal yapıları kullanılarak moleküler docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

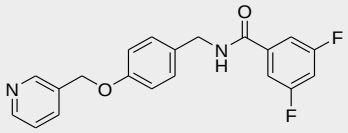
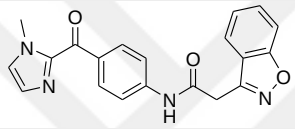
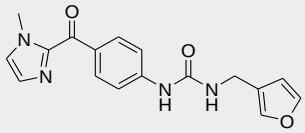
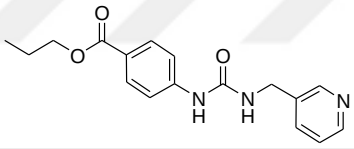
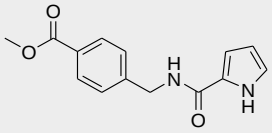
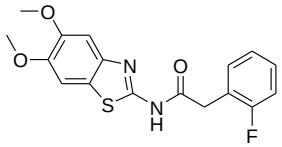
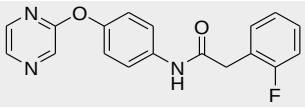
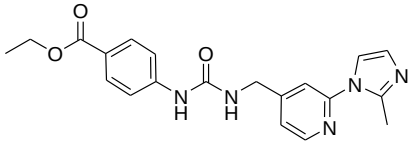
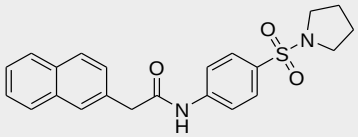
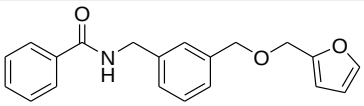
Moleküler docking çalışmaları Schrödinger programının Glide modülünde yer alan "virtual screening workflow" protokolü [81] ile gerçekleştirilmiştir. Model 1 ile ulaşılan sanal tarama çıktısı moleküller için PDB kodu: 4MP6 olan, Model 2 için PDB kodu: 4LTS olan, Model 3 için ise PDB kodu: 4JNM olan insan NAMPT x-ray yapısı kullanılmıştır. Moleküller enzim aktif bölgesine yerleştirildikten sonra XP Gscore puanları ile değerlendirilmiş, puanı > -5 kkal/mol olan moleküller elenmiştir. Değerlendirmeye alınan moleküllere ait bağlantı modları, aktif bölge amino asitleri ve su molekülleri ile gerçekleşmesi beklenen etkileşimler açısından incelenmiştir. Ayrıca beklenen etkileşimleri sağlayan bağlantı modlarının, farmakofor modele uyumu da aranmıştır. Sonuç olarak değerlendirilen kriterlere uygun 31 moleküle (Model 1 ile 21 molekül, Model 2 ile 3 molekül, Model 3 ile 7 molekül) ulaşılmış, kimyasal yapı çeşitliliği göz önüne alınarak 10 molekül (**GF1**-**10**) final sanal tarama çıktısı olarak (Çizelge 6) belirlenerek satın alınmıştır.

4.2. Biyolojik Bulgular

Sanal tarama çıktısı olarak satın alınan **GF1**-**10** bileşiklerinin 300, 100, 30 ve 10 µM konsantrasyonlardaki *in vitro* NAMPT aktivitesi, fluorimetrik NAMPT enzim kiti kullanılarak belirlenmiştir. Deneyde referans madde olarak NAMPT inhibitörü FK866 (NAMPT IC_{50}=14 nM) kullanılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, **GF2**, **GF3**, **GF5**, **GF6** ve **GF9** bileşikleri ile NAMPT enziminin etkileştiği kuyucuklar için ölçülen fluorimetrik ışımanın, kontrol kuyucuklarından daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu durumun moleküllerin flurometrik özelliğinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını araştırmak amacıyla aynı konsantrasyonlarda ve aynı dalga boylarında bileşiklerin yaptığı ışıma ölçülmüştür. Ölçüm sonunda **GF2**, **GF3**,

GF5, **GF6** ve **GF9** bileşiklerinin fluorojenik moleküller olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu bileşikleri için NAMPT-inhibitör etkileşim mekanizmasını aydınlatmaya yönelik ileri çalışmalar yapılmadan NAMPT üzerinde inhibitör veya aktivatör etkiye sahiptir ibaresi kullanılamamıştır. **GF1**, **GF4**, **GF7**, **GF8** ve **GF10** bileşikleri için hesaplanan NAMPT %inhibisyon değerleri Çizelge 7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Satın alınan final sanal tarama çıktısı moleküller

Kod	Molekül	ZINC kodu	XP Gscore	Farmakofor model uyum puanı
GF1		ZINC36391579	-7,00	Model 1 1,66
GF2		ZINC32747605	-6,76	Model 1 1,42
GF3		ZINC58210520	-6,69	Model 1 1,41
GF4		ZINC48020409	-8,66	Model 3 1,74
GF5		ZINC32743681	-6,83	Model 2 1,70
GF6		ZINC21559194	-7,80	Model 3 1,72
GF7		ZINC32930787	-6,44	Model 1 1,38
GF8		ZINC48354269	-8,00	Model 3 1,68
GF9		ZINC13022964	-7,59	Model 3 1,66
GF10		ZINC40089377	-6,84	Model 1 1,51

Çizelge 4.7. Final sanal tarama çıktısı moleküllerin *in vitro* NAMPT inhibisyon değerleri*

Kod	% İnhibisyon değerleri ± standart sapma			
	300 µM	100 µM	30 µM	10 µM
GF1	48,26 ± 0,55	31,11 ± 0,23	28,06 ± 1,57	15,29 ± 0,05
GF4	100 ± 0,36	100 ± 0,80	100 ± 0,62	100 ± 0,25
GF7	42,39 ± 0,26	30,17 ± 1,38	25,16 ± 1,32	8,75 ± 0,67
GF8	66,70 ± 0,20	62,20 ± 0,66	59,45 ± 0,41	58,52 ± 0,12
GF10	32,91 ± 1,42	9,02 ± 0,88	6,24 ± 0,08	i.y.
FK866	100 ± 0,09	100 ± 1,21	100 ± 0,84	100 ± 0,21

* n=2 olarak test edilmiştir, , i.y.: inhibisyon yok.

GF4 ve **GF8** bileşikleri için taranan konsantrasyonlarda NAMPT %inhibisyon değerleri yüksek bulunduğu için bu bileşiklerin daha düşük konsantrasyonlarda etkisi ayrıca incelenmiştir. **GF4** bileşiği için 1 ve 0,1 µM konsantrasyonlara inilirken, **GF8** bileşiği için 3 ve 1 µM konsantrasyonlar kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bu bileşikler için NAMPT IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 8).

Çizelge 4.8. GF4 ve GF8 bileşiklerinin NAMPT IC_{50} değerleri*

Kod	% İnhibisyon değerleri ± standart sapma			IC_{50} (µM)
	3 µM	1 µM	0,1 µM	
GF4	t.e.	14,32 ± 2,59	i.y.	2,26 ± 1,82
GF8	i.y.	i.y.	t.e.	7,42 ± 2,82

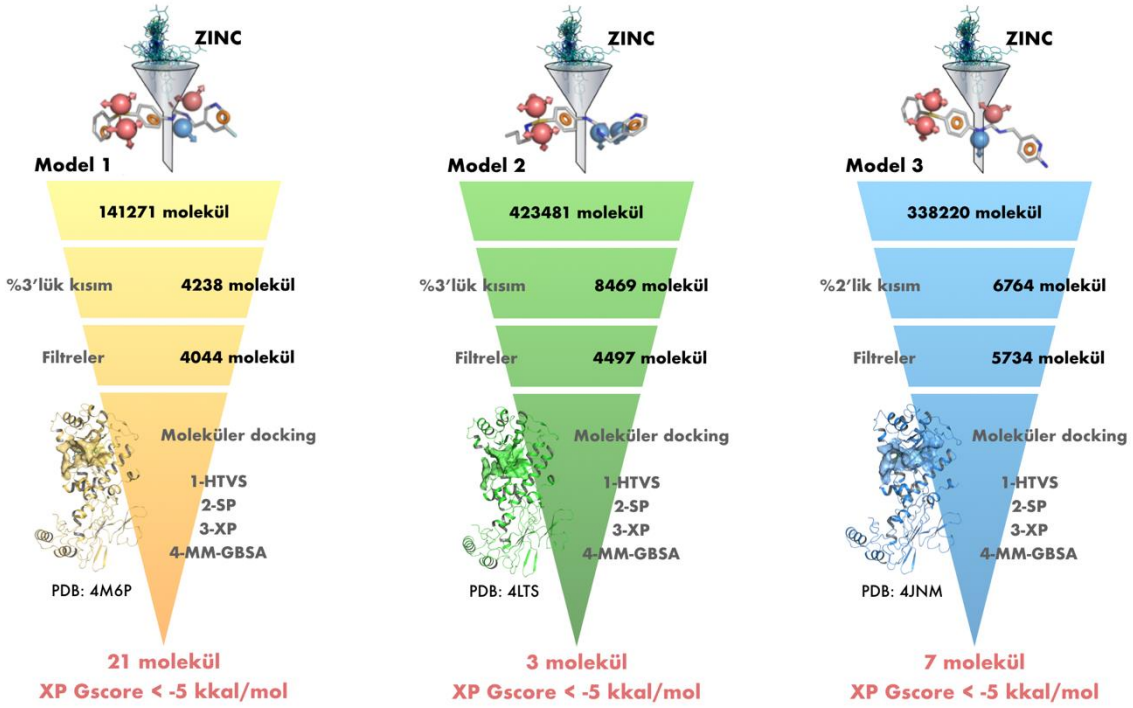
* IC_{50} değerleri ortalama değer ± standart hata olarak verilmiştir, n=2 olarak test edilmiştir, t.e.: test edilmedi, i.y.: inhibisyon yok.

5. TARTIŞMA

Yeni NAMPT inhibitör bileşiklere ulaşmak amacıyla farmakofor-temelli sanal tarama çalışması yapılan bu çalışmada, ligand- ve yapı-temelli ilaç tasarımı yaklaşımlar bir arada kullanılmıştır. Literatürden derlenen NAMPT inhibitörlerinden yola çıkarak oluşturulan farmakofor model ligand-temelli yaklaşımı karşılarken, molekül hizalama basamağında NAMPT x-ray koligandına ait biyoaktif konformasyonun kullanılması aktif bölge özelliklerini sunduğundan yapı-temelli yaklaşımın da dahil olmasını sağlamıştır. Farmakofor model oluşturmak için kullanılan E-farmakofor yöntemi de enzim-inhibitör etkileşimine dayandığı için yine bu iki yaklaşımın birleştirilmesine olanak vermiştir.

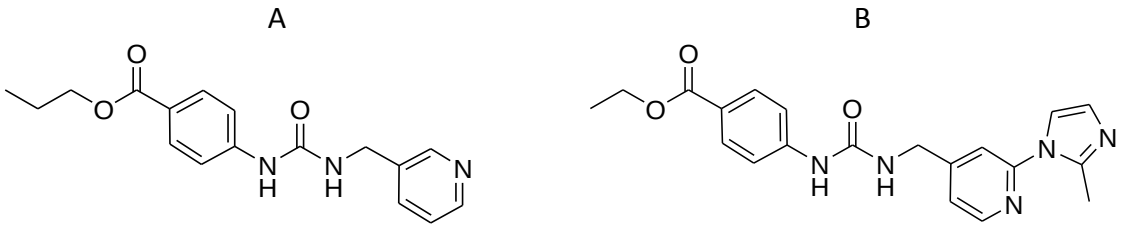
Bu tez çalışmasının moleküler modelleme bölümünde üçü ortak farmakofor yöntemi, üçü e-farmakofor yöntemi kullanılarak toplamda altı farmakofor model (Model 1-6) elde edilmiştir. Farmakofor model doğrulama basamağı sonunda elde edilen parametreler değerlendirildiğinde, altı model içerisinden Model 1, tarama sonucu 20 adet aktif molekülü tanımış, 30 adet molekülü aktif olmasına rağmen inaktif olarak, 3 inaktif molekülü de aktif olarak tanımlamıştır. Model 2, Model 1 ile benzerlik gösterirken Model 3, 28 aktif molekülü tanımış ve aktif olmasına rağmen inaktif olarak bulduğu molekül sayısı 22, inaktif olması gerekirken aktif olarak tanıdığı molekül sayısı 7 olarak bulunmuştur. Model 4-6 için elde edilen sonuçlarda ise aktif-inaktif molekül ayırımının yani %aktif veriminin Model 1-3 sonuçlarına göre düşük olduğu gözlenmiştir. GH değerlerine göre Model 1-4 kullanılabilir modeller olarak düşünülürken, Model 5 ve 6 performans açısından iyi sonuçlar vermemiştir. Bu nedenle sanal tarama aşamasında bu modellerin kullanılamayacağına karar verilmiştir. ROC ve BEDROC değerleri incelendiğinde ise Model 4'ün yetersiz kaldığı görülmüştür. Hesaplanan bu parametrelerin 1'e yakın olması farmakofor model performansının iyi olduğunu gösterdiğinden Model 4 de sanal taramada kullanılacak modeller dışında kalmıştır.

Doğrulama aşamasında yapılan veri seti taramasında yeterli performans gösteren Model 1-3, yaklaşık 13 milyon bileşikten oluşan ZINC "drug-like" sanal kütüphanesinin tarandığı sanal tarama basamağına geçmiştir. Sanal tarama çalışmasının iş akış şeması Şekil 5.1'de özetlenmiştir.



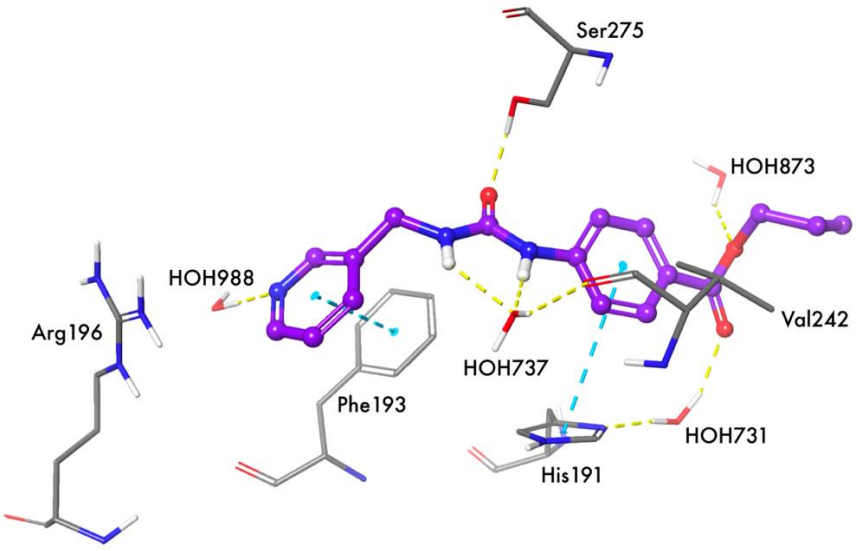
Şekil 5.1. Uygulanan sanal tarama prosedürüne ait iş akış şemaları

Sanal tarama prosedürü sonunda ulaşılan 31 molekül, kimyasal çeşitliliği sağlayacak şekilde 10 moleküle indirilmiştir. Sanal tarama çıktısı olarak belirlenen bu 10 molekül (**GF1**-**10**) satın alınmış, *in vitro* NAMPT inhibitör etkileri fluorimetrik yöntemle NAMPT enzim kiti kullanılarak belirlenmiştir. Ancak **GF2**, **GF3**, **GF5**, **GF6** ve **GF9** bileşiklerinin fluorojenik özellikte moleküller olması nedeniyle bu bileşiklerin NAMPT inhibitör etkileri hakkında yorum yapılamamıştır. Bu bileşikleri için aktivite çalışmasının kolorimetrik ölçüme dayanan enzim kiti ile tekrarlanması gerektiğine karar verilmiştir. Fluorojenik özellikleri olan bileşikler dışındaki **GF1**, **GF4**, **GF7**, **GF8** ve **GF10** bileşiklerinin NAMPT %inhibisyon değerleri incelendiğinde, iki NAMPT inhibitörüne ulaşıldığı görülmektedir. **GF4** ve **GF8** (Şekil 5.2) bileşikleri, insan NAMPT enzimini sırasıyla 2,26 µM ve 7,42 µM IC_{50} değerleriyle inhibe etmektedir.



Şekil 5.2. GF4 (A) ve GF8 (B) kimyasal yapıları

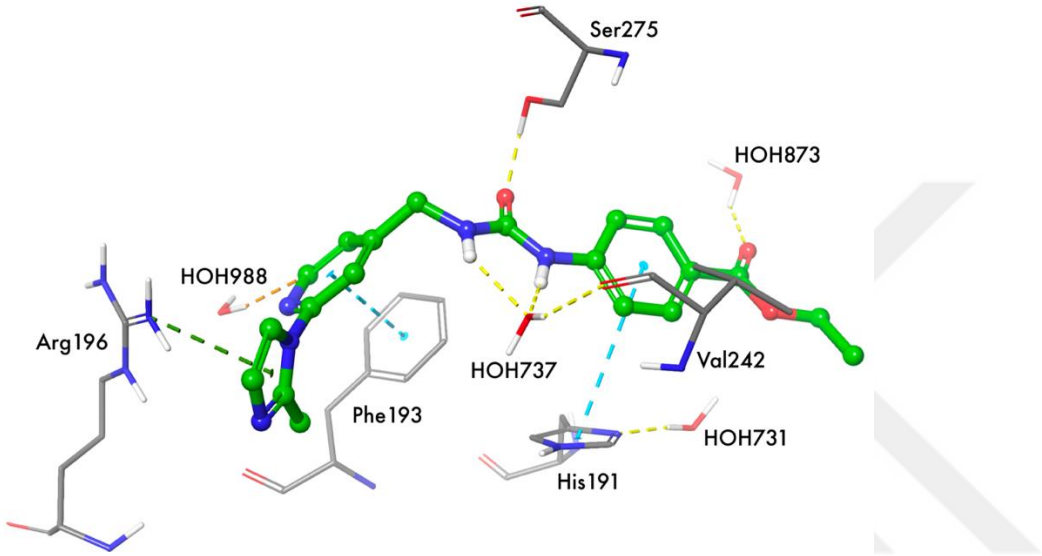
GF4 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesini oluşturan amino asitlerle etkileşimleri incelendiğinde, piridin halkasının Phe193 ile, fenil halkasının ise His191 ile π-π etkişimlerde bulunduğu görülmüştür. Üre yapısına ait karbonil oksijeni Ser275 ile hidrojen bağı meydana getirmiştir. Tüm insan NAMPT x-ray kristallerinde korunduğu görülen aktif bölge su molekülleri ile de etkileşimler görülmüş, üre grubunun azot atomlarına bağlı hidrojen atomları Val242 ile HOH737 aracılıklı hidrojen bağı oluşturmuştur. Fenil halkasına bağlı ester grubunun karbonil oksijeni HOH731 aracılığı ile His191 ile hidrojen bağı meydana getirmiştir. Bu etkileşimlere ilaveten piridin halkasının azot atomunun HOH988 ile, fenil halkasına bağlı ester oksijeninin ise HOH873 ile hidrojen bağı oluşturduğu gözlenmiştir.



Şekil 5.3. GF4 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesindeki (PDB kodu: 4JNM) bağlantı modu

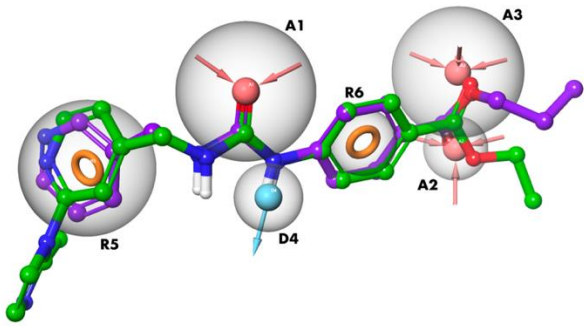
GF8 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesindeki enzim-inhibitör etkileşimler incelendiğinde, **GF4** ile benzer bir bağlantı moduna sahip olduğu gözlenmiştir. **GF4** bileşiği için gözlenen piridin halkası-Phe193 ve fenil halkası-His191 arasındaki π-π etkişimleri, üre

grubuna ait karbonil oksijeni ile Ser275 arasındaki hidrojen bağı, üre grubuna ait azot hidrojenlerinin Val242 ile HOH737 aracılıklı yaptığı hidrojen bağları ve ester grubunun karbonil oksijeni ile His191 arasındaki HOH731 aracılıklı hidrojen bağı, **GF8** bileşiği için de gözlenmiştir. Yine **GF4** bileşiği gibi HOH873 ve HOH988 aktif bölge su molekülleriyle hidrojen bağları meydana getiren **GF8**, **GF4** yapısından farklı olarak taşıdığı imidazol halkası Arg196 ile π-katyon etkileşimine girmiştir.



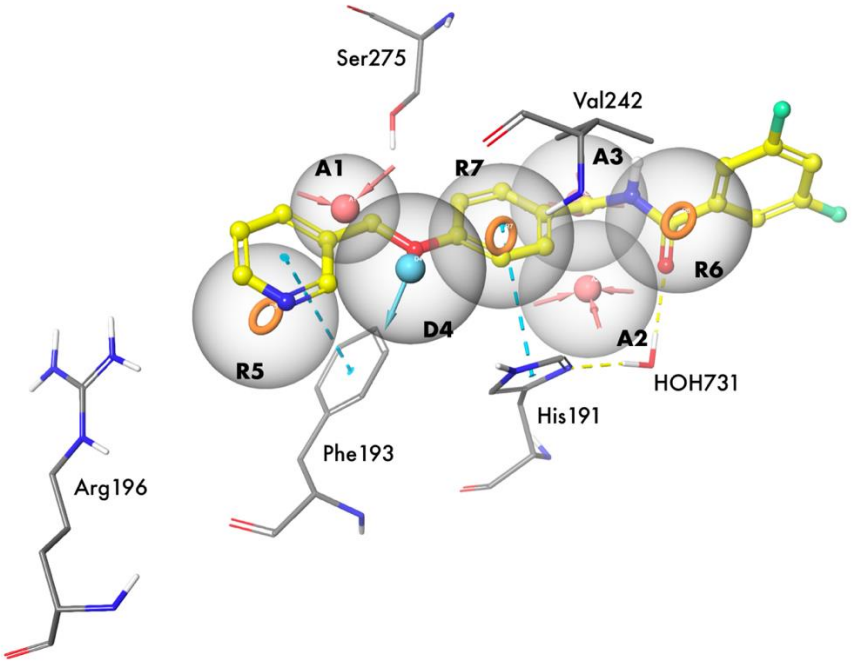
Şekil 5.4. GF8 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesindeki (PDB kodu: 4JNM) bağlantı modu

GF4 ve **GF8** bileşiklerinin aktif bölge amino asitleriyle meydana getirdikleri etkileşimlerin FK866 gibi bilinen NAMPT inhibitörlerinin etkileşimleriyle aynı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bileşikler, bu konformasyonda farmakofor model uyumunu da sağlamıştır. **GF8** bileşiğinin Model 3 bileşeni hidrojen bağı akseptör özelliğini (A2) **GF4** bileşiğine göre tam olarak karşılamaması, iki bileşik arasındaki aktivite farkının sebebi olarak düşünülmüştür (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. GF4 (mor) ve GF8 (yeşil) bileşiklerinin insan NAMPT aktif bölgesindeki bağlanma modları ile Model 3 arasındaki uyum

GF1 bileşiği için belirlenen NAMPT inhibisyon etkisi, **GF4** ve **GF8** bileşiklerinden daha düşük bulunmuştur. Model 1 çıktısı olarak ulaşılan bu bileşiğin insan NAMPT aktif bölgesindeki yerleşimi ve aynı zamanda Model 1 ile olan uyumu incelendiğinde, belirlenen %inhibisyon değerini destekleyici bulgulara ulaşılmıştır. Üre türevi bileşiklerin, Ser275 ve Val242 ile meydana getirdiği hidrojen bağlarını oluşturamayan **GF1**, piridin-Phe193 ve fenil-His191 arasında π-π etkişimleri ve amit karbonili ile His191 arasında HOH731 aracılıklı hidrojen bağı meydana getirmiştir. Fakat bu etkileşimleri sağladığı konformasyon, Model 1 bileşenlerinden hidrojen bağı akseptörü özelliklerini karşılamamaktadır (Şekil 5.6). Sanal tarama çıktısı olarak moleküllerin seçiminde bu durum gözlenmesine rağmen kontrol grubu niteliğinde seçilen bu bileşik, çalışmanın kurgusunu destekler nitelikte sonuç vermiştir.



Şekil 5.6. GF1 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesindeki bağlanma modu ile Model 1 arasındaki uyum

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bilindiği gibi moleküler modelleme teknikleri ilaç tasarımında önemli bir yere sahip olmuş, öncü bileşik elde etmek amacıyla başvurulan ana yollardan biri haline gelmiştir. Bunun yanında moleküllerin aktivite profillerinin geliştirmesinde de sıklıkla kullanılan bir yöntem olmuş, kaptopril, dorzolamit, sakuinavir, zanamivir, oseltamivir, aliskiren gibi pek çok ilacın keşfi ve geliştirilmesinde moleküler modelleme tekniklerinin büyük katkısı olmuştur [88].

Ligand-temelli veya yapı-temelli olarak uygulanan farmakofor modelleme, hedef protein ile ideal bir etkileşim için gerekli elektronik ve sterik özellikleri tanımlamaktadır. Ligand-temeli moleküler modelleme teknikleri hızlıdır ve böylelikle çok büyük bileşik veri tabanlarının hızlı bir şekilde taranmasında faydalıdırlar. Diğer taraftan da yapı-temelli yaklaşımlar ile daha çok çeşitliliğe sahip aktif moleküllere ulaşılabilmekte, fakat ligand-temelli yaklaşımlara göre daha fazla zaman almaktadır. Tez çalışmamız kapsamında planlanan ve uygulanan ligand- ve yapı-temelli yaklaşımların bir arada kullanılması ile her iki avantaja birden sahip olunmuştur [89,90]. İlaç keşfi sürecinde küçük molekül kütüphanelerinin sanal taraması, yüksek çıktılı taramaya (high throughput screening, HTS) karşı etkili bir seçenek olmuştur. Molekül veri tabanları sanal olarak taranıp ilgili farmakofor modele uyan yapılar bulunabilmektedir. Farmakofor model, sanal tarama ve moleküler docking çalışmalarıyla birleştirilerek yeni ve spesifik etkili molekül çıktılarına ulaşmak mümkündür [89–91].

Sonuç olarak, antikanser ilaç geliştirilmesinde ümit veren bir hedef olarak görülen ve gün geçtikçe ilgi odağı haline gelen NAMPT enzimine karşı inhibitör etkili yeni moleküller keşfetmek amacıyla, NAMPT inhibitör aktivitesi bildirilen moleküllerden ve enzim aktif bölgesinin yapısal özelliklerinden yola çıkılarak farmakofor modeller elde edilmiş ve farmakofor-temelli sanal tarama prosedürü uygulanmıştır. Ulaşılan sanal tarama çıktısı moleküllerin *in vitro* NAMPT inhibitör etkinlikleri değerlendirilmiş ve iki yeni NAMPT inhibitörüne ulaşılmıştır. **GF4** (NAMPT IC_{50}=2,26 μM) ve **GF8** (NAMPT IC_{50}=7,42 μM) bileşikleri ileri çalışmalar için öncü moleküller olarak belirlenmiş, inhibitör etkiyi

iyileştirmek amacıyla moleküler modelleme yöntemlerinin de desteğiyle yapısal modifikasyonlara gidilerek daha etkili inhibitörlere ulaşılması hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Sharif, T., Martell, E., Dai, C., Ghassemi-Rad, M.S., Kennedy, B.E., Lee, P.W.K. and Gujar, S. (2018). Regulation of Cancer and Cancer-Related Genes via NAD*+. Antioxidants & Redox Signaling,* 30(6), 906–923.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. Revollo, J.R., Grimm, A.A. and Imai, S. (2007). The Regulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis by Nampt/PBEF/Visfatin in Mammals: *Current Opinion in Gastroenterology*, 23(2), 164–170.

7. Rongvaux, A., Andris, F., Van Gool, F. and Leo, O. (2003). Reconstructing Eukaryotic NAD Metabolism. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 25(7), 683–690.

8. Galli, U., Travelli, C., Massarotti, A., Fakhfouri, 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.

9. 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(1), 10043.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. Poljsak, B. (2016). NAD+ in Cancer Prevention and Treatment: Pros and Cons. *Journal of Clinical & Experimental Oncology*, 5(4), 1-15.

16 . Yaku, K., Okabe, K., Hikosaka, K. and Nakagawa, T. (2018). NAD Metabolism in Cancer Therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 8, 622.

17. Fang, E.F., Lautrup, S., Hou, Y., Demarest, T.G., Croteau, D.L., Mattson, M.P. and Bohr, V.A. (2017). NAD + in Aging: Molecular Mechanisms and Translational Implications. *Trends in Molecular Medicine*, 23(10), 899–916.

18. Christensen, M.K., Erichsen, K.D., Olesen, U.H., Tjørnelund, J., Fristrup, P., Thougaard, 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.

19. Roulston, A. and Shore, G.C. (2016). New Strategies to Maximize Therapeutic Opportunities for NAMPT Inhibitors in Oncology. *Molecular & Cellular Oncology*, 3(1), e1052180.

20. Raffaelli, N., Sorci, L., Amici, A., Emanuelli, M., Mazzola, F. and Magni, G. (2002). Identification of a Novel Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297(4), 835–840.

21. Stein, L.R. and Imai, S. (2012). The Dynamic Regulation of NAD Metabolism in Mitochondria. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 23(9), 420–428.

22. Bieganowski, P. and Brenner, C. (2004). Discoveries of Nicotinamide Riboside as a Nutrient and Conserved NRK Genes Establish a Preiss-Handler Independent Route to NAD+ in Fungi and Humans. *Cell*, 117(4), 495–502.

23. Belenky, P., Christensen, K.C., Gazzaniga, F., Pletnev, A.A. and Brenner, C. (2009). Nicotinamide Riboside and Nicotinic Acid Riboside Salvage in Fungi and Mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 158–164.

24. Eren, G. (2016). Homology Modeling of Human Nicotinamide/Nicotinic Acid Mononucleotide Adenylyltransferase 2: Insights into Isoenzyme-Specific Differences Using Molecular Docking Simulatons. *Letters in Drug Design & Discovery*, 14(6), 727 – 736.

25. Berger, F., Lau, C., Dahlmann, M. and Ziegler, M. (2005). Subcellular Compartmentation and Differential Catalytic Properties of the Three Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase Isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 36334–36341.

26. Heyes, M.P., Chen, C.Y., Major, E.O. and Saito, K. (1997). Different Kynurenine Pathway Enzymes Limit Quinolinic Acid Formation by Various Human Cell Types. *Biochemical Journal*, 326(2), 351–356.

27. 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 (New York, N.Y.)*, 15(10), 1151–1160.

28. 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 NAPRT1-Deficient Tumor Models. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 15(12), 1314–1329.

29. 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*, 19(24), 6912–6923.

30. Kirkland, J. (2009). Niacin Status, NAD Distribution and ADP-Ribose Metabolism. *Current Pharmaceutical Design*, 15(1), 3–11.

31. Olesen, U.H., Christensen, M.K., Björkling, F., Jäättelä, 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.

32. Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Suggs, S. and McNiece, I. (1994). Cloning and Characterization of the CDNA Encoding a Novel Human Pre-B-Cell Colony-Enhancing Factor. *Molecular and Cellular Biology*, 14(2), 1431–1437.

33. Wang, T., Zhang, X., Bheda, P., Revollo, J.R., Imai, S. and Wolberger, C. (2006). Structure of Nampt/PBEF/Visfatin, a Mammalian NAD+ Biosynthetic Enzyme. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(7), 661–662.

34. Preiss, J. and Handler, P. (1957). Enzymatic Synthesis of Nicotinamide Mononucleotide. *The Journal of Biological Chemistry*, 225(2), 759–770.

35. Revollo, J.R., Grimm, A.A. and Imai, S. (2004). The NAD Biosynthesis Pathway Mediated by Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Regulates Sir2 Activity in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 50754–50763.

36. 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.

37. 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.

38. Imai, S. (2009). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (Nampt): A Link between NAD Biology, Metabolism, and Diseases. *Current pharmaceutical design*, 15(1), 20–28.

39. Li, H., Bai, E., Zhang, Y., Jia, Z., He, S. and Fu, J. (2017). Role of Nampt and Visceral Adiposity in Esophagogastric Junction Adenocarcinoma. *Journal of Immunology Research*, 2017, 1-7.

40. Bermudez, B., Dahl, T.B., Medina, I., Groeneweg, M., Holm, S., Montserrat-de la Paz, S., Rousch, M., Otten, J., Herias, V., Varela, L.M., Ranheim, T., Yndestad, A., Ortega-Gomez, A., Abia, R., Nagy, L., Aukrust, P., Muriana, F.J.G., Halvorsen, B. and Biessen, E.A.L. (2017). Leukocyte Overexpression of Intracellular NAMPT Attenuates Atherosclerosis by Regulating PPARγ-Dependent Monocyte Differentiation and Function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(6), 1157–1167.

41. Shackelford, R.E., Mayhall, K., Maxwell, N.M., Kandil, E. and Coppola, D. (2013). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Malignancy. *Genes & Cancer*, 4(11-12), 447–456.

42. Sharma, V., Grubmeyer, C. and Sacchettini, J.C. (1998). Crystal Structure of Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferase from Mycobacterium Tuberculosis: A Potential TB Drug Target. *Structure*, 6(12), 1587–1599.

43. Shin, D.H., Oganesyan, N., Jancarik, J., Yokota, H., Kim, R. and Kim, S.-H. (2005). Crystal Structure of a Nicotinate Phosphoribosyltransferase from Thermoplasma Acidophilum. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(18), 18326–18335.

44. 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.

45. 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.

46. 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.

47. Burgos, E.S. and Schramm, V.L. (2008). Weak Coupling of ATP Hydrolysis to the Chemical Equilibrium of Human Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, 47(42), 11086–11096.

48. Zhang, S., Xu, T., Yang, Z.-L., Han, S., Zhao, Q. and Miao, C. (2018). Crystal Structure-Based Comparison of Two NAMPT Inhibitors. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(2), 294–301.

49. 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.

50. Dietrich, L.S, and Muniz,O., (2002). Inhibition of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase by Pyridine Nucleotides. *Biochemistry*, 11(9), 1691-1695.

51. Nahimana, A., Attinger, A., Aubry, D., Greaney, P., Ireson, C., Thougaard, A.V., Tjørnelund, J., Dawson, K.M., Dupuis, M. and Duchosal, M.A. (2009). The NAD Biosynthesis Inhibitor APO866 Has Potent Antitumor Activity against Hematologic Malignancies. *Blood*, 113(14), 3276–3286.

52. Zoppoli, G., Cea, M., Soncini, D., Fruscione, F., Rudner, J., Moran, E., Caffa, I., Bedognetti, D., Motta, G. and Ghio, R. (2010). Potent Synergistic Interaction between the Nampt Inhibitor APO866 and the Apoptosis Activator TRAIL in Human Leukemia Cells. *Experimental Hematology*, 38(11), 979–988.

53. 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.

54. Kang, G.B., Bae, M.-H., Kim, M.-K., Im, I., Kim, Y.-C. and Eom, S.H. (2009). Crystal Structure of Rattus Norvegicus Visfatin/PBEF/Nampt in Complex with an FK866-Based Inhibitor. *Molecules and Cells*, 27(6), 667–671.

55. 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.

56. 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., Fakhfouri, 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.

57. Fleischer, T.C., Murphy, B.R., Flick, J.S., Terry-Lorenzo, R.T., Gao, Z.-H., Davis, T., McKinnon, R., Ostanin, K., Willardsen, J.A. and Boniface, J.J. (2010). Chemical Proteomics Identifies Nampt as the Target of CB30865, An Orphan Cytotoxic Compound. *Chemistry & Biology*, 17(6), 659–664.

58. You, H., Youn, H.-S., Im, I., Bae, M.-H., Lee, S.-K., Ko, H., Eom, S.H. and Kim, Y.-C. (2011). Design, Synthesis and X-Ray Crystallographic Study of NAmPRTase Inhibitors as Anti-Cancer Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(4), 1153–1164.

59. 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. and Bair, K.W. (2013). Structure-Based Identification of Ureas as Novel Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (Nampt) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(12), 4921–4937.

60. 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. and Bair, K.W. (2013). Structure-Based Discovery of Novel Amide-Containing Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (Nampt) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(16), 6413–6433.

61. 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., 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.

62. Chiang, P.-W., Wang, J., Chen, Y., Fu, Q., Zhong, J., Chen, Y., Yi, X., Wu, R., Gan, H., Shi, Y., Chen, Y., Barnett, C., Wheaton, D., Day, M., Sutherland, J., Heon, E., Weleber, R.G., Gabriel, L.A.R., Cong, P., Chuang, K., Ye, S., Sallum, J.M.F. and Qi, M. (2012). Exome Sequencing Identifies NMNAT1 Mutations as a Cause of Leber Congenital Amaurosis. *Nature Genetics*, 44(9), 972–974.

63. 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., 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.

64. 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., 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.

65. 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 & Pharmaceutical Bulletin*, 37(1), 31–36.

66. 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., 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.

67. 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. and Bair, K.W. (2014). Discovery of Potent and Efficacious Cyanoguanidine-Containing Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (Nampt) Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(1), 337–343.

68. 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.

69. 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(3), 2920–2926.

70. 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.

71. 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.

72. Curtin, M.L., Heyman, H.R., Clark, R.F., Sorensen, B.K., Doherty, G.A., Hansen, T.M., Frey, R.R., Sarris, K.A., Aguirre, A.L., Shrestha, A., Tu, N., Woller, K., Pliushchev, M.A., Sweis, R.F., Cheng, M., Wilsbacher, J.L., Kovar, P.J., Guo, J., Cheng, D., Longenecker, K.L., Raich, D., Korepanova, A.V., Soni, N.B., Algire, M.A., Richardson, P.L., Marin, V.L., Badagnani, I., Vasudevan, A., Buchanan, F.G., Maag, D., Chiang, G.G., Tse, C. and Michaelides, M.R. (2017). SAR and Characterization of Non-Substrate Isoindoline Urea Inhibitors of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(15), 3317–3325.

73. 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.

74. 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*, 23(12), 365–370.

75. 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., 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.

76. 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.

77. 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.

78. Salam, N.K., Nuti, R. and Sherman, W. (2009). Novel Method for Generating Structure-Based Pharmacophores Using Energetic Analysis. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(10), 2356–2368.

79. 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.

80. 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, 225.

81. Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P. and Shenkin, P.S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. *Method and Assessment of Docking Accuracy. Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749.

82. Ramsey, K.M., Yoshino, J., Brace, C.S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H.-K., Chong, J.L., Buhr, E.D., Lee, C., Takahashi, J.S., Imai, S. and Bass, J. (2009) Circadian Clock Feedback Cycle Through NAMPT-Mediated NAD+ Biosynthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5927), 651–654.

83. Watts, K.S., Dalal, P., Murphy, R.B., Sherman, W., Friesner, R.A. and Shelley, J.C. (2010). ConfGen: A Conformational Search Method for Efficient Generation of Bioactive Conformers. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50(4), 534–546.

84. Dixon, S.L., Smondyrev, 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.

85. Irwin, J.J., Sterling, T., Mysinger, M.M., Bolstad, E.S. and Coleman, R.G. (2012). ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(7), 1757–1768.

86. 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.

87. Lipinski, C.A. (2004). Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337–341.

88. Talele, T.T., Khedkar, S.A. and Rigby, A.C. (2010). Successful Applications of Computer Aided Drug Discovery: Moving Drugs from Concept to the Clinic. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(1), 127–141.

89. Banoglu, E., Çalışkan, B., Luderer, S., Eren, G., Özkan, Y., Altenhofen, W., Weinigel, C., Barz, D., Gerstmeier, J., Pergola, C. and Werz, O. (2012). Identification of Novel Benzimidazole Derivatives as Inhibitors of Leukotriene Biosynthesis by Virtual Screening Targeting 5-Lipoxygenase-Activating Protein (FLAP). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(12), 3728–3741.

90. Eren, G., Bruno, A., Guntekin-Ergun, S., Cetin-Atalay, R., Ozgencil, F., Ozkan, Y., Gozelle, M., Kaya, S.G. and Costantino, G. (2019). Pharmacophore Modeling and Virtual Screening Studies to Identify Novel Selective SIRT2 Inhibitors. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 89, 60–73.

91. Lu, S.-H., Wu, J.W., Liu, H.-L., Zhao, J.-H., Liu, K.-T., Chuang, C.-K., Lin, H.-Y., Tsai, W.-B. and Ho, Y. (2011). The Discovery of Potential Acetylcholinesterase Inhibitors: A Combination of Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, and Molecular Docking Studies. *Journal of Biomedical Science*, 18(8), 8.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZGENCİL, Fikriye

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi, yeri : 12.10.1993, Pendik

Medeni hali : Evli

Telefon : 05342863631

E-posta : fikriye.kepenek@hotmail.com

Eğitim Derecesi	**Okul/Program**	**Mezuniyet Yılı**
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2016
Lise	Necip Fazıl Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi, Yıl	**Çalıştığı Yer**	**Görev**
2018-devam ediyor	Ankara Üniversitesi Cebeci Hastanesi	Eczacı
2016-2018	Selçuk Eczanesi	Eczacı

Yabancı Dili

İngilizce



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

