

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

Fikriye ÖZGENCİL¹, Yeşim ÖZKAN², Gökçen EREN¹

¹ SIRTeam Grup, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara
² Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara

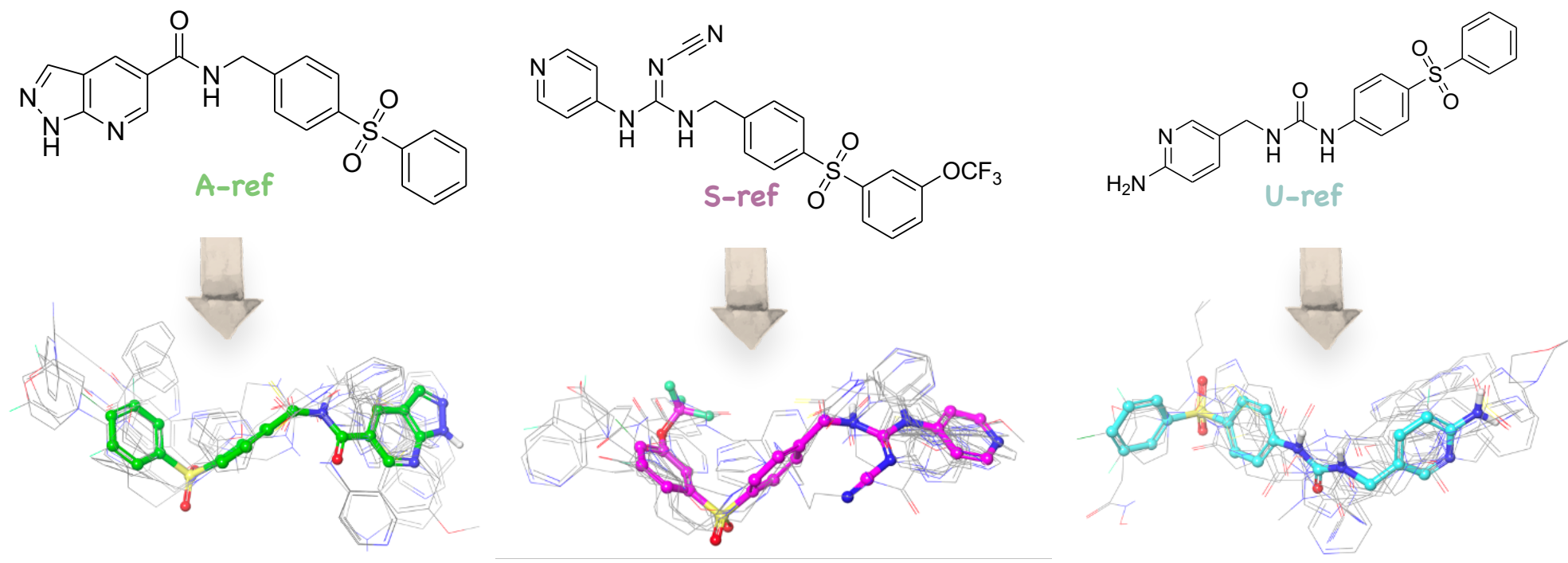
Giriş

Nikotinamit fosforiboziltransferaz (NAMPT), memelilerde nikotinamit adenin dinükleotit (NAD⁺) sentez yolağında yer alan önemli bir enzimdir. NAD⁺ ise sitokin regülasyonu, hücre metabolizması gibi bir çok hücrel süreçte görev alan önemli bir redoks kofaktörüdür ve pek çok hastalık durumunda önemli bir düzenleyici olduğu bilinmektedir [1]. Bu nedenle terapötik olarak ilgi çekici bir hedef olan NAMPT için yeni inhibitör moleküllerin keşfi, başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için önemli hale gelmiştir.

Bu çalışma Bioorganic & Medicinal Chemistry dergisinde yayınlanmıştır: Ozgencil, F., Eren, G., Ozkan, Y., Guntekin-Ergun, S., & Cetin-Atalay, R. Identification of small-molecule urea derivatives as novel NAMPT inhibitors via pharmacophore-based virtual screening. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2020;28(1), 115217.

Veri Setinin Oluşturulması ve Hizalanması

Amit, siyanoguanidin ve üre türevi 27 NAMPT inhibitörü literatürden derlenmiş ve aktif (pIC₅₀ değeri > 5.5 ; 19 molekül) ve inaktif (pIC₅₀ değeri < 5.5; 9 molekül) olarak gruplandırılmıştır.



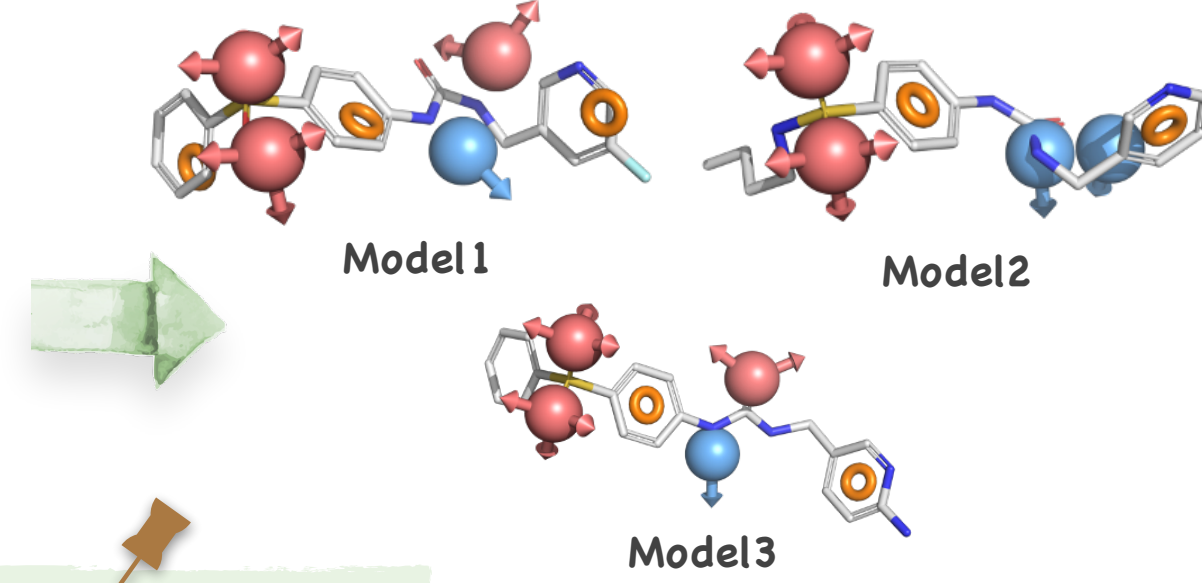
İnsan NAMPT x-ray kristal yapılarına bağlı olarak bulunan amit türevi (PDB kodu: 4M6P) [2], siyanoguanidin türevi (PDB kodu: 4LTS) [3] ve üre türevi (PDB kodu: 4JNM) [4] koligandlara (A-ref, S-ref, U-ref) ait biyoaktif konformasyonlar sabit tutularak hizalamalarda referans olarak kullanılmış ve 3 farklı molekül seti elde edilmiştir.

Farmakofor Modelin Oluşturulması

Ortak Farmakofor Yöntemi

Üç farklı molekül seti kullanarak ortak farmakofor hipotezleri oluşturulmuş, puanlanmış, aktif ve inaktif moleküllerin katkısı temel alınarak sıralanmıştır.

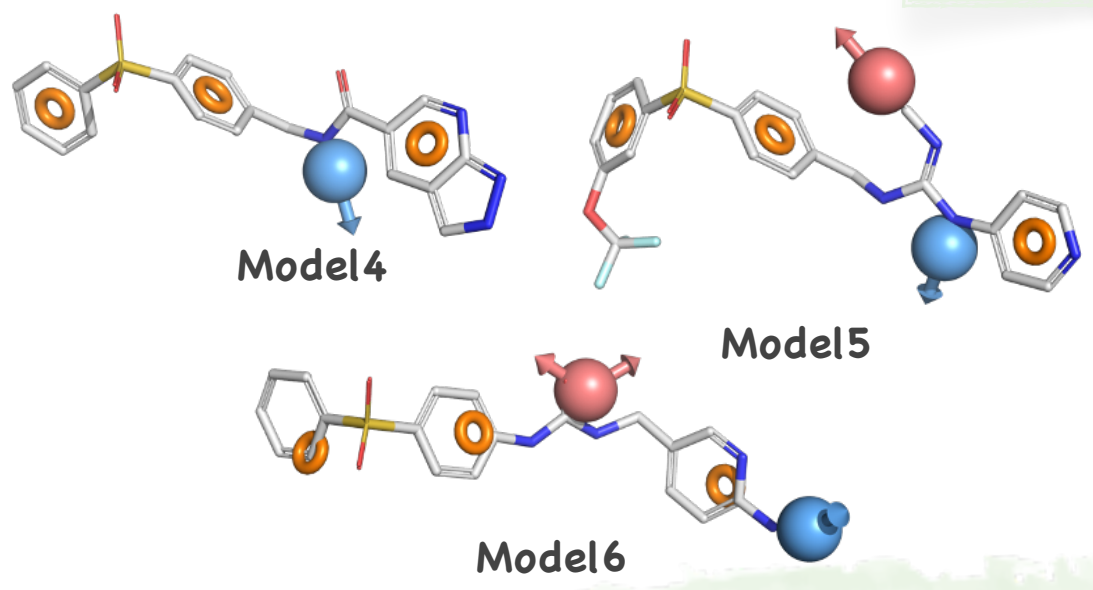
Bu sıralamada en iyi sonuçları veren hipotezler, farmakofor model olarak belirlenmiştir.



Hidrojen bağı akseptörü
Hidrojen bağı donörü
Aromatik halka

E-Farmakofor Yöntemi

Üç ayrı insan NAMPT:inhibitör kompleksi (PDB kodları: 4M6P, 4LTS, 4JNM) kullanılarak da E-Farmakofor yöntemi ile farmakofor modeller oluşturulmuştur.



Farmakofor Model Doğrulama

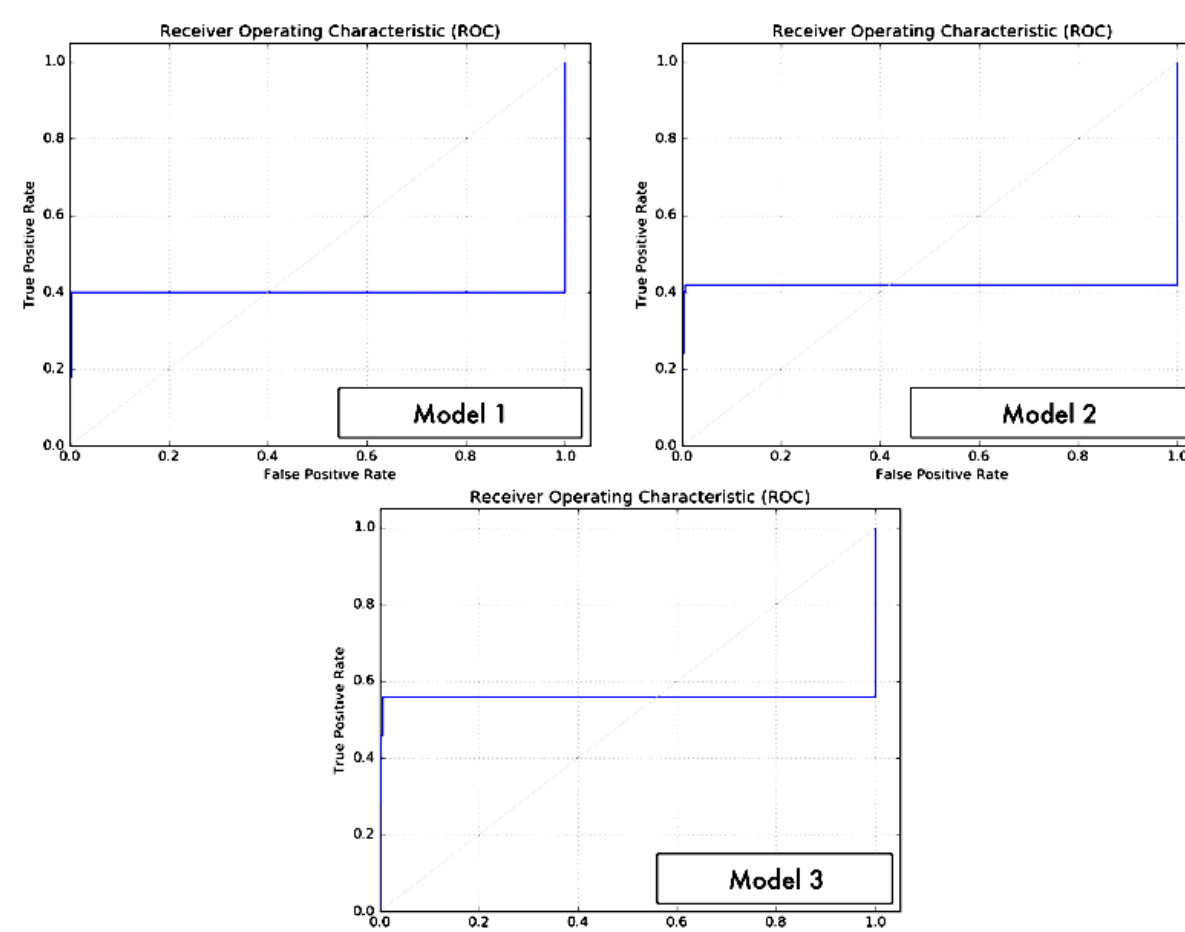
1240 İnaktif molekül (Decoy) + 50 Aktif molekül

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

Farmakofor modellerin verimini ve yeterliliğini ortaya koyan ;

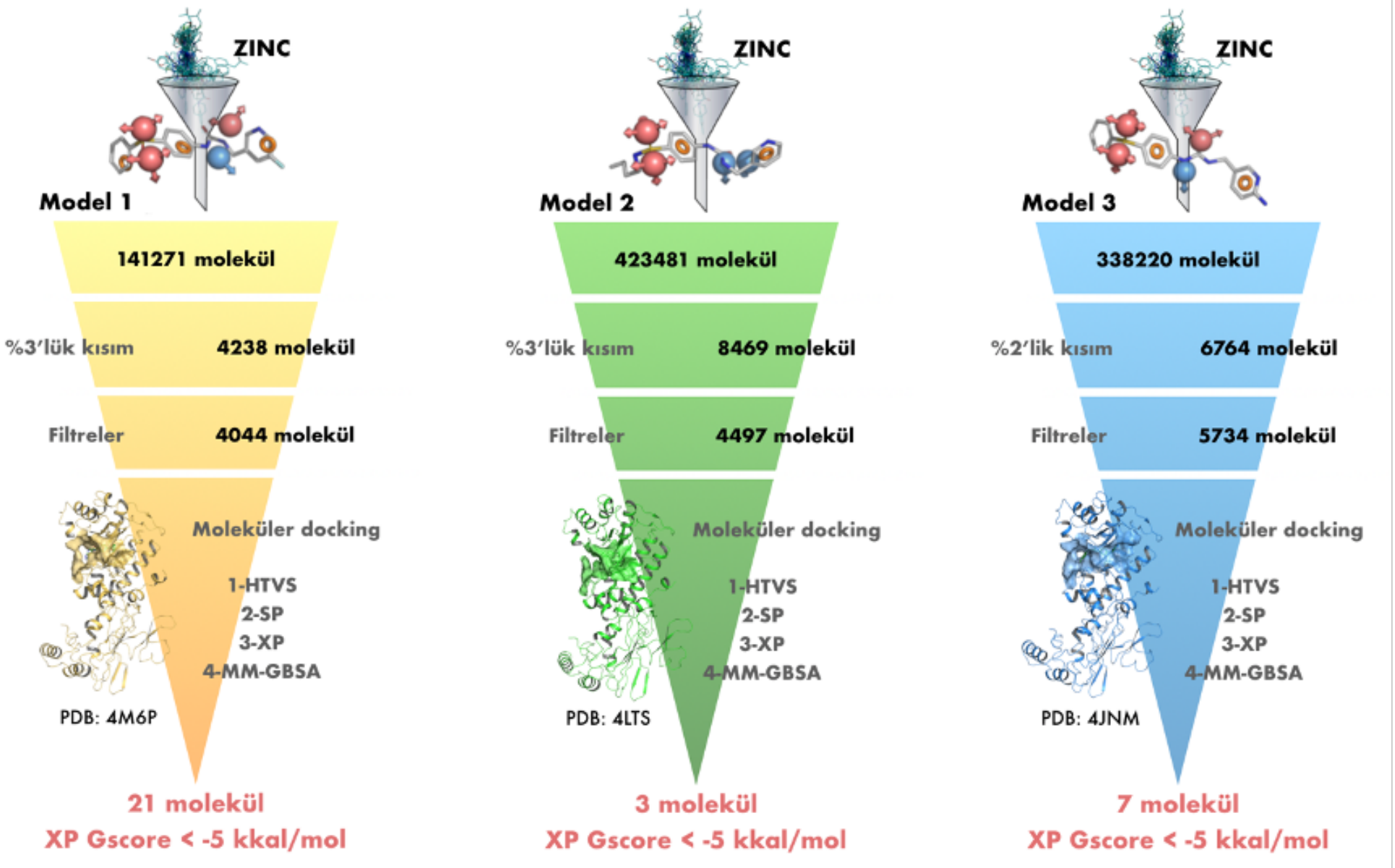
✓ Doğruluk, hassasiyet, EF ve GH gibi göstergeler hesaplanmış, ROC analizleri gerçekleştirilmiştir.

✓ Sanal tarama basamağında kullanılmak üzere ROC grafiklerinde, her model için "model yorulma noktası" belirlenmiştir.



Sanal Tarama

En iyi istatistiksel parametrelere sahip Model 1-3, yaklaşık 13 milyon bileşikten oluşan ZINC "drug-like" sanal kütüphanesinin tarandığı sanal tarama basamağında kullanılmıştır.



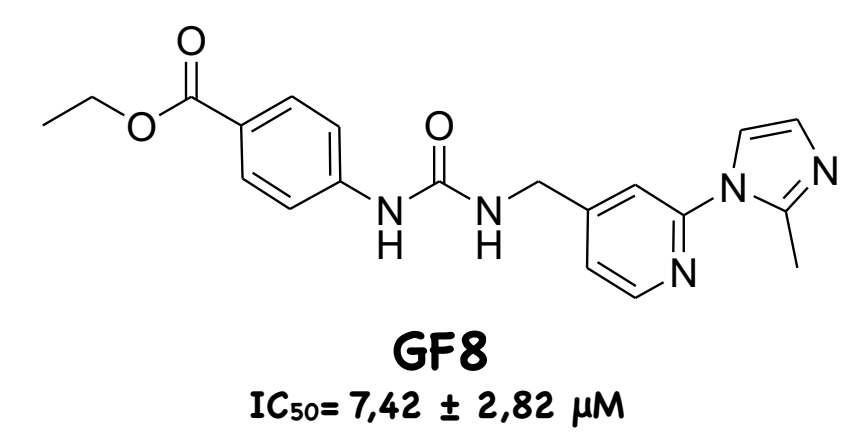
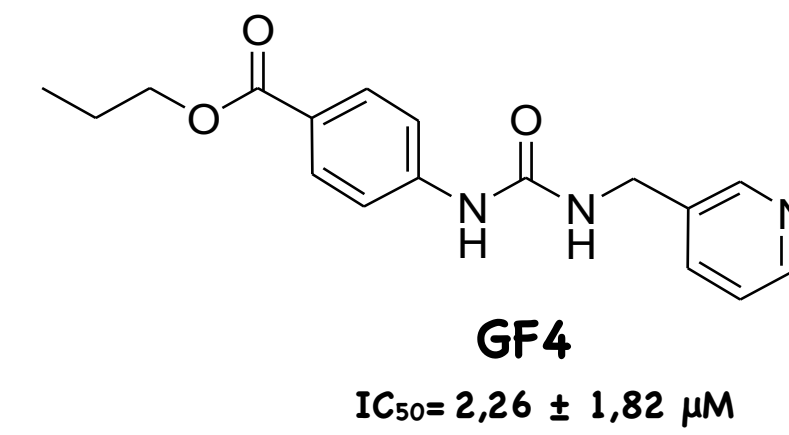
Sanal tarama prosedürü sonunda ulaşılan 31 molekül arasından 10 molekül (GF1-10) kimyasal çeşitliliği sağlayacak şekilde seçilerek biyolojik etki tayini için satın alınmıştır.

Biyolojik Aktivite Çalışmaları

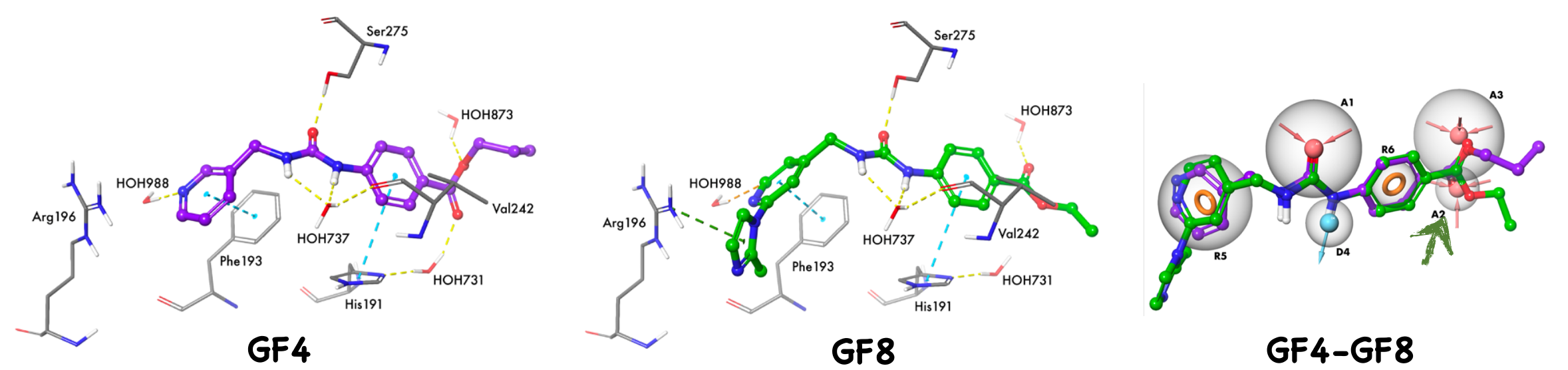
GF1-10, in vitro NAMPT inhibitör etkileri fluorimetrik yöntemle NAMPT enzim kitleri kullanılarak belirlenmiş, GF4 ve GF8 olarak 2 NAMPT inhibitörüne ulaşılmıştır. ✓

Kod	% İnhibisyon değerleri ± standart sapma						
	300 µM	100 µM	30 µM	10 µM	3 µM	1 µM	0,1 µM
GF4	100 ± 0,36	100 ± 0,80	100 ± 0,62	100 ± 0,25	t.e.	14,32 ± 2,59	i.y.
GF8	66,70 ± 0,20	62,20 ± 0,66	59,45 ± 0,41	58,52 ± 0,12	i.y.	i.y.	t.e.

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



Moleküler docking çalışmaları sonucunda GF4 ve GF8 bileşiklerinin aktif bölge amino asitleriyle meydana getirdikleri etkileşimler incelenmiştir.



GF8 bileşiğinin Model 3 bileşeni hidrojen bağı akseptör özelliğini (A2) GF4 bileşiğine göre tam olarak karşılamaması, iki bileşik arasındaki aktivite farkının sebebi olarak düşünülmüştür.

Kaynaklar

- [1] Sharif T, vd., Regulation of cancer and cancer-related genes via NAD⁺. Antioxid Redox Signal. 2019;30(6):906-23.
- [2] Zheng X, vd. Identification of amides derived from 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylic acid as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). Bioorg Med Chem Lett. 2013;23(20):5488-97.
- [3] Zheng X, vd. Discovery of potent and efficacious cyanoguanidine-containing nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2014;24(1):337-43.
- [4] Gunzner-Toste J, vd. Discovery of potent and efficacious urea-containing nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors with reduced CYP2C9 inhibition properties. Bioorg Med Chem Lett. 2013;23(12):3531-8.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK Proje No: 118S726) tarafından desteklenmiştir.