

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

*Caratterizzazione di un PROTAC anti-nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT) in
modelli cellulari di carcinoma mammario e ovarico*

Relatore

Prof.ssa Ambra Grolla

Candidato

Martina Cambursano

Correlatore

Dott.ssa Marianna Moro

Anno Accademico 2024/2025

Sessione Straordinaria

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

4T1 Mouse Mammary Carcinoma Cell Line

ADP Adenosine Diphosphate

AKT Protein Kinase B (PKB), Serine/Threonine Kinase

AR Androgen Receptor

ARDS Acute Respiratory Distress Syndrome

ATP Adenosine Triphosphate

ATTEC Autophagosome-Tethering Compound

B16 Murine Melanoma Cell Line

BRAF B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (proto-oncogene, serine/threonine kinase)

BRCA Breast Cancer

CA125 Cancer Antigen 125

CA15-3 Cancer Antigen 15-3

CAOV Human Ovarian Adenocarcinoma Cells

CAR-T Chimeric Antigen Receptor T-cell

CCL C-C Motif Chemokine Ligand

CCR C-C Motif Chemokine Receptor

c-MYC Myelocytomatosis Oncogene

Cox Cyclooxygenase Enzymes

CRBN Cereblon

CTLA-4 Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4

CXCL C-X-C Motif Chemokine Ligand

DC₅₀ Degradation Concentration 50

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA Deoxiribonucleic Acid

ECL Enhanced Chemiluminescence

ECM Extracellular Matrix

EGF Epidermal Growth Factor

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent AssayLRR

eNAMPT Extracellular form of NAMPT

EOC Epithelial Ovarian Cancer

ER Estrogen Receptor

EV Extracellular Vesicle

FBS Fetal Bovine Serum

FOXM1 Forkhead Box M1

GAPDH Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

G-CSF Granulocyte Colony-Stimulating Factor

GLUT Glucose Transporter

GrzB Granzyme B

HBOC Hereditary Breast and Ovarian Cancer

HCL Hydrochloric Acid

HCT-116 Human Colorectal Carcinoma Cell Line

HE4 Human Epididymis Secretory Protein 4

HEPG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line G2

HER Human Epidermal Growth Factor Receptor

HR Homologous Recombination

HREs Hypoxia Responsive Elements

Huh-7 Human Hepatoma Cell Line 7

HUVEC Human Umbilical Vein Endothelial Cell

Hys247 Hystidine 247

HyT Hydrophobic Tagging

IBD Inflammatory Bowel Disease

IC₅₀ Inhibitory Concentration 50

ICAM Intercellular Cell Adhesion Molecule

ID8 ID8 Mouse Ovarian Surface Eptithelial Cell Line

IFN- γ Interferon Gamma

IL Interleukin

iNAMPT Intracellular Nicotinamide Phosphoribosyltransferase

IR Insuline Receptor

KRAS Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (proto-oncogene, GTPase)

LC3 Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

LPS Lipopolysaccharide

LRR Leucine-Rich Repeat

LS180 Human Colon Adenocarcinoma Cell Line

MAPK Mitogen-Activated Protein Kinase

MCF7 Michigan Cancer Foundation-7

MD Myeloid Differentiation

MDA-MB-231 Anderson-Metastatic Breast-231, Human Breast Cancer Cell Line

MDSC Myeloid-Derived Suppressor Cells

MEM Minimum Essential Medium Eagle

MetAP-2 Methionine aminopeptidase 2

MMP Matrix Metalloproteinase

MSTO Human Mesothelioma Cell Line

mTOR Mammalian Target of Rapamycin

MUC16 Mucin 16, Cell Surface Associated

NA Nicotinic Acid

Na₃VO₄ Sodium Orthovanadate

NAAD Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide

NAD⁺ Nicotinamide Adenine Dinucleotide (oxidized form)

NADH Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced form)

NADS NAD synthase

NaF Sodium Fluoride

NAM Nicotinamide

NAMN Nicotinic Acid Mononucleotide

NAMPT Nicotinamide Phosphoribosyltransferase

NAPRT Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase

NF- κ B Nuclear Factor kappa B

NLRP3 NOD-like receptor family pyrin domain containing 3

NMN Nicotinamide Mononucleotide

NMNATs Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase

OA Osteoarthritis

PAK4 p21-Activated Kinase 4

PARP Poly ADP-ribose Polymerase Inhibitors

PBC Postmenopausal Breast Cancer

PBEF Pre-B-cell Colony Enhancing Factor

PC12 Rat Adrenal Pheochromocytoma Cells

PD1 Programmed Cell Death 1

PDGF-BB Plated-Derived Growth Factor BB

PDL-1 Programmed cell death ligand 1

PEC Peritoneal Exudate Cell

PEG Polyethylene Glycol

PI3K Phosphoinositide 3-Kinase

PI3KCA Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha

PMSF Phenylmethylsulfonyl Fluoride

POI Protein of Interest

PR Progesterone Receptor

PROTAC Proteolysis-Targeting Chimera

PRPP 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphate

PS-PROTAC Photo switchable PROTACs

PTEN Phosphatase and Tensin Homolog

QA Quinolinic Acid

QPRT Quinolate Phosphoribosyltransferase

RIPA Radioimmunoprecipitation Assay Buffer

RNA Ribonucleic Acid

SCF Stem Cells Factor

SIRT Sirtuin

SkMel28 Human Skin Melanoma Cell Line Derived From Metastatic Tissue

SKOV Sloan-Kettering Ovarian Cancer Cell Line 3

STAT Signal Transducer and Activator of Transcription

T47D Human Breast Cancer Cell Line Derived From An Invasive Ductal Carcinoma

TAN Tumor-Associated Neutrophils

TCA Tricarboxylic Acid Cycle

TLR4 Toll-Like Receptor 4

TME Tumor Microenvironment

TNF- α Tumor Necrosis Factor α

TNM Tumor-Node-Metastasis Classification

TP53 Tumor Protein p53

UPS Ubiquitin-Proteasome System

VCAM Vascular Cell Adhesion Molecule

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

VHL Von Hippel-Lindau Protein

WFDC Whey Acidic Four-Disulfide Core

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
<i>Carcinoma ovarico: epidemiologia, patogenesi e classificazione</i>	1
<i>Nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT)</i>	4
<i>NAD⁺ nel metabolismo cellulare</i>	5
<i>iNAMPT</i>	6
<i>eNAMPT</i>	8
<i>NAMPT come target terapeutico</i>	15
<i>Farmaci inibitori</i>	15
<i>Farmaci duali</i>	15
<i>Farmaci degradatori</i>	16
<i>Neutralizzazione di eNAMPT</i>	21
2. SCOPO DELLA TESI	22
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	23
4. CONCLUSIONI	34
5. MATERIALI E METODI	35
6. BIBLIOGRAFIA	38

1. INTRODUZIONE

Carcinoma ovarico: epidemiologia, patogenesi e classificazione.

Il carcinoma ovarico è un tipo di tumore maligno che colpisce le ovaie, gli organi riproduttivi femminili responsabili della produzione di ovociti e ormoni.

Secondo i dati presentati dal GLOBOCAN 2020 (*Global Cancer Statistics 2020*) il carcinoma ovarico viene classificato all'ottavo posto tra le dieci tipologie di cancro più diffuse al mondo, con un'incidenza del 3,4% e una mortalità del 4,7%; sono stati registrati infatti 313.959 nuovi casi e 207.252 decessi stimati a livello globale nel 2020 (1).

Il cancro ovarico colpisce prevalentemente donne comprese tra i 55 e 70 anni d'età, con un picco di incidenza tra i 55 e 59 (2).

Fino agli anni 2000 la malattia era maggiormente diffusa in Europa settentrionale e in nord America. Ad oggi in queste regioni è in calo, mentre è in aumento nelle zone dell'Europa orientale e in Asia (3).

L'insorgenza del cancro ovarico è correlata a diversi fattori di rischio quali l'esposizione a patogeni ambientali, fumo di sigaretta, obesità, infertilità, endometriosi, diabete di tipo II ed ereditarietà genetica. Allo stesso modo secondo alcuni studi sono stati evidenziati quelli che sono i fattori protettivi, fra cui uso di contraccettivi ormonali, gravidanze, utilizzo di alcuni farmaci, come le statine, e interventi chirurgici preventivi. Questi hanno infatti mostrato essere correlati a una minor insorgenza del tumore (3).

Il fattore di rischio genetico nel tumore ovarico è associato principalmente alla mutazione che interessa i geni BRCA1 (*BReast CAncer1*) e BRCA2 (*BReast CAncer2*). I tumori la cui patogenesi è causata da questa mutazione prendono il nome di HBOC (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer*), una condizione genetica che predispone all'insorgenza di tumori al seno femminili e maschili e ai tumori ovarici.

BRCA1 e 2 sono geni oncosoppressori implicati nella riparazione del DNA a doppio filamento mediante ricombinazione omologa (HR), essenziali per la conservazione dell'integrità genomica. Essi regolano anche la citocinesi e la stabilizzazione del genoma nella progressione del ciclo cellulare. La compromissione di tali funzioni potrebbe, di conseguenza, portare all'induzione di segnali pro-sopravvivenza, promuovendo così la trasformazione cellulare (4).

I sintomi del carcinoma ovarico sono poco distintivi, si manifestano ad uno stadio ormai avanzato della malattia e includono dolore pelvico, gonfiore addominale, problemi urinari e una perdita di peso improvvisa.

I tumori ovarici vengono diagnosticati sulla base della storia medica della paziente e su esami medici come prelievo del sangue, urine e visita ginecologica effettuando una conferma con l'esame istopatologico (2).

A causa della tardiva comparsa dei sintomi della malattia, diventa necessario conoscere e validare nuovi marcatori tumorali predittivi a scopo diagnostico.

I marcatori più comunemente usati per il tumore ovarico sono CA125 ed HE4.

CA125 (*Cancer Antigen 125*) è una glicoproteina codificata dal gene MUC16, secreta dagli epitelii di Muller e presente nel flusso sanguigno. CA125 è over-espresso in più dell'80% delle pazienti con tumore ovarico in cui viene usato in combinazione con altri marcatori come HE4, in quanto elevati livelli possono presentarsi anche in altre patologie maligne.

HE4 (*Human Epididymis Secretory Protein 4*) è una proteina appartenente alla famiglia delle WFDC (*Whey Acidic Four-Disulfide Core*), originariamente identificata nell'epitelio dell'epididimo distale. La sua funzione è quella di inibitore peptidico delle proteasi ed è coinvolto nella risposta immunitaria innata dei tessuti epiteliali. Questo enzima viene sovraespresso nel tessuto del carcinoma ovarico ed è maggiormente specifico rispetto a CA125 (5).

L'algoritmo di rischio di malignità ovarica (ROMA) è un test diagnostico che si basa sull'analisi dei livelli sierici di CA125 e HE4, fornendo una maggiore specificità rispetto all'uso del singolo CA125 (6).

Il tumore ovarico è una malattia molto eterogenea: circa il 90% dei tumori ovarici sono di tipo epiteliali, si originano quindi dall'epitelio dell'organo interessato, mentre il restante 10% sono di origine germinale.

I tumori ovarici non epiteliali derivano dalle cellule germinali o dai cordoni genitali e dalle loro cellule. Compaiono principalmente nelle giovani donne e nelle ragazze (2).

I tumori ovarici epiteliali (EOC) rappresentano la maggior parte dei tumori che colpiscono le ovaie e possono essere distinti in base all'istotipo che li caratterizza:

- Carcinomi sierosi ad alto grado
- Carcinomi sierosi a basso grado
- Carcinomi endometrioidi
- Carcinomi a cellule chiare

- Carcinomi mucinosi

La classificazione può essere effettuata anche per grado di malignità raggruppando le tipologie appena descritte in tumori di tipo I e di tipo II.

- Tumori di tipo I (basso grado): rappresentano il 25% di tutti i tumori ovarici. Questi includono carcinomi sierosi, endometrioidi, carcinomi mucinosi e carcinomi a cellule chiare. Le lesioni da cui si sviluppano sono dette tumori borderline. Nei tumori ovarici di tipo I, mutazioni di BRAF e KRAS si riscontrano nel 65% dei casi sebbene possano essere presenti mutazioni su geni quali HER2, PIK3CA e PTEN. I tumori ovarici di tipo I sono caratterizzati da una crescita lenta e da una buona prognosi, con una sopravvivenza a cinque anni nel 55% dei pazienti.
- Tumori di tipo II (bassa maturità e alto grado): sono caratterizzati da dinamiche di crescita rapide e da una progressione aggressiva. Questo gruppo è rappresentato dal carcinoma ovarico sieroso ad alto grado, con un'incidenza del 75% rispetto a tutti i tumori ovarici. Alcuni studi hanno evidenziato come questi potrebbero originare dalla sezione distale o ipofisaria delle Tube di Falloppio. In questo tipo di cancro si riscontrano mutazioni del gene p53 (circa il 90%) e del gene BRCA. I tumori ovarici di tipo II vengono solitamente diagnosticati tardi, in uno stadio avanzato della malattia, con possibile presenza di metastasi. Il tasso di sopravvivenza a 5 anni non supera il 30% (2).

Secondo uno studio pubblicato sull' *American Journal of Pathology* del 2013 è stato evidenziato come da un fenotipo a basso grado si possa verificare un cambiamento a un fenotipo ad alto grado, quindi con una progressione più veloce e aggressiva. In particolare, gli autori hanno condotto questo studio basandosi su un modello di istotipo endometrioidi, il quale ha subito una progressione tipo I/tipo II accompagnata dall'acquisizione di mutazioni sui geni TP53 o PIK3CA. I risultati hanno mostrato quindi come la presenza di questi geni mutati conferisca un fenotipo tumorale maligno, correlato a una prognosi sfavorevole (7).

Il carcinoma ovarico viene trattato secondo diversi approcci terapeutici. Il trattamento standard per il carcinoma epiteliale ovarico in stadio avanzato è la citoreduzione primaria, ovvero la rimozione chirurgica del tumore, seguita da chemioterapia adiuvante per evitare l'insorgenza di recidive.

Inoltre, il tumore può essere bersagliato con terapia farmacologiche più mirate, come ad esempio gli inibitori di PARP (*Poly ADP-ribose polymerase inhibitors*). Questi farmaci, come olaparib e niraparib sono approvati per la terapia di mantenimento dopo la risposta alla chemioterapia, specialmente in pazienti con mutazioni *BRCA*.

Il bevacizumab viene invece impiegato in combinazione con la chemioterapia per contrastare il processo di angiogenesi, ed è approvato per il trattamento di recidiva sensibile al platino.

Inoltre, possono essere utilizzate terapie sperimentali come immunoterapia (inibitori dei checkpoint immunitari anti-PD-1e anti-CTLA-4), farmaci anticorpo-coniugati e cellule CAR-T (8).

Nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT)

La nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT) è un enzima coinvolto nella via di recupero della nicotinamide adenina dinucleotide (NAD^+) e svolge un ruolo vitale nella regolazione dell'attività metabolica cellulare, nella riprogrammazione, nell'invecchiamento e nell'apoptosi (9). NAMPT è una proteina pleiotropica che può esistere non solo in forma intracellulare (iNAMPT), ma anche come forma extracellulare (eNAMPT).

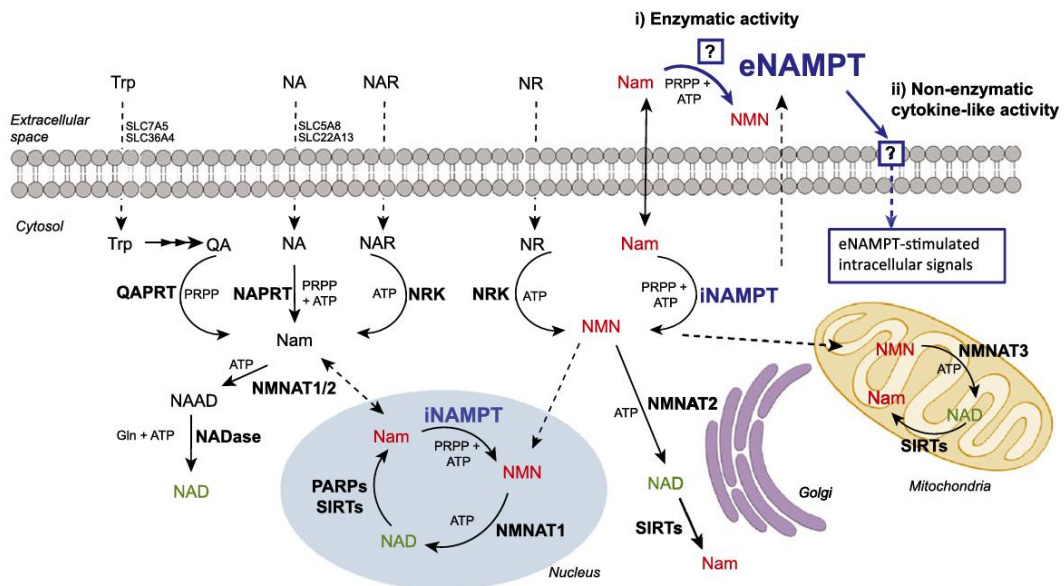


Figura 1 Ruolo e localizzazione cellulare di NAMPT nella biosintesi di NAD^+ (10).

NAD⁺ nel metabolismo cellulare

Il metabolismo cellulare è l'insieme delle reazioni biochimiche che permettono alla cellula di ricavare energia dalla degradazione delle molecole e di utilizzarla per sostenere le tre fondamentali esigenze energetiche della cellula: garantire la manutenzione cellulare, innescare la fermentazione aerobica e raggiungere il massimo tasso metabolico (11).

La principale forma di energia chimica nelle cellule, in condizioni fisiologiche, è l'ATP, che viene prodotta principalmente attraverso due vie: la glicolisi nel citosol e la fosforilazione ossidativa nei mitocondri in presenza di ossigeno (12).

Le cellule tumorali, a differenza di quelle normali, modificano autonomamente il loro metabolismo per soddisfare l'aumentata richiesta bioenergetica e biosintetica, oltre a mitigare lo stress ossidativo necessario per la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali.

Questo fenomeno prende il nome di effetto Warburg o glicolisi aerobica, il quale prevede una riprogrammazione del metabolismo in cui le cellule utilizzano grandi quantità di glucosio per generare preferenzialmente lattato, anche in presenza di ossigeno (13).

Questa riprogrammazione metabolica permette una rapida proliferazione aumentando il flusso glicolitico, che non solo produce ATP ma fornisce anche intermedi per la biosintesi di nucleotidi, amminoacidi e lipidi. Questa alterazione è uno dei principali tratti distintivi della carcinogenesi e comprende un aumento dell'assorbimento e dell'utilizzo di glucosio e amminoacidi, alterazioni del metabolismo lipidico e mitocondriale, modifiche nella sintesi proteica e cambiamenti negli intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). Tali adattamenti diventano essenziali per la sopravvivenza delle cellule tumorali nel microambiente tumorale (TME), caratterizzato da stress ossidativo, ipossia, nutrienti limitati e acidità (14).

In questo contesto tra le varie vie metaboliche che caratterizzano le cellule tumorali, il cofattore NAD⁺ ricopre un ruolo centrale.

Il NAD⁺ è un metabolita essenziale nel mantenimento dell'omeostasi cellulare. Il NAD⁺ agisce come cofattore attraverso la sua interazione con NADH, in molte reazioni enzimatiche del metabolismo energetico, come la glicolisi, la fosforilazione ossidativa, l'ossidazione degli acidi grassi e il ciclo di Krebs.

Il NAD⁺ svolge anche un ruolo nella deacetilazione mediata dalle sirtuine e nella ADP-ribosilazione durante la riparazione dei danni al DNA da parte delle proteine PARP.

In queste reazioni, il NAD⁺ viene degradato e scisso in ADP ribosio e nicotinamide (NAM), che può essere riciclata attraverso un pathway di recupero regolato da NAMPT, la quale è responsabile della maggior parte dei pool cellulari di NAD⁺ (15).

Per soddisfare il proprio fabbisogno energetico, le cellule dei mammiferi possono sintetizzare il NAD^+ attraverso tre vie:

- *de novo*, a partire dal triptofano

-Preiss–Handler

-via di recupero a partire da NAM

La sintesi *de novo* di NAD^+ avviene a partire dal triptofano per generare acido chinolinico (QA) tramite la via delle chinurenine. L'enzima chinolinato fosforibosiltransferasi (QPRT) converte QA in un acido nicotinico mononucleotide (NAMN) e successivamente, gli enzimi nicotinamide mononucleotide adeniltransferasi (NMNATs) catalizzano la formazione dell'acido nicotinico adenin dinucleotide (NAAD) a partire da NAMN. Infine, NAAD viene convertito in NAD^+ dalla NAD sintetasi (NADS) attraverso un'amidazione (16).

La via di sintesi di Preiss–Handler prevede invece la conversione dell'acido nicotinico (NA, vitamina B3), in acido nicotinico mononucleotide (NAMN) attraverso l'enzima acido nicotinico fosforibosiltrasferasi (NAPRT). Successivamente NAMN viene trasformato in NAAD, e poi attraverso la NAD sintetasi in NAD^+ (17).

La via di recupero permette alle cellule di recuperare il NAM per ottenere nuove molecole di NAD^+ . NAM viene convertito in NMN dall'enzima limitante NAMPT, (18) e successivamente NMN viene convertito in NAD^+ dall'enzima NMNAT (19).

Le cellule tumorali mostrano una forte dipendenza da questa ultima via, a causa delle loro elevate esigenze energetiche e biosintetiche, rendendo NAMPT un enzima fondamentale nel mantenimento dei livelli di NAD^+ e nel supporto alla progressione maligna.

NAMPT occupa quindi un ruolo centrale nella via di recupero del NAD^+ e quindi nella regolazione del metabolismo cellulare.

iNAMPT

NAMPT intracellulare è una fosforibosiltransferasi omodimerica di tipo II che catalizza la produzione di NMN a partire dalla nicotinamide e dal pirofosfato di fosforibosio (PRPP), reazione limitante della via di recupero del NAD^+ , influenzandone i livelli intracellulari e gli enzimi NAD-dipendenti (10).

La *iNAMPT* possiede un'attività di autofosforilazione ATP-dipendente sul residuo amminoacidico His247, raggiungendo la massima efficacia catalitica. Alcuni studi hanno infatti dimostrato come una sostituzione dell'istidina con un'alanina (mutazione H247A) causi una

completa perdita dell'attività enzimatica, mentre con una sostituzione con un glutammato si evidenzia una bassa attività (20). Inoltre, è stato riscontrato come il composto SBI-797812 aumenta la produzione di NAD^+ incrementando l'affinità di iNAMPT per l'ATP e stabilizzando la fosforilazione sul residuo His247 (21).

Il gene NAMPT è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7 e presenta diverse regioni regolatorie coinvolte nel controllo della sua espressione. Nel promotore prossimale è stata identificata una regione responsiva allo stress meccanico, che regola il legame del *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5), e altri due elementi responsivi all'ipossia (HRE), i quali mediano l'aumento dell'espressione della forma intracellulare di NAMPT in condizioni di ipossia (22).

La regione promotrice distale presenta invece un sito di legame per il fattore nucleare *kappa-light-chain-enhancer* delle cellule B attivate (NF- κ B), collegando l'espressione di NAMPT alle risposte infiammatorie.

I meccanismi regolatori sopra citati coinvolgono la presenza di un elemento potenziatore che regola l'espressione di iNAMPT e controlla i livelli di NAD^+ . Questo potenziatore è un bersaglio dell'acetilazione di H3K27, un marcatore di cromatina attiva, ed è sito di legame per diversi fattori di trascrizione coinvolti nella progressione tumorale, come c-MYC, STAT3 e FOXM1 (23).

L'enzima NAMPT condivide una somiglianza strutturale con NAPRT, tuttavia contiene un legame a idrogeno che ostacola il legame con NAM (20). Entrambi gli enzimi si trovano nel citoplasma, il quale rappresenta per le cellule tumorali il principale sito per la biosintesi del NAD^+ . Tuttavia, alcuni studi hanno messo in evidenza come la traslocazione di NAMPT all'interno del nucleo sia essenziale per la proliferazione delle cellule neoplastiche, e che come processo sia strettamente correlato al ciclo cellulare (24).

A supporto di questa teoria, lo studio condotto da Grolla e collaboratori nel 2020, ha infatti reso noto il ruolo della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), che può formare un complesso stabile con la NAMPT favorendo la sua traslocazione nucleare. Questa traslocazione fornisce NMN per il ripristino dei livelli di NAD^+ , compensando così l'attivazione degli enzimi NAD^+ -dipendenti in risposta a stimoli di stress (25).

Inoltre, un'elevata espressione di NAMPT è stata identificata come marcatore di cattiva prognosi in diversi tipi di carcinoma. Nel glioblastoma, ad esempio, alti livelli di iNAMPT favoriscono una maggiore proliferazione delle cellule staminali tumorali. Attraverso l'attivazione di specifici

percorsi molecolari legati alla staminalità e alla transizione epitelio-mesenchimale, NAMPT conferisce al tumore una resistenza superiore alle terapie convenzionali (26).

La sovraespressione di iNAMPT è stata riscontrata in molti tumori, fra cui quello dell'ovaio, del colon-retto, della mammella, dello stomaco, del pancreas, della prostata, della tiroide e dell'endometrio, così come in tumori cerebrali (27).

NAMPT è inoltre coinvolta nella regolazione dei processi infiammatori e pro-angiogenici, modulando la risposta delle cellule stromali e immunitarie del microambiente tumorale (28).

Come modulatore pro-angiogenico iNAMPT si è mostrata coinvolta nella conversione tumorigenica da parte dei neutrofili associati al tumore (TAN) in cui la sua espressione correla con G-CSF, fattore stimolante per i granulociti regolatore chiave dell'inversione pro-angiogenica dei neutrofili.

In modelli murini di melanoma e fibrosarcoma, il trattamento dei TAN con il composto FK866 ha ridotto la crescita tumorale e la vascolarizzazione, suggerendo il coinvolgimento di iNAMPT nella polarizzazione dei neutrofili e il suo possibile utilizzo come bersaglio terapeutico (29).

eNAMPT

L'attività della NAMPT non è limitata al compartimento intracellulare, infatti una volta secreta questa può svolgere diverse funzioni nello spazio extracellulare (30).

Secondo i primi studi del 1994 la NAMPT extracellulare è stata identificata come una citochina secreta dalle cellule pre-B e denominata come *fattore di potenziamento delle colonie delle cellule pre-B* (PBEF) per la sua sinergia con l'interleuchina 7 (IL7) e con il fattore delle cellule staminali (SCF) nel processo di formazione delle colonie di cellule pre-B (31).

Successivamente, nel 2007, fu ribattezzata anche con il nome visfatina, ad indicare la sua funzione di adipochina secreta dal tessuto adiposo viscerale e i suoi effetti insulino-mimetici.

In particolare, si è visto come l'effetto della visfatina porti a una riduzione dei livelli di glucosio in seguito al suo legame con il recettore per l'insulina (32). Ad oggi eNAMPT, PBEF e visfatina possono considerarsi la stessa proteina.

La secrezione di eNAMPT avviene in tutti i tipi di cellule a livello basale e in condizioni infiammatorie il suo rilascio aumenta. La sua secrezione non è causata da lisi o morte cellulare, ma è un processo attivo e ben regolato, in individui sani segue i ritmi diurni ed i suoi livelli possono essere monitorati nel siero e in altri fluidi biologici (30).

eNAMPT si comporta da citochina pro-infiammatoria rilasciata da diversi tipi cellulari come i monociti stimolati da LPS (33), i macrofagi del tessuto adiposo viscerale (34) e i leucociti e linfociti del sangue periferico (35). Nel sistema nervoso centrale, l'espressione di eNAMPT è stata osservata nelle cellule PC12 (36), nei neuroni primari (37) e nelle cellule gliali (38).

Sebbene il rilascio di eNAMPT avvenga come meccanismo specifico e in assenza di morte cellulare, da alcuni studi sembrerebbe che possa essere rafforzato e aumentato da condizioni di stress come deprivazione di nutrienti come il glucosio, ipossia e stress ossidativo. Tali condizioni, caratteristiche del microambiente tumorale, suggeriscono quindi una correlazione tra un aumentato rilascio di eNAMPT e il metabolismo della cellula tumorale.

Infatti, è noto come la secrezione di eNAMPT avvenga anche in diverse linee di cellule tumorali, come per esempio cellule tumorali epatiche (HepG2, Huh-7), cellule di carcinoma del colon retto (HCT116, LS180), cellule di carcinoma mammario (MCF7, T47D, MDA-MB-231), cellule di melanoma (SkMel28, B16) e cellule di mesotelioma (MSTO) (10).

La secrezione di eNAMPT può avvenire secondo tre principali stimoli quali lo stress cellulare, segnali nutrizionali relativi a glucosio o insulina e stimoli infiammatori (LPS, TNF- α , IL-1b) (39). Il meccanismo esatto di rilascio di NAMPT nello spazio extracellulare rimane ancora poco chiaro, poiché la proteina, nella maggior parte dei modelli, non viene rilasciata attraverso la via classica di secrezione ER-Golgi, infatti la secrezione è insensibile a inibitori quali brefeldina A o monensina (30).

Nonostante questa evidenza, in uno studio del 2015, Grolla e i suoi colleghi hanno dimostrato come il rilascio di eNAMPT sia diminuito dalla brefeldina A e aumentato con monensina e cloroquina suggerendo il possibile coinvolgimento di molteplici vie di secrezione, includendo il traffico lisosomiale.

In accordo con questa evidenza, nel 2022, gli stessi ricercatori hanno evidenziato come il rilascio di eNAMPT nei macrofagi murini primari (PECs) sia stimolato da IFN- γ tramite la via di secrezione classica, con una riduzione dopo il trattamento con brefeldina e monensina (40).

La secrezione di eNAMPT è influenzata anche dall'azione delle deacetilasi NAD⁺-dipendenti. Studi di mutagenesi effettuati su cellule di tessuto adiposo murino hanno dimostrato infatti che la deacetilazione con SIRT1 promuove la secrezione di NAMPT(41).

Diversamente l'azione di SIRT6 sembrerebbe avere un effetto opposto in quanto la sua espressione limita il rilascio nello spazio extracellulare, mentre se silenziata la secrezione aumenta notevolmente (42).

eNAMPT può anche essere incapsulata in vescicole extracellulari (EV) ed essere trasportata attraverso la circolazione sistemica, fornendo un meccanismo di distribuzione verso i tessuti dell'organismo. Uno studio del 2019 ha infatti evidenziato come le vescicole contenenti eNAMPT, isolate da topi giovani e iniettate in topi adulti, incrementano la biosintesi del NAD⁺ promuovendo un allungamento della durata della vita degli animali (43). Inoltre, il rilascio delle vescicole extracellulari può essere stimolato dall'esercizio fisico, aumentando quindi l'attività di NAD⁺ e SIRT1 (44).

eNAMPT può pertanto essere coinvolta in differenti processi cellulari, per via delle sue molteplici funzioni.

eNAMPT come ectoenzima

Per poter esplicare la sua attività enzimatica, NAMPT deve attivarsi attraverso un processo di dimerizzazione, come dimostrato dalla ridotta attività osservata in alcuni mutanti di NAMPT (S199D e S200D), incapaci di formare dimeri (45, 46).

Nel 2020 è stato dimostrato come in condizioni fisiologiche normali i livelli circolanti di eNAMPT sono dominati dalla forma dimerica, che contribuisce alla biosintesi del NAD⁺ e sostiene la funzione delle cellule β pancreatiche attraverso meccanismi dipendenti dal NAD⁺. Tuttavia, in modelli sperimentali di diabete di tipo 2, l'aumento della concentrazione di eNAMPT nel siero è associato a un progressivo passaggio strutturale verso la forma monomerica. In questi animali, la proporzione di NAMPT come forma monomerica aumenta significativamente, mentre quella della forma dimerica rimane invariata, suggerendo che elevate concentrazioni di eNAMPT favoriscano la disregolazione del dimero (47).

I substrati normalmente utilizzati da NAMPT, ovvero NAM, PRPP, e l'ATP, molecola chiave per la conversione di NMN in NAD⁺, sono presenti in basse concentrazioni o quasi assenti nell'ambiente extracellulare in condizioni fisiologiche (48). La limitata disponibilità di substrati sembra non consentire quindi che ci sia un'attività enzimatica sostenuta e funzionale al di fuori della cellula.

Tuttavia, come già detto in precedenza, in condizioni patologiche come quelle che presenta il microambiente tumorale, l'attività enzimatica di eNAMPT può aumentare. L'aumento di necrosi all'interno del tumore può consentire ai substrati di eNAMPT di essere presenti a concentrazioni maggiori, creando un ambiente favorevole per l'immunometabolismo, e il pH acido, tipico nelle aree ipossiche, può interferire con la sua attività enzimatica (49).

eNAMPT come adipocitochina

Il ruolo di NAMPT come adipocitochina è stato descritto per la prima volta nel 2005 in uno studio che riportava la secrezione di NAMPT da parte degli adipociti di topo e di ratto in esperimenti *in vitro* (50).

Le adipocitochine sono molecole rilasciate dai tessuti adiposi, coinvolte nella regolazione dell'omeostasi del glucosio, del peso corporeo, dell'infiammazione, della pressione sanguigna e della tumorigenesi (51).

Nello studio citato, gli autori hanno ipotizzato che eNAMPT, in modo simile all'insulina, potesse ridurre i livelli di glucosio, sia in colture di adipociti che *in vivo*. Tale ipotesi è stata confermata da studi successivi che hanno dimostrato che l'effetto insulino-mimetico è presente anche negli osteoblasti umani(52) e nelle cellule mesangiali glomerulari (53).

Al contrario, in alcune cellule come quelle del muscolo scheletrico, la riduzione dei livelli di glucosio mediata da NAMPT non coinvolge la fosforilazione del recettore per l'insulina (IR) (54), pertanto, il ruolo insulino-mimetico di NAMPT è ancora un argomento poco chiaro e controverso.

eNAMPT può anche svolgere un ruolo fondamentale nel mantenere la vitalità e la funzione delle cellule β -pancreatiche, in quanto previene l'apoptosi e il malfunzionamento metabolico indotto dagli acidi grassi liberi in cellule pancreatiche murine (55). Un altro studio ha rivelato che la somministrazione di NMN esogeno a topi alimentati con una dieta ricca di grassi ha ripristinato la loro tolleranza al glucosio e il profilo lipidico, regolarizzando i livelli di NAD^+ .

eNAMPT nella sua funzione di adipocitochina agisce quindi come molecola segnale del tessuto adiposo, contribuendo al mantenimento del metabolismo cellulare grazie alla propria attività enzimatica.

eNAMPT come mediatore dell'infiammazione

L'attività pro-infiammatoria di eNAMPT è ben documentata da numerosi studi che hanno dimostrato come eNAMPT attivi in diverse vie di segnalazione infiammatoria, tra cui quella del fattore nucleare *kappa-light-chain-enhancer* delle cellule B attivate (NF- κ B), la via delle MAPK chinasi e quella di STAT3, trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione 3.

L'attivazione di questi percorsi porta alla produzione di molecole pro-infiammatorie come le citochine IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e le chemochine CCL2 e CCL20 (30).

eNAMPT è in grado non solo di indurre la chemiotassi delle cellule immunitarie, ma anche di promuovere la loro proliferazione e il loro differenziamento (56, 57). Uno studio del 2018 ha

dimostrato che eNAMPT può guidare il processo di reclutamento dei monociti e il loro differenziamento in macrofagi, in particolare la polarizzazione nei due diversi fenotipi M1 ed M2 (58). La polarizzazione M2 è stata osservata da monociti di pazienti leucemici (56), mentre quella di tipo M1 in monociti di donatori sani (59).

In generale, eNAMPT appare come una molecola in grado di modulare la risposta immunitaria innata, in particolare in monociti e in macrofagi. Ad esempio, uno studio a riguardo ha evidenziato che eNAMPT riesce a garantire la sopravvivenza di macrofagi murini bloccando l'apoptosi indotta da stress del reticolo endoplasmatico attraverso l'attivazione di STAT3 (60).

eNAMPT induce inoltre l'espressione di molecole co-stimolatorie nei monociti umani, come CD40, CD54 e CD80; è quindi in grado di promuovere le funzioni effettrici di queste cellule, in particolare, la fagocitosi (61).

eNAMPT come fattore pro-angiogenesi

L'azione pro-infiammatoria di eNAMPT non si limita esclusivamente alle cellule del sistema immunitario. Si trova coinvolta anche in processi come l'infiammazione vascolare, in cui favorisce l'aumento delle molecole di adesione delle cellule endoteliali e vascolari (ICAM-1 e VCAM-1) (62), e il processo di attivazione del complesso dell'inflammosoma NLRP3, con conseguente rilascio di IL-1 β e IL-18 (63).

NAMPT promuove anche la proliferazione, la migrazione e la formazione di vasi *in vitro* delle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) (64, 65).

Inoltre, eNAMPT promuove la produzione e la secrezione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e l'espressione del recettore VEGF2 nelle cellule endoteliali e nelle cellule epiteliali amniotiche tramite l'attivazione delle vie di segnalazione MAPK e PI3K/AKT/mTOR (66, 67).

Infine, è stato dimostrato che eNAMPT partecipa indirettamente al rimodellamento della matrice extracellulare (ECM), un processo che crea un microambiente favorevole all'angiogenesi attraverso la regolazione positiva delle proteasi coinvolte nella degradazione della membrana basale vascolare (gelatinasi MMP-2 e -9 e collagenasi MMP-1 e -8) (66, 68–70).

Oltre ai meccanismi precedentemente citati, studi recenti hanno evidenziato un ruolo specifico di eNAMPT nell'angiogenesi tumorale mediata dai periciti, cellule specializzate dei vasi sanguigni.

In modelli preclinici di carcinoma mammario triplo negativo, eNAMPT agisce come un potente chemioattrattore per i periciti, promuovendone il reclutamento e la copertura dei vasi neoformati. Questo effetto avviene in sinergia con PDGF-BB (*Plated-Derived Growth Factor BB*), portando allo sviluppo di una rete vascolare anomala.

A livello molecolare, la eNAMPT attiva la via NF- κ B, inducendo l'espressione di chemochine (CXCL8, CXCL1, CCL2) e molecole di adesione (VCAM1), promuovendo un microambiente tumorale pro-infiammatorio e pro-angiogenico. Il trattamento con l'anticorpo neutralizzante C269 ha significativamente ridotto l'angiogenesi e le metastasi, suggerendo che il blocco di eNAMPT possa rappresentare una promettente strategia terapeutica anti-angiogenica nel carcinoma mammario triplo negativo (71).

Recettori cellulari di eNAMPT

La rapida attivazione dei diversi pathway intracellulari in pochi minuti dall'esposizione a eNAMPT, suggerisce che questa proteina eserciti le sue funzioni tramite il legame a uno o più recettori presenti sulla superficie cellulare (10, 56).

Negli ultimi anni, sono stati identificati diversi presunti recettori di superficie cellulare per eNAMPT. Fra questi due in particolare sono supportati maggiormente dalle evidenze sperimentali riportate in numerosi studi.

Il primo è il recettore per la chemochina di tipo 5 (CCR5), il cui legame con la NAMPT extracellulare è stato dimostrato in uno studio del 2012 (72).

Diversi anni dopo, nel 2020, è stato scoperto che la conformazione di eNAMPT è simile a quella di CCL7, un noto ligando di CCR5 ipotizzando quindi che eNAMPT, esattamente come CCL7, agisca come antagonista di CCR5 (73). Inoltre, l'interazione tra CCR5 e eNAMPT è anche stata confermata attraverso un saggio di legame ELISA (74).

Il recettore di eNAMPT più caratterizzato è invece il recettore Toll-like 4 (TLR4), coinvolto in diversi pathway infiammatori. Studi di omologia di sequenza e strutturale hanno mostrato similitudini tra NAMPT e MD-2 (fattore di differenziazione mieloide), una proteina fondamentale che si associa al recettore TLR4 per l'attivazione indotta da LPS.

Interagendo con il fattore TLR4, NAMPT attiva la via di NF- κ B (75), infatti, con il silenziamento di TLR4 in macrofagi murini ha dimostrato una riduzione dell'attivazione del pathway (76).

Un altro studio ha suggerito come eNAMPT possa promuovere la disfunzione vascolare in modelli murini attraverso una via mediata da TLR4. In particolare, gli autori hanno mostrato che

un inibitore specifico del recettore, CLI-095, previene l'alterazione mediata da eNAMPT alle cellule endoteliali (77).

L'interazione tra eNAMPT e il recettore TLR4 avviene a livello di due regioni di N-terminale, denominate come $\alpha 1$ - $\alpha 2$ e $\beta 1$ - $\beta 2$ (78); inoltre, è stato dimostrato che il segmento amminoacidico 57-65 di eNAMPT interagisce direttamente con il dominio ricco di leucina (LRR) di TLR4 (79). Tuttavia, la questione dei recettori di eNAMPT rimane ancora oggetto di studio. Infatti, studi recenti hanno dimostrato come eNAMPT possa promuovere l'espressione di geni infiammatori correlati ad un fenotipo M1 nei macrofagi (Il6, Il1b, Cox2 e Tnf), indipendentemente dall'interazione con TLR4. Nello stesso studio, è stato anche riportato come un antagonista molecolare competitivo di CCR5 (*maraviroc*) non alteri l'attivazione dei macrofagi M1 indotta da eNAMPT. Questo suggerisce dunque che eNAMPT possa interagire sulla superficie cellulare attraverso il legame con recettori differenti da quelli maggiormente noti e studiati fino ad oggi (40).

Ruolo fisiopatologico di NAMPT

Elevati livelli di eNAMPT sono stati riscontrati in diverse patologie metaboliche e infiammatorie umane, fra cui diabete, obesità, aterosclerosi, cancro, osteoartrite (OA), artrite reumatoide, malattie infiammatorie intestinali (IBD) e lesioni polmonari (30).

eNAMPT è anche stata oggetto di studio per il suo potenziale ruolo come biomarcatore nel cancro al seno nelle pazienti in postmenopausa. In queste pazienti i livelli di eNAMPT sono più elevati rispetto ai controlli, con una correlazione positiva con la stadiazione TNM (tumore-linfondi-metastasi), dimensione del tumore, metastasi ai linfonodi e classificazione istologica (80).

Secondo uno studio del 2012, alti livelli di eNAMPT sono stati registrati nelle pazienti con carcinoma mammario postmenopausa (PBC: *Postmenopausal Breast Cancer*) di sottotipo ER-/PR- e correlati con il marcatore tumorale CA15-3. Rispetto a CA15-3, NAMPT ha dimostrato una maggiore sensibilità diagnostica per i tumori PBC in fase precoce, e nella distinzione di pazienti ER-/PR- (81).

NAMPT come target terapeutico

Farmaci inibitori

Sono stati sintetizzati diversi inibitori della NAMPT, che hanno dimostrato una forte potenza biochimica e cellulare, evidenziando il ruolo essenziale del NAD⁺ nella sopravvivenza delle cellule tumorali.

Il primo inibitore sintetizzato nel 2003 è stato FK866, noto anche come APO866, ed ha mostrato un'attività antitumorale a concentrazione (nel range nanomolare), con un IC₅₀ di 1 nM (82). FK866 si lega all'interfaccia dell'omodimero NAMPT, coprendo parzialmente il sito di legame del NAM. L'azione di FK866 causa una riduzione notevole del NAD⁺ intracellulare inducendo il segnale per la morte programmata; questo è stato osservato in cellule umane di leucemia (83) e in cellule tumorali epatiche HEPG2 (84).

Il secondo inibitore di NAMPT prende il nome di CHS-828, anche noto come GMX1778. Questo composto a base di cianoguanidina piridilica porta ad apoptosi le cellule tumorali principalmente attraverso la deplezione di NAD⁺ in modo simile a FK866 (85).

Successivamente è stato sintetizzato un terzo composto, GMX1777. Questo profarmaco è stato sviluppato a partire dal suo composto originale CHS-828, per migliorare il profilo farmacocinetico e la solubilità. Il profarmaco ha mostrato un'azione più potente nei tumori *in vivo* (86).

Gli inibitori di NAMPT hanno completato le sperimentazioni cliniche di fase I, ma nella fase II hanno mostrato un'efficacia antitumorale limitata, una farmacocinetica scarsa e tossicità come trombocitopenia, anemia, neutropenia, linfopenia e diarrea (87, 88).

Dato il ruolo cruciale del NAD⁺ nel sostenere la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali, sono state sviluppate diverse nuove strategie più selettive per ridurre i livelli di NAD⁺ all'interno delle cellule tumorali.

Farmaci duali

Nel trattamento del cancro, i metodi di somministrazione di un singolo farmaco sono spesso limitati da bassa efficacia, resistenza ai farmaci e tossicità. Combinare gli inibitori di NAMPT con altre strategie offre diversi vantaggi, come la riduzione dei problemi di farmacocinetica, attraverso l'uso simultaneo di due farmaci.

Un esempio di doppio inibitore è STF31, testato per la sua attività sia su NAMPT che su GLUT1 in diverse linee cellulari tumorali (89).

Un altro composto è KPT-9274, che prende di mira sia NAMPT sia la chinasi PAK4 (90). Questo inibitore è stato testato su diverse linee cellulari, fra cui quelle di cancro ovarico utilizzando come modello preclinico sferoidi 3D resistenti al platino.

I risultati evidenziano che KPT-9274 limita la funzione mitocondriale e induce l'apoptosi cellulare tramite l'inibizione della chinasi PAK4 in modo dipendente da NAD^+ , suggerendo una nuova potenziale terapia per il cancro ovarico in pazienti resistenti ai farmaci a base di platino (91).

Questi inibitori duali rappresentano un approccio promettente per migliorare le strategie terapeutiche mirando al metabolismo e alle vie di segnalazione del cancro.

Farmaci degradatori

Negli ultimi anni, la tecnologia PROTAC (*Proteolysis-Targeting Chimera*) è emersa come uno degli approcci più promettenti per eliminare specifiche proteine associate a malattie sfruttando il meccanismo di distruzione naturale delle cellule.

La tecnologia PROTAC agisce attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), un sistema che le cellule utilizzano per la degradazione delle proteine, come quelle danneggiate o mal ripiegate (92).

I PROTAC sono delle molecole eterobifunzionali costituite da tre componenti fondamentali: un ligando in grado di riconoscere e legarsi alla proteina di interesse (POI), un ligando che interagisce con una ligasi E3 dell'ubiquitina (VHL o CRBN) reclutandola in modo selettivo, e un linker chimico che unisce i due ligandi e permette l'assemblaggio del complesso ternario POI-PROTAC-E3. Una volta formato il complesso ternario le molecole di ubiquitina vengono trasferite sulla proteina e la proteina d'interesse viene degradata (93).

Al contempo, il PROTAC viene riciclato attraverso un meccanismo catalitico.

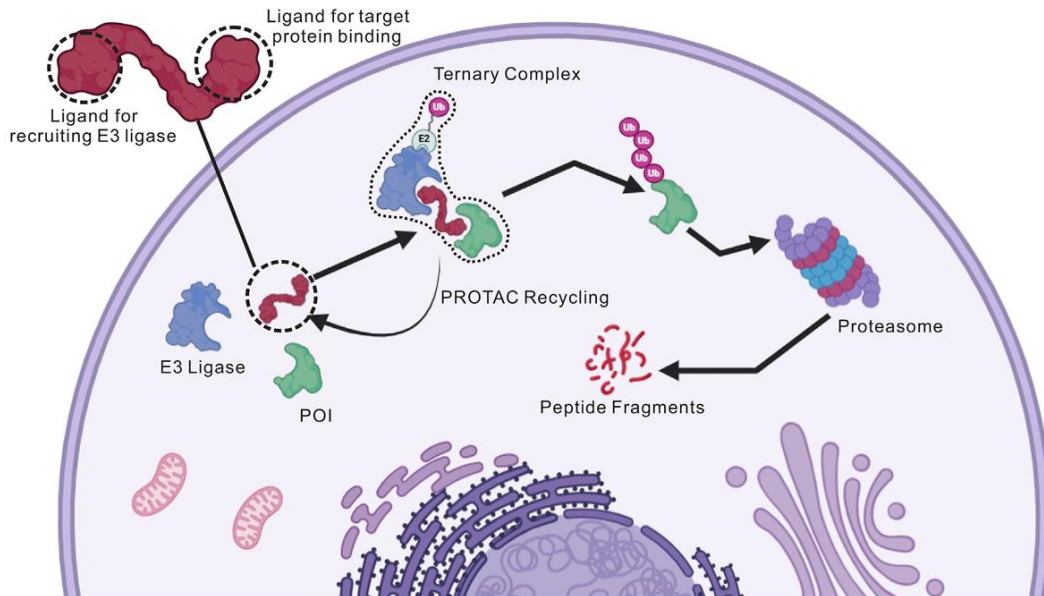


Figura 2 Meccanismo d'azione del PROTAC: formazione del complesso ternario e degradazione proteosomica (94).

Un elemento importante nella progettazione dei PROTAC è il linker, la cui composizione può influenzare la solubilità della molecola, la permeabilità cellulare e la libertà di movimento tra il POI e il ligando della ligasi E3 (95).

L'ubiquitinazione è un processo che implica la modifica covalente di un residuo di lisina delle proteine destinate alla degradazione, mediata dall'azione di tre enzimi fondamentali: E1 (enzima ubiquitina attivante), E2 (enzima ubiquitina coniugante) ed E3 (ubiquitina ligasi).

Nel primo passaggio E1 si lega alla molecola di ubiquitina nel suo sito attivo grazie all'idrolisi di una molecola di ATP, e la trasferisce all'enzima E2. E2 interagisce con il substrato legato a E3, in questo modo l'ubiquitina viene trasferita al substrato da degradare.

Il substrato poliubiquitinato viene trasportato al proteasoma 26S e degradato.

Dopo la degradazione, l'ubiquitina libera viene riciclata e può rientrare nel ciclo legandosi di nuovo a E1, iniziando un nuovo ciclo di ubiquitinazione delle proteine (96).

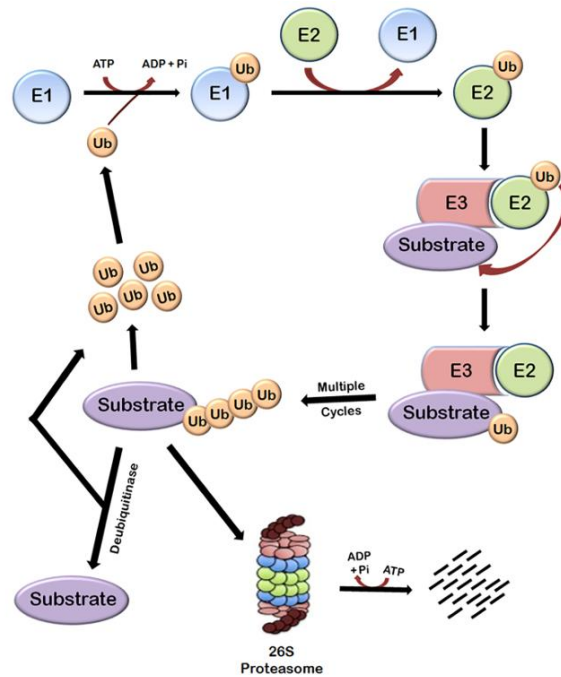


Figura 3 Meccanismo di degradazione attraverso il complesso ubiquitina-proteosoma (96).

La prima molecola PROTAC è stata sviluppata nel 2001 per la degradazione della proteina MetAP-2 (metionina aminopeptidasi-2) (97).

Il primo PROTAC ad entrare in sperimentazione clinica nel 2019 è stato ARV-110 (bavdegalutamide), un PROTAC sviluppato per il trattamento del carcinoma prostatico resistente alla castrazione. ARV-110, attraverso il reclutamento della ligasi Cereblon è in grado di guidare la degradazione del recettore degli androgeni (AR) (98).

Basandosi sul reclutamento di CRBN, è stato poi sviluppato ARV-471 (vepedegestrant), un PROTAC orale per la degradazione del recettore degli estrogeni (ER) nel carcinoma mammario. vepdegestrant ha dimostrato un profilo di sicurezza favorevole, una bassa tossicità gastro-intestinale e una buona riduzione dei livelli di ER. Al momento ARV-471 si trova in studio clinico di fase III, dove, confrontato con l'inibitore fulvestrant, ha mostrato una maggiore efficacia nei tumori con mutazione ESR1 rispetto ai tumori wild-type (99).

Nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi PROTAC contro la NAMPT.

Il primo PROTAC anti-NAMPT, PROTAC A7, è stato identificato come un degradatore potente e selettivo della NAMPT, in grado di agire su iNAMPT che eNAMPT.

In vivo, A7 degrada efficacemente la NAMPT, riducendo il reclutamento delle cellule soppressorie derivate dalla linea mieloide (MDSC) in modelli di cancro del colon-retto (100).

Un anno dopo, lo stesso gruppo di ricerca ha sviluppato un PROTAC B3, a partire dall'inibitore MS0, in grado di legare VHL. PROTAC B3 induce efficacemente la degradazione di NAMPT in maniera dipendente dalla concentrazione e dal tempo attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma. PROTAC B3 è stata testata su delle cellule di carcinoma ovarico epiteliale (EOC), in cui ha portato alla riduzione della vitalità e all'inibizione della crescita tumorale in modelli xenotrapiantati, mantenendo una bassa tossicità. Rispetto ad A7, B3 mostra una selettività del bersaglio distinta e una potenza antiproliferativa migliorata nei modelli di EOC (101).

A partire dalla struttura di B3, è stato sviluppato PROTAC fotosensibile (PS). Questa molecola è caratterizzata dalla capacità di cambiare conformazione in base alle lunghezze d'onda di luce con cui viene irradiata, attraverso l'aggiunta di un linker sensibile alla luce. Il linker, a seconda delle lunghezze d'onda con cui viene stimolato può adottare sia forme *cis* che *trans*, consentendo di modulare i livelli di NAMPT e NAD^+ in modo dipendente dalla luce. In una conformazione, il PROTAC avvicina la proteina target all'E3, promuovendo l'ubiquitinazione e la degradazione, mentre nell'altra conformazione il complesso ternario è destabilizzato, prevenendo la degradazione. Questa modifica permette il controllo spazio-temporale dell'attività del PROTAC e contribuisce a ridurre la tossicità rispetto agli inibitori classici di NAMPT. Lo stesso studio ha mostrato che PS-PROTAC B3 manteneva la capacità di degradare e ridurre la crescita tumorale dopo un'iniezione endovenosa in un modello xenotrapiantato di carcinoma ovarico (102).

In aggiunta, uno studio del 2023 ha portato allo sviluppo di PROTAC C5, a partire dall'inibitore FK866. Dalle evidenze sperimentali, in cellule di carcinoma ovarico A2780 ha ridotto notevolmente la crescita cellulare, senza causare effetti citotossici sulle cellule sane, al contrario dell'inibitore originale (103).

Rispetto agli inibitori convenzionali a piccole molecole, i PROTAC sono vantaggiosi in quanto permettono la degradazione selettiva della proteina di interesse: in questo modo si amplia la gamma di proteine bersaglio, che vengono così completamente degradate e inibite nelle loro funzioni non enzimatiche. Ulteriore vantaggio è che, a parità di efficacia, possono essere utilizzati a basse dosi terapeutiche (93).

Al contempo, sono ancora oggetto di studio rischi e svantaggi, quali la degradazione prolungata o di tipo off-target, competizione con substrati naturali delle ligasi e il fenomeno definito *hook effect*. Quest'ultimo rappresenta la condizione per cui, a concentrazioni maggiori di farmaco, i PROTAC saturano il legame con la POI o con la ligasi E3, andando a formare non più il complesso ternario funzionale alla degradazione, bensì complessi binari (104).

A causa di alcune limitazioni dei PROTAC, come la dipendenza dall'espressione di specifiche ligasi E3, la necessità della formazione di un complesso ternario e l'elevato peso molecolare, sono state sviluppate nuove strategie alternative di degradazione.

Una di queste è l'uso di un tag idrofobico (HyT), che elimina la necessità dei ligandi per le ligasi E3 per degradare le proteine d'interesse. Infatti, la tecnologia alla base delle molecole HyTag prevede la coniugazione di un ligando che si lega alla POI collegato tramite un linker ad un tag idrofobico. Questo legame promuove uno scorretto ripiegamento della proteina e il successivo riconoscimento da parte del sistema di controllo qualità cellulare, portando infine alla degradazione. Questo approccio ha mostrato una potenziale azione pro-apoptotica nelle linee di cellule di leucemia (105).

A differenza delle molecole PROTAC, gli HyTag non dipendono dalla formazione di complessi ternari o dalla presenza di ligasi E3 specifiche, rendendolo un'opzione promettente quando le ligasi presentano mutazioni o hanno un'espressione limitata.

Inoltre, essi non presentano *hook effect*, come invece accade con l'approccio terapeutico PROTAC.

All'interno della cellula, la degradazione delle proteine può essere effettuata anche tramite la via lisosomiale. I lisosomi mediano la degradazione intracellulare in tre diversi modi: endocitosi, fagocitosi o autofagia (106). Recentemente sono stati sviluppati alcuni composti in grado di legare il sistema dell'autofagosoma (ATTEC: *Autophagy-Tethering Compounds*) per degradare NAMPT intracellulare. Uno fra questi è stato progettato utilizzando un linker legante, rispettivamente, un ligando per la POI e un ligando per LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), una proteina chiave dell'autofagia. Il legame con LC3 facilita l'inglobamento della POI nell'autofagosoma, portando la proteina alla degradazione (107).

Infine, per la degradazione proteica possono essere utilizzate anche le colle molecolari. Questi sistemi fungono da mediatori nel coordinare le interazioni proteina-proteina, in particolare quando la proteina coinvolta è una ligasi E3. In presenza di una ligasi E3, la colla molecolare induce un'interazione selettiva tra il recettore del substrato della ligasi E3 e la proteina target, portandola all'ubiquitinazione e alla successiva degradazione (108).

Neutralizzazione di eNAMPT

Il principale approccio terapeutico per bersagliare NAMPT extracellulare è l'utilizzo di anticorpi monoclonali.

L'anticorpo contro eNAMPT ad oggi più sviluppato è ALT-100, un anticorpo monoclonale umanizzato che ha dimostrato una notevole efficacia nella riduzione di diverse patologie polmonari, come ad esempio la fibrosi polmonare infiammatoria in modelli murini e suini (109, 110).

ALT-100 ha dimostrato inoltre ridurre la proliferazione e l'invasione delle cellule di cancro alla prostata(111).

ALT-100 ha completato il primo studio clinico di fase 1 effettuato su individui sani per valutare i parametri fondamentali come sicurezza, tollerabilità, farmacocinetica e farmacodinamica. Un secondo studio di fase 2 sta valutando gli effetti del farmaco su pazienti affetti dalla sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) (112).

Un altro anticorpo utilizzato per bersagliare eNAMPT è l'anticorpo C269.

In cellule tumorali di carcinoma mammario murino triplo negativo la neutralizzazione di eNAMPT con C269 ha portato a una diminuzione delle dimensioni del tumore e a un numero ridotto di metastasi polmonari. Il sequenziamento dell'RNA e i saggi funzionali hanno mostrato che eNAMPT controlla la risposta dei linfociti T tramite l'asse PD-L1/PD-1, infatti la sua neutralizzazione ha portato a un ripristino delle risposte immunitarie antitumorali.

In particolare, la neutralizzazione di eNAMPT è stata in grado di riattivare i linfociti T CD8+IFN γ +GrzB+, riducendo il fenotipo immunosoppressivo delle cellule T regolatorie (113).

Nonostante i risultati promettenti ottenuti da diversi studi preclinici, rimangono ancora alcune criticità da approfondire, come i recettori responsabili dell'attività biologica di eNAMPT non ancora pienamente caratterizzati e il rischio di effetti off-target indesiderati data la natura pleiotropica della proteina.

2. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di caratterizzare l'efficacia di nuovi degradatori chiamati PROTAC, molecole eterobifunzionali in grado di portare alla degradazione la proteina di interesse, in questo caso NAMPT, grazie al complesso ubiquitina-proteosoma, in cellule di carcinoma mammario e carcinoma ovarico.

In modo particolare, in questo lavoro ci siamo focalizzati sul composto più promettente, chiamato U42, selezionato tra la serie di 42 PROTAC sintetizzati dal gruppo di chimica farmaceutica del nostro dipartimento, in collaborazione con il laboratorio presso cui ho svolto il mio tirocinio.

Abbiamo studiato l'effetto terapeutico del PROTAC U42 valutando la sua capacità di degradazione di iNAMPT, la modulazione dei livelli di eNAMPT e la sua citotossicità.

I dati preliminari, ottenuti sul carcinoma mammario in cui mi sono inserita per validare alcuni aspetti, ci hanno consentito di iniziare ad indagare gli effetti farmacologici di U42 anche nel modello di carcinoma ovarico.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Le limitazioni riscontrate con gli inibitori convenzionali di NAMPT hanno reso evidente la necessità di sviluppare nuovi approcci terapeutici alternativi, tra cui i degradatori proteici.

I PROTAC consentono la degradazione selettiva delle proteine attraverso il sistema ubiquitina-proteosoma (UPS). Per essere attivo il PROTAC deve formare un complesso ternario tra la proteina d'interesse (POI) e il ligando per la ligasi E3.

In questo studio è stata sintetizzata una nuova serie di 42 molecole PROTAC, e successivamente selezionate quelle più promettenti per la degradazione della proteina multifunzionale NAMPT.

Le molecole sono state sintetizzate dal gruppo di chimica farmaceutica presso il nostro dipartimento, seguito dalla Prof.ssa Ubaldina Galli e dalla Prof.ssa Tracey Pirali.

Per la sintesi di queste nuove molecole è stato selezionato come *warhead* di partenza l'MV78 (**7**), con la funzione di legare la proteina d'interesse nel suo sito attivo. MV78 mostra, infatti, una buona potenza inibitoria e una buona stabilità metabolica *in vitro* e *in vivo*.

Per quanto riguarda il reclutamento della ligasi E3, fondamentale per il legame con il sistema di ubiquitinazione, lo studio si è concentrato sulle due ligasi maggiormente caratterizzate nella degradazione proteica: VHL (Von Hippel-Lindau) e CRBN (Cereblon). Sono stata progettate serie distinte di PROTAC contenenti ligandi specifici per entrambe le ligasi: la lenalidomide (**9**) per il reclutamento di CRBN e un ligando specifico contenente idrossiprolina per VHL (**10**).

Inoltre, è stata valutata una gamma di diversi linker di diverse lunghezze e caratteristiche per poter ottimizzare le proprietà fisico-chimiche e farmacocinetiche.

La prima serie di PROTAC è stata disegnata utilizzando linker a base di alcani o con polietilenglicole (PEG), incorporando nella catena un anello triazolico, noto per la resistenza ad alcune reazioni chimiche come idrolisi e ossidazione. Successivamente sono stati poi anche sviluppati PROTAC privi di anello triazolico (**Figura 1A**).

Tutti i composti sono stati testati su cellule umane di carcinoma mammario MCF7, con saggi di vitalità cellulare per indagarne la citotossicità, mentre la degradazione di NAMPT è stata valutata mediante analisi proteiche Western Blot.

Sono stati sintetizzati, testati e sottoposti a screening complessivamente 41 PROTAC. In particolare, tra le molecole senza il gruppo triazolico nel linker, i composti U23 e U31 sono emersi come i migliori in citotossicità e degradazione di NAMPT.

I composti migliori sono stati usati con trattamenti dose-risposta su cellule MCF7 e su cellule 4T1, una linea cellulare murina di carcinoma mammario triplo negativo. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti da 30 nM a 3 µM. Entrambi i composti hanno mostrato *hook*

effect per le concentrazioni superiori a 1 μM , ovvero un fenomeno per cui, ad alte concentrazioni, la molecola PROTAC è in eccesso e non è più in grado di legare contemporaneamente la POI e la ligasi E3, impedendo la formazione del complesso ternario e la degradazione attraverso la via proteosomica.

Per quanto riguarda le concentrazioni inferiori a 1 μM , i valori di DC_{50} sono risultati più bassi nelle cellule MCF7, con valori di 171 nM per U23 e 107 nM per U31, mentre sono risultati maggiori nelle cellule 4T1, con 500 nM e 350 nM, rispettivamente per U23 e U31 (**Figura 1B**). La DC_{50} è una misura fondamentale per indicare la concentrazione di un composto necessaria a degradare il 50% della proteina bersaglio, in questo caso la NAMPT, parametro chiave per valutare la potenza dei composti nella degradazione mirata delle proteine.

Essendo NAMPT l'enzima limitante nella via di salvataggio del NAD^+ , i PROTAC hanno mostrato essere anche dei buoni citotossici portando a morte cellulare. Come mostrato in **Figura 1B**, i valori dell' IC_{50} nelle cellule MCF7 sono stati rispettivamente di $1,03 \pm 0,06 \mu\text{M}$ e di $550 \pm 0,04 \text{ nM}$, per U23 e U31, mentre nelle 4T1 di $1,5 \pm 0,94 \mu\text{M}$ e $687 \pm 0,03 \text{ nM}$. La potenza dei PROTAC è risultata essere inferiore rispetto all'inibitore **7**, risultato atteso in quanto i degradatori hanno un peso molecolare alto paragonati agli inibitori classici, quindi minor permeabilità cellulare e maggiore difficoltà a raggiungere il sito catalitico di NAMPT. L' IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50*) è invece usata come parametro per indicare la concentrazione di una sostanza necessaria per ridurre del 50% un'attività biologica misurata.

Questi risultati evidenziano quindi come U31 sia il miglior PROTAC sia in termini di degradazione che di citotossicità.

Essendo i PROTAC dei degradatori abbiamo provato il loro meccanismo d'azione trattando le cellule MCF7 e 4T1 con l'inibitore del proteosoma, bortezomib, alla concentrazione di 300 nM. I dati mostrati in **Figura 1C** hanno dimostrato come il meccanismo mediato da U31 sia ubiquitina-proteasoma dipendente in quanto la degradazione non avviene più in presenza di bortezomib.

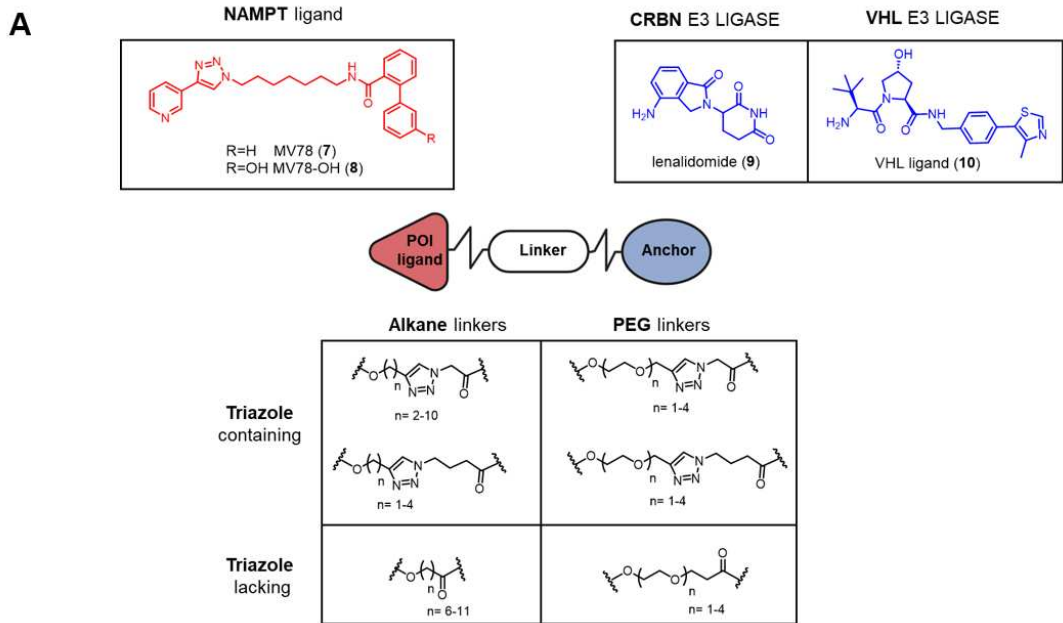
Il nostro miglior PROTAC, U31, è stato successivamente modificato chimicamente al fine di migliorarne ancora le sue proprietà.

Questo processo di ottimizzazione è stato ispirato da studi in letteratura che spiegano come l'introduzione stereoselettiva di un gruppo metile in posizione benzilica del ligando per VHL possa aumentare in modo significativo l'affinità per la ligasi E3 (114).

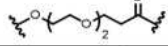
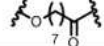
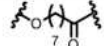
Alla luce di queste evidenze, è stato sviluppato il composto U42, un PROTAC ottimizzato capace di promuovere efficacemente la degradazione di NAMPT attraverso il sistema ubiquitina–proteasoma.

Per testare U42 è stato eseguito un trattamento dose-risposta alle stesse concentrazioni utilizzate precedentemente per gli altri due composti, i cui risultati hanno confermato l'aumento di efficienza di degradazione (DC_{50}) nel range in media di 50 nM per entrambe le linee cellulari. U42 si è inoltre mostrato indurre una citotossicità maggiore in entrambe le linee cellulari con un IC_{50} di $110 \pm 0,01$ nM nelle MCF7 e $157 \pm 0,04$ nM nelle 4T1 (**Figura 1B**).

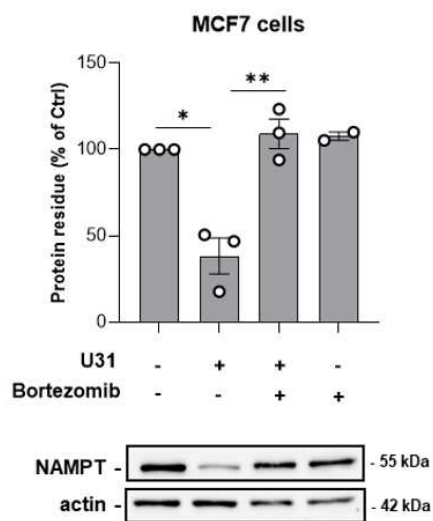
I dati ottenuti suggeriscono come i linker contenenti triazolo possano compromettere la degradazione di NAMPT, infatti, i migliori PROTAC selezionati non presentano l'anello triazolico nel linker. Sulla base di queste osservazioni, è stato ipotizzato che il triazolo possa conferire rigidità alla molecola e limitare la formazione del complesso ternario.



B

Cpd	E3 ligase Ligand	Linker	IC ₅₀ MCF7	IC ₅₀ 4T1	DC ₅₀ MCF7	D ₅₀ 4T1
7			7.0 ± 0.02 nM	9.6 ± 0.03 nM	n.d.	n.d.
U23	10		1.03 ± 0.06 μM	1.5 ± 0.94 μM	171 nM	500 nM
U31	10		550 ± 0.04 nM	687 ± 0.03 nM	107 nM	350 nM
U42	10		110 ± 0.01 nM	157 ± 0.04 nM	45 nM	55 nM

C



D

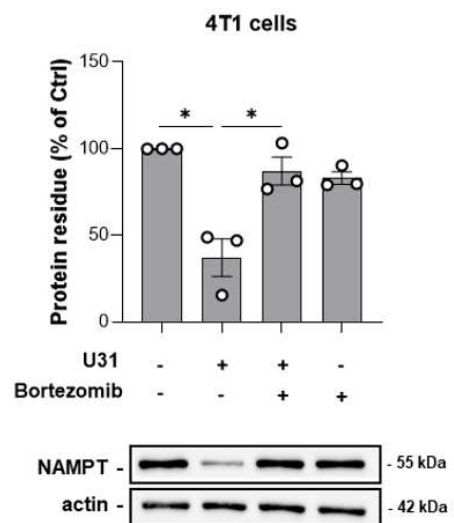


Figura 1 (A) Strategia di progettazione per PROTAC anti-NAMPT basati su MV78 come ligando per la POI e ligandi per E3 ligasi VHL o CRBN. (B) Screening farmacologico basato su vitalità cellulare (valutata mediante saggio MTT) e degradazione di NAMPT (valutata mediante analisi Western blot), eseguito dopo trattamenti con i composti 7, U23, U31 e U42 a concentrazioni crescenti comprese tra 30 nM e 3 μ M. Immagine rappresentativa e quantificazione di NAMPT nelle cellule MCF7 (C) e nelle 4T1 (D) trattate per 18 ore, rispettivamente, con U31 (300 nM), bortezomib (300 nM) o con la combinazione di entrambi i composti. Media \pm SEM di 3 esperimenti indipendenti. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ mediante test t parametrico non accoppiato.

Lo studio si è concentrato poi sulla valutazione della degradazione della NAMPT extracellulare. Come già descritto in precedenza, la NAMPT, oltre che essere un enzima citosolico, può anche essere rilasciato all'esterno della cellula e legarsi a un recettore di membrana per esercitare i suoi effetti di citochina. Diversamente da iNAMPT, per eNAMPT allo stesso intervallo di tempo di 18 ore, non è stata osservata degradazione, al contrario i livelli della proteina sembravano aumentare (dati non mostrati).

Per la valutazione della degradazione di eNAMPT con U42 è stato quindi applicato un protocollo già noto in letteratura utilizzato per testare degradatori basati su FK866. Gli autori dello studio hanno trattato le cellule per 24 ore e dopo un lavaggio sono state incubate in un terreno privo di siero per 24 ore con un secondo trattamento (115).

Basandosi su questo protocollo, le cellule sono state trattate a concentrazioni crescenti di U42 per 18 ore, lavate e trattate in un terreno privo di siero per ulteriori 24 ore (**Figura 2A-C**).

Si è osservata, oltre che a una degradazione di iNAMPT, una degradazione dose-dipendente di eNAMPT, con un DC_{50} di 50 nM. Questi risultati suggeriscono come probabilmente sia necessario un tempo di incubazione maggiore per osservare un esaurimento completo delle riserve di NAMPT.

Una possibile spiegazione delle tempistiche di degradazione potrebbe essere riferita alla presenza di un pool intracellulare di eNAMPT che si deve esaurire prima che si verifichi una riduzione effettiva di questa proteina nella frazione extracellulare. Diversamente, l'aumento transitorio che si osserva dopo le prime 18 ore di trattamento potrebbe essere la conseguenza della secrezione di NAMPT come effetto compensatorio, oppure potrebbe essere indotta da stress cellulare causato dall'esaurimento di eNAMPT.

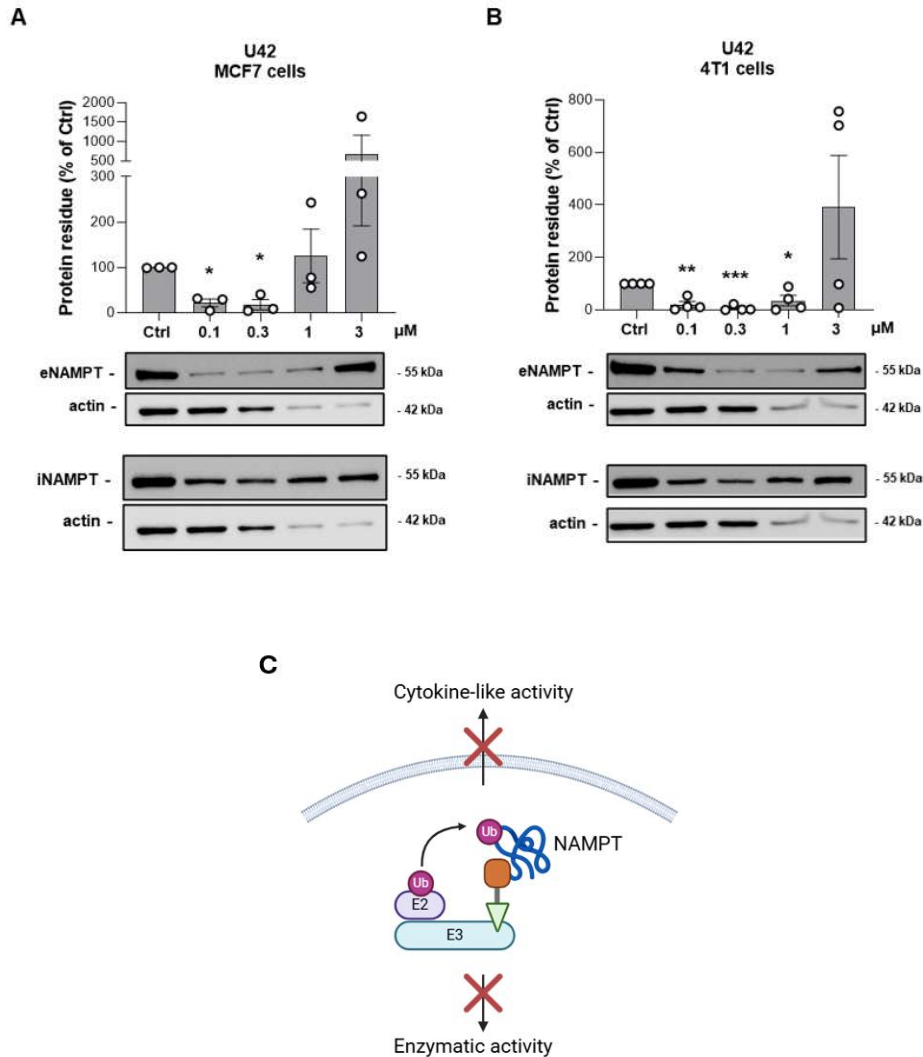


Figura 2 Immagine rappresentativa e quantificazione della degradazione di iNAMPT sia in cellule MCF7 (A) che 4T1 (B) trattate per 18 ore in terreno completo e successivamente trattate per alter 24 ore in terreno privo di siero, con una curva dose-risposta di U42. Media \pm SEM di 4 esperimenti indipendenti.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ tramite test t parametrico non accoppiato. (C) Schema illustrativo dell'inibizione di NAMPT intracellulare ed extracellulare.

Alla luce dei risultati incoraggianti ottenuti in modelli di carcinoma mammario, lo studio è stato esteso a modelli di carcinoma ovarico, al fine di valutare se la capacità di degradazione di U42 potesse portare a effetti simili a quelli osservati nelle linee cellulari precedentemente studiate.

Come nella maggior parte dei tessuti tumorali, NAMPT è overespressa nel tessuto ed è associata ad un fenotipo più aggressivo. Nel carcinoma ovarico, l'ascite può svilupparsi quando la disseminazione tumorale alla superficie peritoneale altera i normali meccanismi di regolazione

degli scambi di liquidi e soluti, determinando un accumulo patologico di fluido nella cavità addominale.

Tra i fattori solubili presenti nel liquido ascitico, la eNAMPT è risultata aumentata nelle pazienti affette da carcinoma ovarico ($75,3 \pm 28,1$ ng/mL), con livelli superiori rispetto ai corrispondenti valori sierici ($58,12 \pm 33,9$ ng/mL), suggerendo un'associazione con la disseminazione intraperitoneale della neoplasia ovarica (116).

Inoltre, concentrazioni più elevate di eNAMPT nell'ascite sono risultate correlate alla presenza di metastasi intraperitoneali.

Per iniziare a validare il PROTAC U42 in modelli di carcinoma ovarico abbiamo inizialmente esplorato i livelli basali di NAMPT in una linea di origine murina (ID8) e umana (CAOV e SKOV).

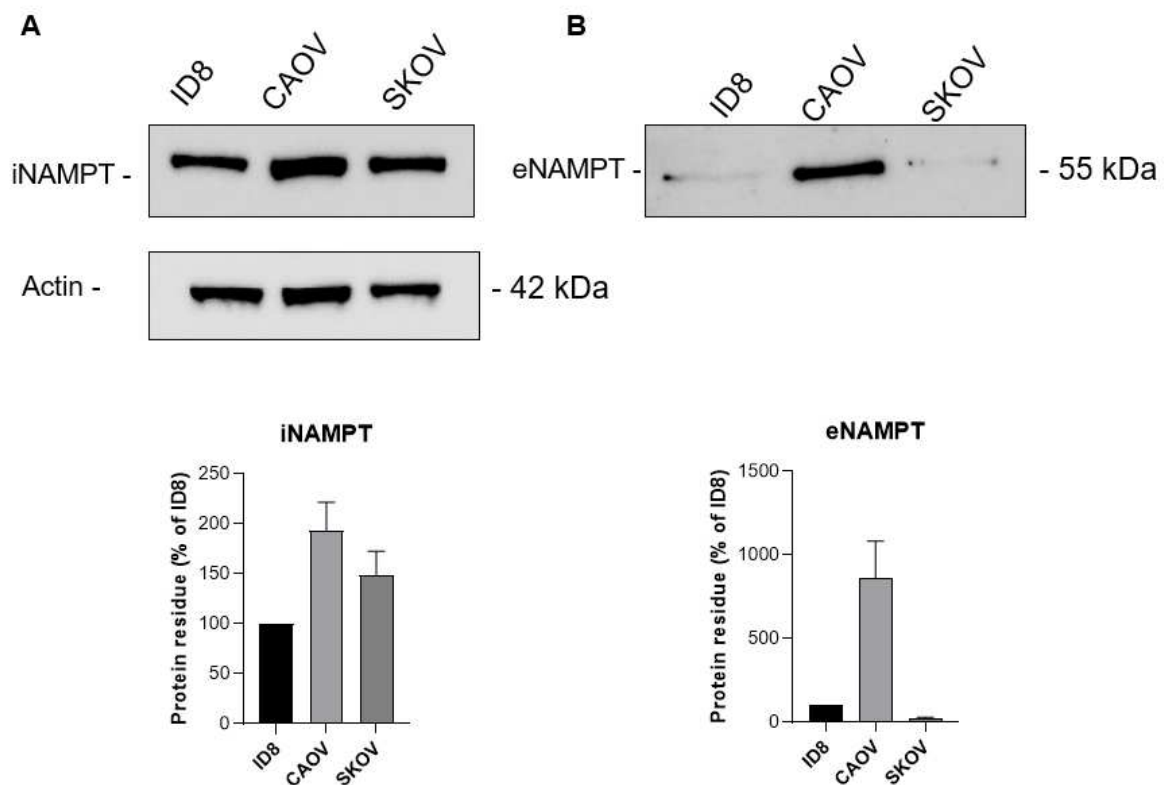


Figura 3 Immagine rappresentativa e quantificazioni dell'espressione di iNAMPT (A) e del rilascio di eNAMPT (B) su cellule ID8, CAOV e SKOV. Media \pm SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti.

Come si può notare dai grafici tutte le linee cellulari utilizzate hanno presentato un'alta espressione di NAMPT. In particolare, nelle cellule CAO V sono stati riscontrati livelli maggiori sia di iNAMPT che di eNAMPT (**Figura 3A e B**).

Parallelamente a questo esperimento, è stata valutata la citotossicità di U42 su ciascuna linea cellulare. Le cellule sono state trattate a concentrazioni crescenti di farmaco comprese tra 30 nM e 1 μ M. La vitalità è stata misurata con un saggio MTT a 72 ore dal trattamento su cellule ID8, CAO V e SKOV (**Figura 4**).

Come evidenziato dal grafico (**Figura 4A**), le cellule ID8 sono risultate le più sensibili al trattamento con U42, al contrario le linee umane non mostrano nessuna modulazione di vitalità cellulare in seguito ai trattamenti con il PROTAC.

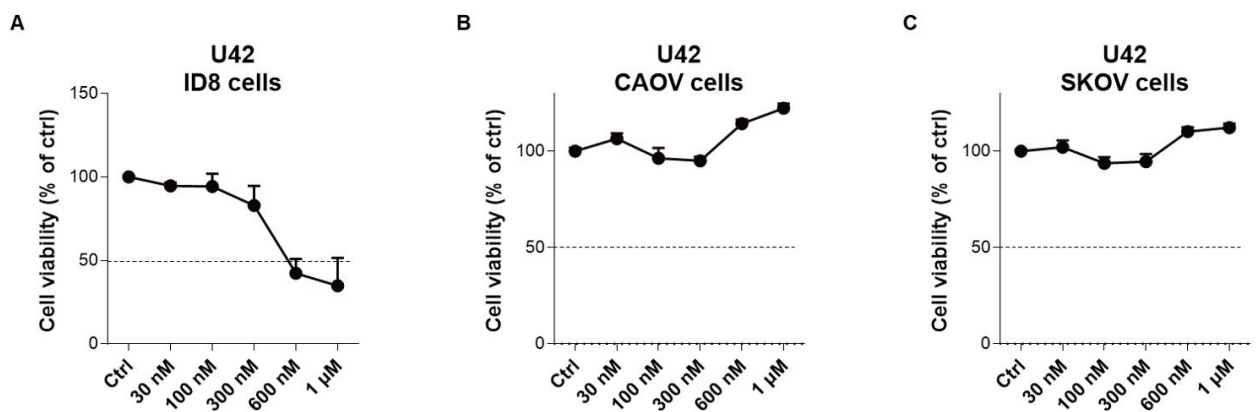


Figura 4 Vitalità cellulare valutata dopo 72 ore sulle cellule ID8 (A), CAO V (B) e SKOV (C) trattate con una curva di concentrazioni crescenti di U42. Media \pm SEM di almeno 1 esperimento indipendente.

Considerato il ruolo limitante di NAMPT nel metabolismo del NAD^+ , abbiamo poi verificato se le ID8 fossero sensibili anche ai classici inibitori, FK866 e l'inibitore MV78 (7) usato come *warhead* per la sintesi del PROTAC U42. Avendo già dimostrato la sensibilità delle ID8 al PROTAC, come atteso, le ID8 si sono mostrate sensibili anche ai due inibitori NAMPT, confermando ancora una volta l'importanza di targettare questo enzima in queste cellule (**Figura 5**). Come dimostrato precedentemente nel modello di carcinoma mammario, U42 è meno potente paragonato agli inibitori anche sulle linee ID8. Interessante sarà andare a verificare se le linee umane, CAO V e SKOV, siano insensibili anche agli inibitori NAMPT e giustificare l'assenza di citotossicità con l'U42 con la possibilità che siano dipendenti da un'altra via di biosintesi del NAD^+ .

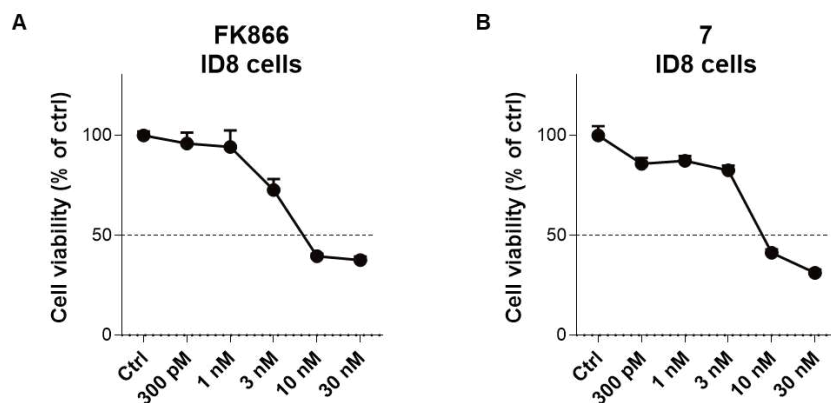


Figura 5 Vitalità cellulare valutata dopo 72 ore sulle cellule ID8 trattate con una curva di dosaggio di FK866 (A) e di 7 (B). Media \pm SEM di almeno 1 esperimento indipendente.

Infine, sono stati eseguiti trattamenti dose-risposta con U42 su tutte le linee, al fine di valutare la degradazione di iNAMPT. Le cellule sono state piastrate e poi trattate per la durata di 18 ore a concentrazioni comprese tra 30 nM e 1 μ M.

Attraverso le analisi Western Blot è emerso che le cellule ID8 (**Figura 6A**) sono quelle più sensibili alla degradazione con U42, come evidenziato dai grafici e come atteso dai dati ottenuti sulla citotossicità. In particolare, la degradazione è maggiormente marcata alle concentrazioni di 100 e 300 nM, mentre a concentrazioni più elevate si osserva un evidente *hook effect* (**Figura 6D**). Nelle cellule CAOv e SKOV la degradazione di NAMPT ha un effetto minimo o quasi nullo, suggerendo invece che il meccanismo d'azione di U42 non è adatto a queste linee cellulari, magari dipendenti da una ligasi diversa da VHL per la degradazione proteica (**Figura 6 A e B**).

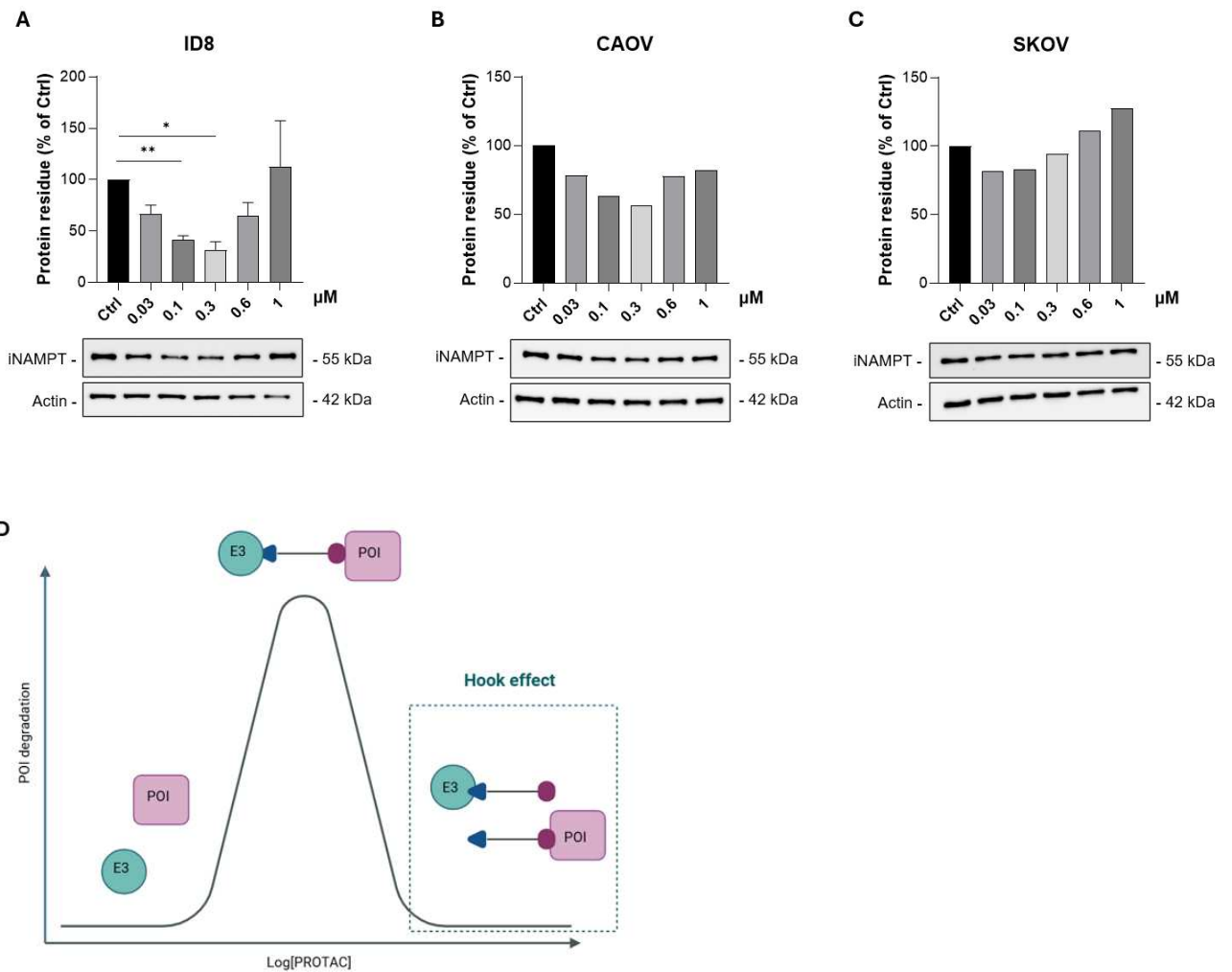


Figura 6 Immagine rappresentativa e quantificazione della degradazione di iNAMPT sulle cellule ID8 (A), CAOV (B) e SKOV (C) trattate per 24 ore con U42. Media \pm SEM di almeno 1 esperimento indipendente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (D) Meccanismo *hook effect*.

Dopo aver preso in esame la degradazione di iNAMPT sulle ID8, parallelamente a quanto effettuato per le cellule di carcinoma mammario, abbiamo valutato se anche eNAMPT venisse modulata dal trattamento con U42. Le cellule sono state trattate con lo stesso protocollo sperimentale descritto precedentemente, quindi trattate con U42 per 18 ore in medium completo e risospese in terreno privo di siero per altre 24 ore.

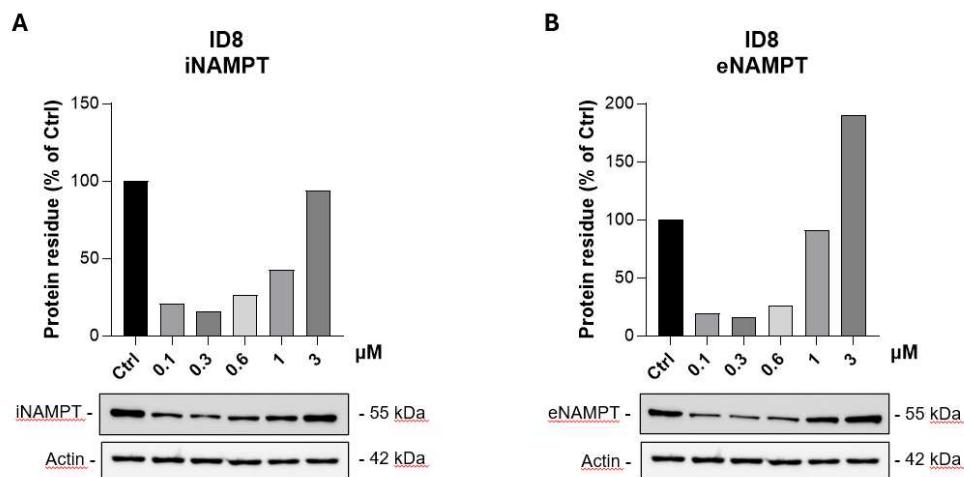


Figura 7 Immagine rappresentativa e quantificazione della degradazione di iNAMPT (A) e eNAMPT (B) trattate per 18 ore in terreno completo e successivamente trattate per 24 ore in terreno prive di siero, con una curva di dosaggio crescente di U42. Media \pm SEM di almeno 1 esperimento indipendente.

Come mostrato in **Figura 7**, le ID8 trattate con il PROTAC U42 mostrano una degradazione di iNAMPT con una DC_{50} inferiore a 100 nM e una modulazione negli stessi range di concentrazione anche per eNAMPT.

In conclusione, gli esperimenti condotti sulle linee di carcinoma ovarico, in particolare sulle cellule ID8, hanno confermato il PROTAC U42 come un promettente approccio terapeutico per fermare la progressione tumorale di carcinoma ovarico sieroso di alto grado *in vitro*. I risultati ottenuti si sono dimostrati in linea con la letteratura, dove diversi studi su linee di carcinoma ovarico hanno confermato la degradazione di NAMPT da parte di altre molecole PROTAC strutturalmente simili a U42, come ad esempio il PROTAC B3 in cellule di carcinoma ovarico A2780 (101).

4. CONCLUSIONI

Nel corso di questo progetto di tesi è stata caratterizzata l'attività del PROTAC U42 come degradatore di NAMPT. Inizialmente sono stati usati modelli di carcinoma mammario, e successivamente, lo studio si è spostato su modelli di carcinoma ovarico. NAMPT, infatti, è overespressa nella maggior parte dei tessuti tumorali e alti livelli di eNAMPT sono stati riscontrati in siero o plasma o ascite, nel caso del carcinoma ovarico, correlando ad una prognosi infausta.

In entrambi i contesti tumorali, U42 si è dimostrato essere un buon degradatore con un meccanismo proteasoma-dipendente.

I risultati ottenuti confermano quindi U42 come un degradatore di NAMPT potente e selettivo, rafforzando l'uso della tecnologia PROTAC come una valida strategia rispetto all'uso di inibitori classici. Uno tra i vantaggi dei degradatori è la possibilità di funzionalizzare queste molecole per ridurre gli effetti off-target riscontrati con l'inibizione. Nel caso di NAMPT, infatti, gli effetti collaterali del PROTAC sarebbero sovrapponibili a quelli già sperimentati con gli inibitori perché NAMPT è una proteina espressa a livello ubiquitario. Di grande interesse da parte del laboratorio sarà usare diverse strategie per funzionalizzare il nostro migliore PROTAC U42 per renderlo attivo solo in sede tumorale e degradare la NAMPT solo in questo contesto evitando così effetti *off-tumor*.

5. MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

Le cellule MCF7 (ATCC HTB-22) e 4T1cl5 sono state coltivate in terreno MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*; Sigma-Aldrich), completato con il 10% siero bovino fetale (FBS; Gibco), l'1% di glutammina (Sigma-Aldrich) e l'1% di penicillina/streptomicina (Sigma-Aldrich). Le cellule di linea ovarica ID8, CAOv e SKOV sono state coltivate in terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), completato allo stesso modo.

Tutte le cellule sono state mantenute a 37 °C e al 5% di CO₂.

WESTERN BLOT

Le cellule sono state seminate in piastre da 6 o 12 pozzetti, e dopo 24 ore trattate alle diverse concentrazioni dei composti utilizzati.

Per le linee di carcinoma mammario sono state piastrate $4,0 \times 10^5$ cellule MCF7 e 4T1, mentre per la linea di carcinoma ovarico $9,0 \times 10^4$ cellule ID8, CAOv e SKOV.

A seguito dei trattamenti, le cellule sono state lisate in buffer di lisi RIPA (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet-P40) completato con inibitori delle proteasi (PMSF 100nM, Sigma-Aldrich; PIC, Merck-Millipore) e inibitori delle fosfatasi (NaF 1M, Na₃VO₄ 1M, Sigma-Aldrich). I lisati sono stati centrifugati a 13.000 rpm per 15 minuti a 4 °C, e la concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il saggio proteico Bradford (Sigma-Aldrich).

Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE e trasferite su membrane di nitrocellulosa. Le membrane sono state inizialmente colorate con il colorante rosso Ponceau per quantificare i livelli di espressione delle proteine, quindi poi incubate con anticorpi primari mouse anti-NAMPT (AdipoGen; Cat. AG-20A-0034, RRID: AB_2490117) e mouse anti-Actina (Sigma-Aldrich; MAB1501), seguiti da incubazione con anticorpi secondari anti-mouse coniugati con HRP (Bio-Rad Laboratories).

Infine, i livelli proteici sono stati osservati tramite rilevazione chemiluminescente con soluzione ECL (Thermo Fisher Scientific).

SAGGIO MTT

Per eseguire i saggi di vitalità le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti, e il giorno successivo trattate con i diversi composti.

Sono state piastrate $4,0 \times 10^4$ cellule MCF7 e 4T1, mentre per la linea ovarica $5,0 \times 10^3$ cellule ID8 e $3,5 \times 10^4$ CAO V e SKOV.

Al termine delle 72 ore di trattamento, le cellule sono state lavate con PBS 1X e incubate con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro; Sigma-Aldrich) a una concentrazione di 250 $\mu\text{g/mL}$ in soluzione tampone Locke per 1 ora a 37 °C e al 5% di CO₂.

I cristalli di formazano sono stati solubilizzati aggiungendo isopropanolo-HCl 0,1 M e l'assorbanza ottica è stata letta a 570 nm in un lettore di piastre (Victor3 V, PerkinElmer Life Sciences).

ANALISI LIVELLI DI eNAMPT

Le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti e trattate il giorno successivo per 18 ore con una curva dose-dipendente di U42.

Le cellule MCF7 e 4T1 sono state piastrate a una concentrazione di $4,0 \times 10^5$ e di $2,0 \times 10^5$ per le ID8.

Dopo questo periodo, il terreno di coltura è stato rimosso, le cellule sono state lavate in PBS 1X e tenute in coltura in un terreno privo di siero. Dopo averle trattate nuovamente con U42, sono state mantenute in incubazione per altre 18 ore.

Il giorno successivo i terreni di coltura sono stati raccolti in *cut-off* e concentrati tramite centrifugazione a 8.000 rcf per 5 minuti a 4 °C. Questo passaggio è stato eseguito fino ad ottenere il volume di terreno desiderato.

I medium concentrati sono stati quindi caricati per SDS-PAGE, insieme ai rispettivi lisati.

Per la valutazione del rilascio di eNAMPT basale sulle cellule ID8, CAO V E SKOV sono state piastrate $6,0 \times 10^5$ cellule in piastre da 6 pozzetti. A distanza di 18 ore il terreno di coltura è stato rimosso, le cellule sono state lavate con PBS 1X e risospese in terreno privo di siero. Dopo 4 ore di incubazione il terreno è stato raccolto in filtri *cut-off* e concentrati seguendo lo stesso protocollo già citato, allo stesso modo è stata eseguita la lisi cellulare mediante buffer di lisi RIPA.

ANALISI STATISTICHE

Le rappresentazioni grafiche e le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism, con i dati presentati come media \pm SEM. Per confrontare i campioni delle colonne è stato applicato il test t non accoppiato, considerando un valore di $p < 0,05$ statisticamente significativo.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* 71, 209–249
2. Smolarz, B., Biernacka, K., Łukasiewicz, H., Samulak, D., Piekarska, E., Romanowicz, H., and Makowska, M. (2025) Ovarian Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Treatment, and Estrogen Receptors' Molecular Backgrounds. *Int. J. Mol. Sci.* 10.3390/ijms26104611
3. Webb, P. M., and Jordan, S. J. (2024) Global epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 21, 389–400
4. Barili, V., Ambrosini, E., Bortesi, B., Minari, R., De Sensi, E., Cannizzaro, I. R., Taiani, A., Michiara, M., Sikokis, A., Boggiani, D., Tommasi, C., Serra, O., Bonatti, F., Adorni, A., Luberto, A., Caggiati, P., Martorana, D., Uliana, V., Percesepe, A., Musolino, A., and Pellegrino, B. (2024) Genetic Basis of Breast and Ovarian Cancer: Approaches and Lessons Learnt from Three Decades of Inherited Predisposition Testing. *Genes (Basel).* 10.3390/genes15020219
5. Zhang, R., Siu, M. K. Y., Ngan, H. Y. S., and Chan, K. K. L. (2022) Molecular Biomarkers for the Early Detection of Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 10.3390/ijms231912041
6. Zhang, M., Cheng, S., Jin, Y., Zhao, Y., and Wang, Y. (2021) Roles of CA125 in diagnosis, prediction, and oncogenesis of ovarian cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 10.1016/j.bbcan.2021.188503
7. Wu, R., Baker, S. J., Hu, T. C., Norman, K. M., Fearon, E. R., and Cho, K. R. (2013) Type I to type II ovarian carcinoma progression: Mutant Trp53 or Pik3ca confers a more aggressive tumor phenotype in a mouse model of ovarian cancer. *American Journal of Pathology.* 182, 1391–1399
8. Kuroki, L., and Guntupalli, S. R. (2020) Treatment of epithelial ovarian cancer. *The BMJ.* 10.1136/bmj.m3773
9. Peng, A., Li, J., Xing, J., Yao, Y., Niu, X., and Zhang, K. (2024) The function of nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT) and its role in diseases. *Front. Mol. Biosci.* 10.3389/fmolb.2024.1480617
10. Grolla, A. A., Travelli, C., Genazzani, A. A., and Sethi, J. K. (2016) Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase, a new cancer metabokine. *Br. J. Pharmacol.* 10.1111/bph.13505

11. Fernandez-De-Cossio-DIaz, J., and Vazquez, A. (2018) A physical model of cell metabolism. *Sci. Rep.* 10.1038/s41598-018-26724-7
12. Mookerjee, S. A., Gerencser, A. A., Nicholls, D. G., and Brand, M. D. (2017) Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements. *Journal of Biological Chemistry.* 292, 7189–7207
13. Martínez-Reyes, I., and Chandel, N. S. (2021) Cancer metabolism: looking forward. *Nat. Rev. Cancer.* 21, 669–680
14. Yang, J., Shay, C., Saba, N. F., and Teng, Y. (2024) Cancer metabolism and carcinogenesis. *Exp. Hematol. Oncol.* 10.1186/s40164-024-00482-x
15. Navas, L. E., and Carnero, A. (2021) NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* 10.1038/s41392-020-00354-w
16. Chini, C. C. S., Cordeiro, H. S., Tran, N. L. K., and Chini, E. N. (2024) NAD metabolism: Role in senescence regulation and aging. *Aging Cell.* 10.1111/accel.13920
17. Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P. E., Zhou, X., Li, C., Shen, G., and Zou, B. (2020) NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct. Target. Ther.* 10.1038/s41392-020-00311-7
18. Rajman, L., Chwalek, K., and Sinclair, D. A. (2018) Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab.* 27, 529–547
19. Zhai, R. G., Rizzi, M., and Garavaglia, S. (2009) Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, new insights into an ancient enzyme. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 66, 2805–2818
20. Wang, T., Zhang, X., Bheda, P., Revollo, J. R., Imai, S. I., and Wolberger, C. (2006) Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD⁺ biosynthetic enzyme. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 661–662
21. Gardell, S. J., Hopf, M., Khan, A., Dispagna, M., Hampton Sessions, E., Falter, R., Kapoor, N., Brooks, J., Culver, J., Petucci, C., Ma, C. T., Cohen, S. E., Tanaka, J., Burgos, E. S., Hirschi, J. S., Smith, S. R., Sergienko, E., and Pinkerton, A. B. (2019) Boosting NAD⁺ with a small molecule that activates NAMPT. *Nat. Commun.* 10.1038/s41467-019-11078-z
22. Sun, X., Elangovan, V. R., Mapes, B., Camp, S. M., Sammani, S., Saadat, L., Ceco, E., Ma, S. F., Flores, C., MacDougall, M. S., Quijada, H., Liu, B., Kempf, C. L., Wang, T., Chiang, E. T., and Garcia, J. G. N. (2014) The NAMPT promoter is regulated by

- mechanical stress, signal transducer and activator of transcription 5, and acute respiratory distress syndrome-associated genetic variants. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51, 660–667
23. Chowdhry, S., Zanca, C., Rajkumar, U., Koga, T., Diao, Y., Raviram, R., Liu, F., Turner, K., Yang, H., Brunk, E., Bi, J., Furnari, F., Bafna, V., Ren, B., and Mischel, P. S. (2019) NAD metabolic dependency in cancer is shaped by gene amplification and enhancer remodelling. *Nature.* 569, 570–575
24. Svoboda, P., Krizova, E., Sestakova, S., Vapenkova, K., Knejzlik, Z., Rimpelova, S., Rayova, D., Volfova, N., Krizova, I., Rumlova, M., Sykora, D., Kizek, R., Haluzik, M., Zidek, V., Zidkova, J., and Skop, V. (2019) Nuclear transport of nicotinamide phosphoribosyltransferase is cell cycle– dependent in mammalian cells, and its inhibition slows cell growth. *Journal of Biological Chemistry.* 294, 8676–8689
25. Grolla, A. A., Miggiano, R., Marino, D. Di, Bianchi, M., Gori, A., Orsomando, G., Gaudino, F., Galli, U., Grosso, E. Del, Mazzola, F., Angeletti, C., Guarneri, M., Torretta, S., Calabrò, M., Boumya, S., Fan, X., Colombo, G., Travelli, C., Rocchio, F., Aronica, E., Wohlschlegel, J. A., Deaglio, S., Rizzi, M., Genazzani, A. A., and Garavaglia, S. (2020) A nicotinamide phosphoribosyltransferase–GAPDH interaction sustains the stress-induced NMN/NAD⁺ salvage pathway in the nucleus. *Journal of Biological Chemistry.* 295, 3635–3651
26. Lucena-Cacace, A., Otero-Albiol, D., Jiménez-García, M. P., Peinado-Serrano, J., and Carnero, A. (2017) *Oncotarget* 99514 www.impactjournals.com/oncotarget *NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor signature for glioma prognosis*
27. Dalamaga, M., Christodoulatos, G. S., and Mantzoros, C. S. (2018) The role of extracellular and intracellular Nicotinamide phosphoribosyl-transferase in cancer: Diagnostic and therapeutic perspectives and challenges. *Metabolism.* 82, 72–87
28. Oita, R. C., Camp, S. M., Ma, W., Ceco, E., Harbeck, M., Singleton, P., Messana, J., Sun, X., Wang, T., and Garcia, J. G. N. (2018) Novel mechanism for nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibition of TNF- α -mediated apoptosis in human lung endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 59, 36–44
29. Pylaeva, E., Harati, M. D., Spyra, I., Bordbari, S., Strachan, S., Thakur, B. K., Höing, B., Franklin, C., Skokowa, J., Welte, K., Schadendorf, D., Bankfalvi, A., Brandau, S., Lang, S., and Jablonska, J. (2019) NAMPT signaling is critical for the proangiogenic activity of tumor-associated neutrophils. *Int. J. Cancer.* 144, 136–149

30. Semerena, E., Nencioni, A., and Masternak, K. (2023) Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase: role in disease pathophysiology and as a biomarker. *Front. Immunol.* 10.3389/fimmu.2023.1268756
31. Samal, B., Sun, Y., Stearns, Chunshan Xie, G., Suggs, And, S., and Mcniece2, I. (1994) *Cloning and Characterization of the cDNA Encoding a Novel Human Pre-B-Cell Colony-Enhancing Factor*
32. Revollo, J. R., Grimm, A. A., and Imai, S.-I. (2007) *The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals*, Lippincott Williams & Wilkins
33. Schilling, E., and Hauschildt, S. (2012) Extracellular ATP induces P2X7-dependent nicotinamide phosphoribosyltransferase release in LPS-activated human monocytes. *Innate Immun.* 18, 738–744
34. Curat, C. A., Wegner, V., Sengenès, C., Miranville, A., Tonus, C., Busse, R., and Bouloumié, A. (2006) Macrophages in human visceral adipose tissue: Increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia.* 49, 744–747
35. Friebe, D., Neef, M., Kratzsch, J., Erbs, S., Dittrich, K., Garten, A., Petzold-Quinque, S., Blüher, S., Reinehr, T., Stumvoll, M., Blüher, M., Kiess, W., and Körner, A. (2011) Leucocytes are a major source of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)/pre-B cell colony (PBEF)/visfatin linking obesity and inflammation in humans. *Diabetologia.* 54, 1200–1211
36. Kang, Y. S., Bae, M. K., Kim, J. Y., Jeong, J. W., Yun, I., Jang, H. O., and Bae, S. K. (2011) Visfatin induces neurite outgrowth in PC12 cells via ERK1/2 signaling pathway. *Neurosci. Lett.* 504, 121–126
37. Jing, Z., Xing, J., Chen, X., Stetler, R. A., Weng, Z., Gan, Y., Zhang, F., Gao, Y., Chen, J., Leak, R. K., and Cao, G. (2014) Neuronal NAMPT is released after cerebral ischemia and protects against white matter injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 34, 1613–1621
38. Zhao, Y., Liu, X. Z., Tian, W. W., Guan, Y. F., Wang, P., and Miao, C. Y. (2014) Extracellular visfatin has nicotinamide phosphoribosyltransferase enzymatic activity and is neuroprotective against ischemic injury. *CNS Neurosci. Ther.* 20, 539–547
39. Carbone, F., Liberale, L., Bonaventura, A., Vecchié, A., Casula, M., Cea, M., Monacelli, F., Caffa, I., Bruzzone, S., Montecucco, F., and Nencioni, A. (2017) Regulation and

- function of extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin. *Compr. Physiol.* 7, 603–621
40. Colombo, G., Travelli, C., Porta, C., and Genazzani, A. A. (2022) Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase boosts IFN γ -induced macrophage polarization independently of TLR4. *iScience*. 10.1016/j.isci.2022.104147
 41. Yoon, M. J., Yoshida, M., Johnson, S., Takikawa, A., Usui, I., Tobe, K., Nakagawa, T., Yoshino, J., and Imai, S. ichiro (2015) SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD⁺ and Function in Mice. *Cell Metab.* 21, 706–717
 42. Sociali, G., Grozio, A., Caffa, I., Schuster, S., Becherini, P., Damonte, P., Sturla, L., Fresia, C., Passalacqua, M., Mazzola, F., Raffaelli, N., Garten, A., Kiess, W., Cea, M., Nencioni, A., and Bruzzone, S. (2019) SIRT6 deacetylase activity regulates NAMPT activity and NAD(P)(H) pools in cancer cells. *FASEB Journal.* 33, 3704–3717
 43. Yoshida, M., Satoh, A., Lin, J. B., Mills, K. F., Sasaki, Y., Rensing, N., Wong, M., Apte, R. S., and Imai, S. ichiro (2019) Extracellular Vesicle-Contained eNAMPT Delays Aging and Extends Lifespan in Mice. *Cell Metab.* 30, 329-342.e5
 44. Chong, M. C., Silva, A., James, P. F., Wu, S. S. X., and Howitt, J. (2022) Exercise increases the release of NAMPT in extracellular vesicles and alters NAD⁺ activity in recipient cells. *Aging Cell.* 10.1111/accel.13647
 45. Revollo, J. R., Körner, A., Mills, K. F., Satoh, A., Wang, T., Garten, A., Dasgupta, B., Sasaki, Y., Wolberger, C., Townsend, R. R., Milbrandt, J., Kiess, W., and Imai, S.-I. *Nampt/PBEF/visfatin regulates insulin secretion in β cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme*
 46. 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. *J. Mol. Biol.* 362, 66–77
 47. Sayers, S. R., Beavil, R. L., Fine, N. H. F., Huang, G. C., Choudhary, P., Pacholarz, K. J., Barran, P. E., Butterworth, S., Mills, C. E., Cruickshank, J. K., Silvestre, M. P., Poppitt, S. D., McGill, A. T., Lavery, G. G., Hodson, D. J., and Caton, P. W. (2020) Structure-functional changes in eNAMPT at high concentrations mediate mouse and human beta cell dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 63, 313–323

48. Hara, N., Yamada, K., Shibata, T., Osago, H., and Tsuchiya, M. (2011) Nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin does not catalyze nicotinamide mononucleotide formation in blood plasma. *PLoS One*. 10.1371/journal.pone.0022781
49. Behrouzfar, K., Alaei, M., Nourbakhsh, M., Gholinejad, Z., and Golestani, A. (2017) Extracellular NAMPT/visfatin causes p53 deacetylation via NAD production and SIRT1 activation in breast cancer cells. *Cell Biochem. Funct.* 35, 327–333
50. Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanabe, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kihara, S., Yamashita, S., Makishima, M., Funahashi, T., Yamanaka, S., Hiramatsu, R., Matsuzawa, Y., and Shimomura, I. (2005) Visfatin: A protein secreted by visceral fat that Mimics the effects of insulin. *Science (1979)*. 307, 426–430
51. Recinella, L., Orlando, G., Ferrante, C., Chiavaroli, A., Brunetti, L., and Leone, S. (2020) Adipokines: New Potential Therapeutic Target for Obesity and Metabolic, Rheumatic, and Cardiovascular Diseases. *Front. Physiol.* 10.3389/fphys.2020.578966
52. Xie, H., Tang, S. Y., Luo, X. H., Huang, J., Cui, R. R., Yuan, L. Q., Zhou, H. D., Wu, X. P., and Liao, E. Y. (2007) Insulin-like effects of visfatin on human osteoblasts. *Calcif. Tissue Int.* 80, 201–210
53. Song, H. K., Lee, M. H., Kim, B. K., Park, Y. G., Ko, G. J., Kang, Y. S., Han, J. Y., Han, S. Y., Han, K. H., Kim, H. K., and Cha, D. R. (2008) Visfatin: a new player in mesangial cell physiology and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295, 1485–1494
54. Harasim, E., Chabowski, A., and Górski, J. (2011) Lack of downstream insulin-mimetic effects of visfatin/eNAMPT on glucose and fatty acid metabolism in skeletal muscles. *Acta Physiologica.* 202, 21–28
55. Cheng, Q., Dong, W., Qian, L., Wu, J., and Peng, Y. (2011) Visfatin inhibits apoptosis of pancreatic β -cell line, MIN6, via the mitogen-activated protein kinase/phosphoinositide 3-kinase pathway. *J. Mol. Endocrinol.* 47, 13–21
56. Audrito, V., Serra, S., Brusa, D., Mazzola, F., Arruga, F., Vaisitti, T., Coscia, M., Maffei, R., Rossi, D., Wang, T., Inghirami, G., Rizzi, M., Gaidano, G., Garcia, J. G. N., Wolberger, C., Raffaelli, N., and Deaglio, S. (2015) Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. 10.1182/blood-2014-07
57. Skokowa, J., Lan, D., Thakur, B. K., Wang, F., Gupta, K., Cario, G., Brechlin, A. M., Schambach, A., Hinrichsen, L., Meyer, G., Gaestel, M., Stanulla, M., Tong, Q., and Welte, T. (2017) Visfatin promotes M2 macrophage polarization in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 31, 105–115

- K. (2009) NAMPT is essential for the G-CSF-induced myeloid differentiation via a NAD⁺-sirtuin-1-dependent pathway. *Nat. Med.* 15, 151–158
58. Travelli, C., Colombo, G., Mola, S., Genazzani, A. A., and Porta, C. (2018) NAMPT: A pleiotropic modulator of monocytes and macrophages. *Pharmacol. Res.* 135, 25–36
59. Grolla, A. A., Torretta, S., Gnemmi, I., Amoroso, A., Orsomando, G., Gatti, M., Caldarelli, A., Lim, D., Penengo, L., Brunelleschi, S., Genazzani, A. A., and Travelli, C. (2015) Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is a tumoural cytokine released from melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 28, 718–729
60. Li, Y., Zhang, Y., Dorweiler, B., Cui, D., Wang, T., Woo, C. W., Brunkan, C. S., Wolberger, C., Imai, S. I., and Tabas, I. (2008) Extracellular nampt promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *Journal of Biological Chemistry.* 283, 34833–34843
61. Moschen, A. R., Kaser, A., Enrich, B., Mosheimer, B., Theurl, M., Niederegger, H., and Tilg, H. (2007) Visfatin, an Adipocytokine with Proinflammatory and Immunomodulating Properties. *The Journal of Immunology.* 178, 1748–1758
62. Kim, S. R., Bae, Y. H., Bae, S. K., Choi, K. S., Yoon, K. H., Koo, T. H., Jang, H. O., Yun, I., Kim, K. W., Kwon, Y. G., Yoo, M. A., and Bae, M. K. (2008) Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF- κ B activation in endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1783, 886–895
63. Romacho, T., Valencia, I., Ramos-González, M., Vallejo, S., López-Esteban, M., Lorenzo, O., Cannata, P., Romero, A., San Hipólito-Luengo, A., Gómez-Cerezo, J. F., Peiró, C., and Sánchez-Ferrer, C. F. (2020) Visfatin/eNampt induces endothelial dysfunction in vivo: a role for Toll-Like Receptor 4 and NLRP3 inflammasome. *Sci. Rep.* 10.1038/s41598-020-62190-w
64. Kim, S. R., Bae, S. K., Choi, K. S., Park, S. Y., Jun, H. O., Lee, J. Y., Jang, H. O., Yun, I., Yoon, K. H., Kim, Y. J., Yoo, M. A., Kim, K. W., and Bae, M. K. (2007) Visfatin promotes angiogenesis by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 150–156
65. Xiao, J., Xiao, Z. J., Liu, Z. G., Gong, H. Y., Yuan, Q., Wang, S., Li, Y. J., and Jiang, D. J. (2009) Involvement of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 in visfatin-enhanced angiogenic function of endothelial cells. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 25, 242–249
66. Adya, R., Tan, B. K., Pun, A., Chen, J., and Rande, H. S. (2008) Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling

- pathways: Novel insights into visfatin-induced angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 78, 356–365
67. Dakroub, A., Nasser, S. A., Kobeissy, F., Yassine, H. M., Orekhov, A., Sharifi-Rad, J., Iratni, R., El-Yazbi, A. F., and Eid, A. H. (2021) Visfatin: An emerging adipocytokine bridging the gap in the evolution of cardiovascular diseases. *J. Cell. Physiol.* 236, 6282–6296
 68. Adya, R., Tan, B. K., Chen, J., and Randeve, H. S. (2008) Nuclear factor- κ b induction by visfatin in human vascular endothelial cells. *Diabetes Care.* 31, 758–760
 69. Ezzati-Mobaser, S., Malekpour-Dehkordi, Z., Nourbakhsh, M., Tavakoli-Yaraki, M., Ahmadpour, F., Golpour, P., and Nourbakhsh, M. (2020) The up-regulation of markers of adipose tissue fibrosis by visfatin in pre-adipocytes as well as obese children and adolescents. *Cytokine.* 10.1016/j.cyto.2020.155193
 70. Fan, Y., Meng, S., Wang, Y., Cao, J., and Wang, C. (2011) Visfatin/PBEF/Nampt induces EMMPRIN and MMP-9 production in macrophages via the NAMPT-MAPK (p38, ERK1/2)-NF- κ B signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* 27, 607–615
 71. Moro, M., Balestrero, F. C., Colombo, G., Torretta, S., Clemente, N., Ciccone, V., Del Grosso, E., Donnini, S., Travelli, C., Condorelli, F., Sangaletti, S., Genazzani, A. A., and Grolla, A. A. (2025) Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) drives abnormal pericyte-rich vasculature in triple-negative breast cancer. *Angiogenesis.* 10.1007/s10456-024-09956-2
 72. van den Bergh, R., Morin, S., Sass, H. J., Grzesiek, S., Vekemans, M., Florence, E., Tran, H. T. T., Imiru, R. G., Heyndrickx, L., Vanham, G., de Baetselier, P., and Raes, G. (2012) Monocytes contribute to differential immune pressure on R5 versus X4 HIV through the adipocytokine visfatin/nampt. *PLoS One.* 10.1371/journal.pone.0035074
 73. Torretta, S., Colombo, G., Travelli, C., Boumya, S., Lim, D., Genazzani, A. A., and Grolla, A. A. (2020) The Cytokine Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (eNAMPT; PBEF; Visfatin) Acts as a Natural Antagonist of C-C Chemokine Receptor Type 5 (CCR5). *Cells.* 10.3390/cells9020496
 74. Ratnayake, D., Nguyen, P. D., Rossello, F. J., Wimmer, V. C., Tan, J. L., Galvis, L. A., Julier, Z., Wood, A. J., Boudier, T., Isiaku, A. I., Berger, S., Oorschot, V., Sonntag, C., Rogers, K. L., Marcelle, C., Lieschke, G. J., Martino, M. M., Bakkers, J., and Currie, P. D. (2021) Macrophages provide a transient muscle stem cell niche via NAMPT secretion. *Nature.* 591, 281–287

75. Camp, S. M., Ceco, E., Evenoski, C. L., Danilov, S. M., Zhou, T., Chiang, E. T., Moreno-Vinasco, L., Mapes, B., Zhao, J., Gursoy, G., Brown, M. E., Adyshev, D. M., Siddiqui, S. S., Quijada, H., Sammani, S., Letsiou, E., Saadat, L., Yousef, M., Wang, T., Liang, J., and Garcia, J. G. N. (2015) Unique Toll-Like Receptor 4 Activation by NAMPT/PBEF Induces NFκ B Signaling and Inflammatory Lung Injury. *Sci. Rep.* 10.1038/srep13135
76. Managò, A., Audrito, V., Mazzola, F., Sorci, L., Gaudino, F., Gizzi, K., Vitale, N., Incarnato, D., Minazzato, G., Ianniello, A., Varriale, A., D'Auria, S., Mengozzi, G., Politano, G., Oliviero, S., Raffaelli, N., and Deaglio, S. (2019) Extracellular nicotinate phosphoribosyltransferase binds Toll like receptor 4 and mediates inflammation. *Nat. Commun.* 10.1038/s41467-019-12055-2
77. Romacho, T., Valencia, I., Ramos-González, M., Vallejo, S., López-Esteban, M., Lorenzo, O., Cannata, P., Romero, A., San Hipólito-Luengo, A., Gómez-Cerezo, J. F., Peiró, C., and Sánchez-Ferrer, C. F. (2020) Visfatin/eNampt induces endothelial dysfunction in vivo: a role for Toll-Like Receptor 4 and NLRP3 inflammasome. *Sci. Rep.* 10.1038/s41598-020-62190-w
78. Gasparri, M., Mazzola, F., Cuccioloni, M., Sorci, L., Audrito, V., Zamporlini, F., Fortunato, C., Amici, A., Cianci, M., Deaglio, S., Angeletti, M., and Raffaelli, N. (2022) Molecular insights into the interaction between human nicotinamide phosphoribosyltransferase and Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry.* 10.1016/j.jbc.2022.101669
79. Kim, J. S., Kim, H. K., Kim, M., Jang, S., Cho, E., Mun, S. J., Lee, J., Hong, D., Yoon, S., and Yang, C. S. (2022) Colon-Targeted eNAMPT-Specific Peptide Systems for Treatment of DSS-Induced Acute and Chronic Colitis in Mouse. *Antioxidants.* 10.3390/antiox11122376
80. Assiri, A. M. A., Kamel, H. F. M., and Hassanien, M. F. R. (2015) Resistin, visfatin, adiponectin, and leptin: Risk of breast cancer in pre- and postmenopausal saudi females and their possible diagnostic and predictive implications as novel biomarkers. *Dis. Markers.* 10.1155/2015/253519
81. Dalamaga, M., Archondakis, S., Sotiropoulos, G., Karmaniolas, K., Pelekanos, N., Papadavid, E., and Lekka, A. (2012) Could serum visfatin be a potential biomarker for postmenopausal breast cancer? *Maturitas.* 71, 301–308
82. Ghanem, M. S., Monacelli, F., and Nencioni, A. (2021) Advances in nad-lowering agents for cancer treatment. *Nutrients.* 10.3390/nu13051665

83. Wosikowski, K., Mattern, K., Schemainda, I., Hasmann, M., Rattel, B., and Löser, R. (2002) *WK175, a Novel Antitumor Agent, Decreases the Intracellular Nicotinamide Adenine Dinucleotide Concentration and Induces the Apoptotic Cascade in Human Leukemia Cells*
84. 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*
85. 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 799–804
86. Binderup, E., Björkling, F., Hjarnaa, P. V., Latini, S., Baltzer, B., Carlsen, M., and Binderup, L. (2005) EB1627: A soluble prodrug of the potent anticancer cyanoguanidine CHS828. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 2491–2494
87. 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. *Invest. New Drugs.* 26, 45–51
88. Von Heideman, A., Berglund, Å., Larsson, R., Nygren, P., and Larsson, R. (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 Chemother. Pharmacol.* 65, 1165–1172
89. Kraus, D., Reckenbeil, J., Veit, N., Kuerpig, S., Meisenheimer, M., Beier, I., Stark, H., Winter, J., and Probstmeier, R. (2018) Targeting glucose transport and the NAD pathway in tumor cells with STF-31: a re-evaluation. *Cellular Oncology.* 41, 485–494
90. Cordover, E., Wei, J., Patel, C., Shan, N. L., Gionco, J., Sargsyan, D., Wu, R., Cai, L., Kong, A. N., Jacinto, E., and Minden, A. (2020) KPT-9274, an Inhibitor of PAK4 and NAMPT, Leads to Downregulation of mTORC2 in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 33, 482–491
91. Kudo, K., Greer, Y. E., Yoshida, T., Harrington, B. S., Korrapati, S., Shibuya, Y., Henegar, L., Kopp, J. B., Fujii, T., Lipkowitz, S., and Annunziata, C. M. (2024) Dual-inhibition of NAMPT and PAK4 induces anti-tumor effects in 3D-spheroids model of platinum-resistant ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* 31, 721–735
92. Majumder, P., and Baumeister, W. (2020) Proteasomes: unfoldase-assisted protein degradation machines. *Biol. Chem.* 401, 183–199

93. Zhao, L., Zhao, J., Zhong, K., Tong, A., and Jia, D. (2022) Targeted protein degradation: mechanisms, strategies and application. *Signal Transduct. Target. Ther.* 10.1038/s41392-022-00966-4
94. Fan, G., Chen, S., Zhang, Q., Yu, N., Shen, Z., Liu, Z., Guo, W., Tang, Z., Yang, J., and Liu, M. (2025) Proteolysis-Targeting Chimera (PROTAC): Current Applications and Future Directions. *MedComm (Beijing)*. 10.1002/mco2.70401
95. Vorderbruggen, M., Velázquez-Martínez, C. A., Natarajan, A., and Karpf, A. R. (2024) PROTACs in Ovarian Cancer: Current Advancements and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 10.3390/ijms25105067
96. Lata, S., Mishra, R., and Banerjee, A. C. (2018) Proteasomal degradation machinery: Favorite target of HIV-1 proteins. *Front. Microbiol.* 10.3389/fmicb.2018.02738
97. Sakamoto, K. M., Kim, K. B., Verma, R., Ransick, A., Stein, B., Crews, C. M., and Deshaies, R. J. (2003) Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Proteomics.* 2, 1350–1358
98. Snyder, L. B., Neklesa, T. K., Willard, R. R., Gordon, D. A., Pizzano, J., Vitale, N., Robling, K., Dorso, M. A., Moghrabi, W., Landrette, S., Gedrich, R., Lee, S. H., Taylor, I. C. A., and Houston, J. G. (2025) Preclinical Evaluation of Bavdegalutamide (ARV-110), a Novel PROteolysis TARgeting Chimera Androgen Receptor Degradar. *Mol. Cancer Ther.* 24, 511–522
99. Campone, M., De Laurentiis, M., Jhaveri, K., Hu, X., Ladoire, S., Patsouris, A., Zamagni, C., Cui, J., Cazzaniga, M., Cil, T., Jerzak, K. J., Fuentes, C., Yoshinami, T., Rodriguez-Lescure, A., Sezer, A., Fontana, A., Guarneri, V., Molckovsky, A., Mouret-Reynier, M.-A., Demirci, U., Zhang, Y., Valota, O., Lu, D. R., Martignoni, M., Parameswaran, J., Zhi, X., and Hamilton, E. P. (2025) Vepdegestrant, a PROTAC Estrogen Receptor Degradar, in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine.* 393, 556–568
100. Wu, Y., Pu, C., Fu, Y., Dong, G., Huang, M., and Sheng, C. (2022) NAMPT-targeting PROTAC promotes antitumor immunity via suppressing myeloid-derived suppressor cell expansion. *Acta Pharm. Sin. B.* 12, 2859–2868
101. Bi, K., Cheng, J., He, S., Fang, Y., Huang, M., Sheng, C., and Dong, G. (2023) Discovery of Highly Potent Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Degradarers for Efficient Treatment of Ovarian Cancer. *J. Med. Chem.* 66, 1048–1062

102. Cheng, J., Zhang, J., He, S., Li, M., Dong, G., and Sheng, C. (2024) Photoswitchable PROTACs for Reversible and Spatiotemporal Regulation of NAMPT and NAD⁺. *Angewandte Chemie - International Edition*. 10.1002/anie.202315997
103. Zhang, P., Wang, W., Guo, M., Zhou, L., Dong, G., Xu, D., and Sheng, C. (2023) Discovery of potent NAMPT-Targeting PROTACs using FK866 as the warhead. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10.1016/j.bmcl.2023.129393
104. Moreau, K., Coen, M., Zhang, A. X., Pachl, F., Castaldi, M. P., Dahl, G., Boyd, H., Scott, C., and Newham, P. (2020) Proteolysis-targeting chimeras in drug development: A safety perspective. *Br. J. Pharmacol.* 177, 1709–1718
105. Guo, M., Song, Y. Q., Cheng, J., Dong, G., Sun, X., and Sheng, C. (2024) Hydrophobic tagging-induced degradation of NAMPT in leukemia cells. *Chinese Chemical Letters*. 10.1016/j.ccllet.2023.109392
106. Luzio, J. P., Pryor, P. R., and Bright, N. A. (2007) Lysosomes: Fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 622–632
107. Zhou, Z., Liang, J., Cheng, B., Li, Y., Zhou, W., Tian, H., Shi, W., Liu, K., Fang, L., Li, H., and Shao, X. (2025) Targeted Degradation Technologies Utilizing Autophagy. *Int. J. Mol. Sci.* 10.3390/ijms26146576
108. Hu, Y., Yan, Y., Wang, J., Hou, J., and Lin, Q. (2024) Molecular glue degrader for tumor treatment. *Front. Oncol.* 10.3389/fonc.2024.1512666
109. Bermudez, T., Sammani, S., Song, J. H., Hernon, V. R., Kempf, C. L., Garcia, A. N., Burt, J., Hufford, M., Camp, S. M., Cress, A. E., Desai, A. A., Natarajan, V., Jacobson, J. R., Dudek, S. M., Cancio, L. C., Alvarez, J., Rafikov, R., Li, Y., Zhang, D. D., Casanova, N. G., Bime, C., and Garcia, J. G. N. (2022) eNAMPT neutralization reduces preclinical ARDS severity via rectified NFκB and Akt/mTORC2 signaling. *Sci. Rep.* 10.1038/s41598-021-04444-9
110. Sammani, S., Bermudez, T., Kempf, C. L., Song, J. H., Fleming, J. C., Reyes Hernon, V., Hufford, M., Tang, L., Cai, H., Camp, S. M., Natarajan, V., Jacobson, J. R., Dudek, S. M., Martin, D. R., Karmonik, C., Sun, X., Sun, B., Casanova, N. G., Bime, C., and Garcia, J. G. N. (2022) eNAMPT Neutralization Preserves Lung Fluid Balance and Reduces Acute Renal Injury in Porcine Sepsis/VILI-Induced Inflammatory Lung Injury. *Front. Physiol.* 10.3389/fphys.2022.916159
111. Sun, B. L., Tang, L., Sun, X., Garcia, A. N., Camp, S. M., Posadas, E., Cress, A. E., and Garcia, J. G. N. (2021) A Humanized Monoclonal Antibody Targeting Extracellular

- Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Prevents Aggressive Prostate Cancer Progression. *Pharmaceuticals*. 10.3390/ph14121322
112. Miele, S., Polasek, T., Mantovani, S., Camp, S. M., and Garcia, J. G. N. *Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of the eNAMPT-Neutralizing ALT-100 Mab in Healthy Volunteers*
 113. Travelli, C., Colombo, G., Aliotta, M., Fagiani, F., Fava, N., De Sanctis, R., Grolla, A. A., Garcia, J. G. N., Clemente, N., Portararo, P., Costanza, M., Condorelli, F., Colombo, M. P., Sangaletti, S., and Genazzani, A. A. (2023) Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) neutralization counteracts T cell immune evasion in breast cancer. *J. Immunother. Cancer*. 10.1136/jitc-2023-007010
 114. Raina, K., Lu, J., Qian, Y., Altieri, M., Gordon, D., Rossi, A. M. K., Wang, J., Chen, X., Dong, H., Siu, K., Winkler, J. D., Crew, A. P., Crews, C. M., and Coleman, K. G. (2016) PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 7124–7129
 115. Lu, T., Chen, F., Yao, J., Bu, Z., Kyani, A., Liang, B., Chen, S., Zheng, Y., Liang, H., Neamati, N., and Liu, Y. (2024) Design of FK866-Based Degraders for Blocking the Nonenzymatic Functions of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. *J. Med. Chem.* 67, 8099–8121
 116. Li, Y., Li, X., Liu, K. R., Zhang, J. N., Liu, Y., and Zhu, Y. (2015) Visfatin derived from ascites promotes ovarian cancer cell migration through Rho/ROCK signaling-mediated actin polymerization. *European Journal of Cancer Prevention*. 24, 231–239