

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE**

**“AMEDEO AVOGADRO”**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche**

**TESI DI LAUREA**

**Validazione *in vitro* di un nuovo promettente PROTAC anti-nicotinamide  
fosforibosiltransferasi (NAMPT) come strategia farmacologica per il  
trattamento del carcinoma mammario**

**Relatore**

**Prof.ssa Ambra Grolla**

**Candidato**

**Sara Caccia**

**Correlatore**

**Dott.ssa Marianna Moro**

**Anno accademico 2024-2025**

**Sessione straordinaria**

*Alla mia dolce Virgi,  
perché tu possa crescere libera di pensare,  
di scoprire e di scegliere chi vuoi diventare.*

## **INDICE ABBREVIAZIONI**

**4T1** Mouse Mammary Carcinoma Cell Line

**ADC** Antibody Drug Conjugate

**ADP** Adenosine Diphosphate

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

**AR** Androgen Receptor

**ARDS** Acute Respiratory Distress Syndrome

**ATTEC** Autophagosome-Tethering Compound

**ATP** Adenosine Triphosphate

**AUTACs** Autophagy-Targeting Chimeras

**B16** Murine Melanoma Cell Line

**BRCA** Breast Cancer

**CA** Cancer Antigen

**CCL** Chemokine Ligand

**CCR** Chemokine Receptor

**CRBN** Cereblon

**DAMP** Damage-Associated Molecular Pattern

**DC50** Degradation Concentration 50

**DNA** Deoxiribonucleic Acid

**DNBS** Dinitrobenzene Sulfonic Acid

**DSS** Dextran Sodium Sulfate

**EC** Endothelial Cell

**ECL** Enhanced Chemiluminescence

**ECM** Extracellular Matrix

**EGF** Epidermal Growth Factor

**EOC** Epithelial Ovarian Cancer

**eNAMPT** Extracellular form of NAMPT

**ER** Estrogen Receptor

**EV** Extracellular Vesicle

**FBS** Fetal Bovine Serum

**bFGF** Basic Fibroblast Growth Factor

**FOXM1** Forkhead Box M1

**G-CSF** Granulocyte Colony-Stimulating Factor

**GAPDH** Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

**GLUT** Glucose Transporter

**GrzB** Granzyme B

**HCL** Hydrochloric Acid

**HCT-116** Human Colorectal Carcinoma Cell Line

**HER** Human Epidermal Growth Factor Receptor

**HepG2** Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line G2

**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

**IC<sub>50</sub>** Inhibitory Concentration 50

**IDO** Indoleamine 2,3-Dioxygenase

**IFN- $\gamma$**  Interferon Gamma

**IL** Interleukin

**iNAMPT** Intracellular Nicotinamide Phosphoribosyltransferase

**LS180** Human Colon Adenocarcinoma Cell Line

**LPS** Lipopolysaccharide

**LYTACs** Lysosome-Targeting Chimeras

**MAPK** Mitogen-Activated Protein Kinase

**MCF7** Michigan Cancer Foundation – 7

**MD** Myeloid Differentiation

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

**MDSC** Myeloid-Derived Suppressor Cells

**MEM** Minimum Essential Medium Eagle

**MMP** Matrix Metalloproteinase

**c-MYC** Myelocytomatosis

**NA** Nicotinic Acid

**NAAD** Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide

**NAADP** Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate

**NAD<sup>+</sup>** Nicotinamide Adenine Dinucleotide (oxidized form)

**NADH** Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced form)

**NaF** Sodium Fluoride

**NAM** Nicotinamide

**NAMN** Nicotinic Acid Mononucleotide

**NAMPT** Nicotinamide Phosphoribosyltransferase

**NAPRT** Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase

**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>** Sodium Orthovanadate

**NF-κB** Nuclear Factor kappa B

**NMN** Nicotinamide Mononucleotide

**NMNAT** Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase

**OA** Osteoarthritis

**PAK4** p21-Activated Kinase 4

**PBEF** Pre-B-cell Colony Enhancing Factor

**PDGF** Platelet Derived Growth Factor

**PDL-1** Programmed cell death ligand 1

**PEC** Peritoneal Exudate Cell

**PEG** Polyethylene Glycol

**PI3K** Phosphoinositide 3-Kinase

**PMSF** Phenylmethylsulfonyl Fluoride

**POI** Protein of Interest

**PR** Progesterone Receptor

**PROTAC** Proteolysis-Targeting Chimera

**PRPP** 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphate

**PS-PROTACs** Photo switchable PROTACs

**PTM** Post-Translational Modifications

**QA** Quinolinic Acid

**QPRT** Quinolate Phosphoribosyltransferase

**RA** Rheumatoid Arthritis

**RIPA** Radioimmunoprecipitation Assay Buffer

**RNA** Ribonucleic Acid

**SH-SY5Y** Human Neuroblastoma Cell Line (Subclone of SK-N-SH)

**SIRT** Sirtuin

**SkMel28** Human Skin Melanoma Cell Line Derived from Metastatic Tissue

**STAT** Signal Transducer and Activator of Transcription

**TANs** Tumour-Associated Neutrophils

**TCA Cycle** Tricarboxylic Acid Cycle

**TDO** Tryptophan 2,3-Dioxygenase

**TLR4** Toll-Like Receptor 4

**TME** Tumour Microenvironment

**TNF- $\alpha$**  Tumour Necrosis Factor  $\alpha$

**TNM** Tumor-Node-Metastasis Classification

**TPD** Targeted protein degradation

**mTOR** Mammalian Target of Rapamycin

**Treg** Regulatory T Cells

**U87** Uppsala 87, Human Glioblastoma Cell Line

**UPS** Sistema ubiquitina-proteasoma

**VCAM** Vascular Cell Adhesion Molecule

**VEGF** Vascular Endothelial Growth Factor

**VHL** Von Hippel-Lindau Protein

# INDICE

<b>1.0 INTRODUZIONE</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 IL CARCINOMA MAMMARIO</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 LA VIA DI BIOSINTESI DEL NAD<sup>+</sup></b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 L'ATTIVITÀ DI NAMPT COME PROTEINA MOONLIGHTING</b> .....	<b>6</b>
1.3.1 Il ruolo di iNAMPT.....	7
1.3.2 Il ruolo di eNAMPT .....	9
<b>1.4 NAMPT COME BERSAGLIO TERAPEUTICO</b> .....	<b>15</b>
1.4.1 Inibitori classici.....	15
1.4.2 Inibitori duali.....	16
1.4.3 Degradatori iNAMPT .....	16
1.4.4 Modulazione farmacologia di eNAMPT.....	22
<b>2.0 SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>23</b>
<b>3.0 RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>24</b>
<b>4.0 CONCLUSIONI</b> .....	<b>37</b>
<b>5.0 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>38</b>
<b>6.0 BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>43</b>

# 1.0 INTRODUZIONE

## 1.1 IL CARCINOMA MAMMARIO

Il carcinoma mammario è attualmente la neoplasia più frequentemente diagnosticata nelle donne a livello mondiale, con 2,3 milioni di nuovi casi nel 2020, nonché la quinta causa di decessi correlati al cancro [1]. Sebbene colpisca in modo predominante le donne di età superiore ai 50 anni, può manifestarsi anche in donne più giovani e, meno frequentemente, negli uomini, che rappresentano circa l'1% dei casi [2].

Le manifestazioni cliniche del carcinoma mammario possono includere comparsa di:

- noduli al seno e/o ascellari che possono essere duri, irregolari, immobili o fissi, generalmente indolori;
- gonfiore o cambiamenti nelle dimensioni e nella forma del seno;
- alterazioni cutanee;
- cambiamenti del capezzolo come inversione, alterazioni della pelle o secrezioni [3].

Molteplici fattori, modificabili e non modificabili, contribuiscono all'aumento del rischio di sviluppare il carcinoma mammario. I fattori di rischio modificabili includono consumo eccessivo di alcol, fumo, stile di vita sedentario, obesità ed esposizione a radiazioni ionizzanti in giovane età. Tra quelli non modificabili, invece, si evidenziano sesso, età avanzata, storia familiare, mutazioni genetiche (i geni ad alta penetranza maggiormente coinvolti sono BRCA1 e BRCA2) e la storia riproduttiva. In particolar modo l'esposizione prolungata agli ormoni endogeni, quali estrogeni e progesterone, rappresentano un fattore determinante nel condizionare la probabilità di sviluppare la malattia. Di conseguenza, condizioni fisiologiche come gravidanza, allattamento, menarca e menopausa, insieme alla durata di ciascuna fase e ai relativi squilibri ormonali influenzano significativamente il rischio individuale. La gravidanza, l'allattamento prolungato e la menopausa anticipata esercitano un effetto protettivo, riducendo l'incidenza, mentre un menarca precoce può essere associato ad una prognosi complessivamente peggiore [1].

Come in tutti i tumori, la progressione tumorale può portare a recidive, metastasi e resistenza ai trattamenti. L'evoluzione della malattia, dalla fase in situ a quella invasiva, rappresenta un processo complesso che ha origine dall'anomala proliferazione cellulare nei lobuli mammari, in cui contribuiscono in maniera essenziale mutazioni genetiche e interazioni con il microambiente tumorale [4].

Il carcinoma mammario è una patologia altamente eterogenea, il trattamento clinico e la prognosi variano notevolmente tra i pazienti. Attualmente l'approccio terapeutico si basa su risultati diagnostici e prevede generalmente una combinazione di chirurgia, radioterapia, chemioterapia, terapie ormonali e terapie mirate. La presenza o l'assenza dei recettori per gli estrogeni (ER), per il progesterone (PR) e per il fattore di crescita epidermico umano 2 (HER2) sulle cellule tumorali è determinante per la scelta della terapia [3].

Sulla base di risultati immunoistochimici, il carcinoma mammario viene suddiviso in quattro sottotipi molecolari:

- **Luminale A** è il sottotipo più prevalente poiché rappresenta il 50-60% di tutti i casi. È caratterizzato da una elevata espressione di ER, PR e una bassa espressione di HER2, ed è associato ad una crescita cellulare più lenta, una prognosi migliore e una maggiore risposta alla terapia ormonale.
- **Luminale B** rappresenta il 20-30% di tutti i casi, anch'esso è ER-positivo ma può essere sia HER2+ che HER2-. Rispetto al luminale A è un fenotipo più aggressivo [4].
- **HER2-positivo** rappresenta il 20% di tutti i casi ed è caratterizzato dalla sovraespressione di HER2 con assenza di ER e PR. È spesso più aggressivo ma risulta responsivo alle terapie anti-HER2 [2].
- **Carcinoma mammario triplo negativo (TNBC)**, responsabile di più del 15–20% di tutti i casi, è caratterizzato dalla mancanza di espressione di ER, PR e HER2, quindi non responsivo né alla terapia ormonale né alle terapie anti-HER2. Inoltre, è associato ad un elevato potenziale metastatico, ad una maggiore tendenza alle recidive e ad una prognosi sfavorevole. Rispetto agli altri sottotipi di carcinoma mammario, il tempo di sopravvivenza delle pazienti affette da TNBC è più breve e il tasso di mortalità raggiunge il 40% entro i primi 5 anni dalla diagnosi. Poiché il TNBC non è responsivo alle terapie sopra citate, la chemio-radioterapia adiuvante postoperatoria rappresenta il principale trattamento ma la sua efficacia risulta spesso essere limitata. Date queste limitazioni, è fortemente necessario identificare nuovi biomarcatori molecolari e nuove strategie terapeutiche personalizzate [5].

## 1.2 LA VIA DI BIOSINTESI DEL NAD<sup>+</sup>

Il metabolismo energetico è un insieme di processi biochimici essenziali per fornire alla cellula l'energia necessaria per le principali funzioni vitali quali crescita, mantenimento e morte cellulare [6]. In condizioni fisiologiche, le cellule sane sfruttano principalmente la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) nei mitocondri per generare ATP, grazie all'ossidazione del glucosio in presenza di ossigeno [7].

Le cellule tumorali, invece, modificano autonomamente i propri percorsi metabolici, al fine di produrre macromolecole e oncometaboliti, in modo da soddisfare l'aumentato fabbisogno energetico e adattarsi alle condizioni sfavorevoli dei microambienti tumorali (TME), i quali sono caratterizzati da scarsa disponibilità di ossigeno, elevato stress ossidativo, acidità e limitata disponibilità di nutrienti [8,9].

Tale riprogrammazione metabolica è una proprietà distintiva della tumorigenesi e consiste in alterazioni del metabolismo degli acidi nucleici, del metabolismo lipidico e mitocondriale, della sintesi proteica, del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). Un aspetto chiave di tale riprogrammazione è l'effetto Warburg, o glicolisi aerobica, fenomeno descritto da Otto Warburg negli anni '20. Warburg osservò che le cellule tumorali, a differenza delle cellule normali, utilizzavano grandi quantità di glucosio per generare lattato, anche in presenza di ossigeno, preferendo quindi la glicolisi aerobica piuttosto che la fosforilazione ossidativa. La glicolisi aerobica, quindi, favorisce la progressione tumorale aumentando il flusso glicolitico e permettendo agli intermedi di supportare la sintesi de novo di nucleotidi, lipidi e aminoacidi, fondamentali a garantire la proliferazione cellulare [9].

Tra le numerose vie metaboliche alterate nel cancro, il metabolismo della nicotinamide adenina dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) riveste un ruolo centrale [10].

Il NAD<sup>+</sup> è un cofattore enzimatico che si comporta da trasportatore redox in processi metabolici chiave, accettando e donando elettroni [11]. Oltre a questo suo ruolo, il NAD<sup>+</sup> funge da substrato per vari enzimi NAD-dipendenti, tra cui le poli ADP-ribosio polimerasi (PARP), responsabili della riparazione del DNA, e le sirtuine (SIRT 1-7), una famiglia di deacetilasi coinvolte nella sopravvivenza e longevità cellulare [6]. Infine, agisce anche da analogo nucleotidico nei processi di ligazione del DNA e di RNA capping.

Il NAD<sup>+</sup> quindi influenza il metabolismo energetico, la riparazione del DNA, le modifiche epigenetiche, l'infiammazione, la resistenza allo stress e il ritmo circadiano. Di conseguenza, una sua

disregolazione dell'omeostasi è implicata nello sviluppo di varie patologie come il cancro, disturbi metabolici, l'invecchiamento e disturbi neurodegenerativi [10].

In particolare, quando le cellule neoplastiche passano dalla fosforilazione ossidativa alla fermentazione lattica, per sostenere le elevate richieste energetiche, aumentano la biosintesi di  $\text{NAD}^+$ . Infatti, i livelli di  $\text{NAD}^+$  sono molto più elevati nelle cellule tumorali rispetto alle cellule normali [10,6].

Nelle cellule dei mammiferi, il  $\text{NAD}^+$  viene sintetizzato tramite tre principali vie biosintetiche:

1. La *via de novo* a partire dal triptofano (Trp), il quale è inizialmente convertito in N-formilchinerina dall'indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO) o dal triptofano 2,3-diossigenasi (TDO), entrambe enzimi dipendenti dall'ossigeno. Successivamente intervengono altri quattro enzimi permettendo la formazione dell'acido chinolinico (QA), che viene poi decarbossilato, dall'enzima limitante chinolinato fosforibosiltransferasi (QPRT), generando l'acido nicotinico mononucleotide (NAMN).
2. La *via Preiss-Handler* a partire dall'acido nicotinico (NA), richiede inizialmente l'enzima nicotinato fosforibosiltransferasi (NAPRT1) che catalizza la conversione del NA in NAMN. Quest'ultimo viene poi convertito in nicotinato adenina dinucleotide (NAAD) dalla adenililtransferasi del mononucleotide di nicotinammide (NMNATs) e infine in  $\text{NAD}^+$  tramite la  $\text{NAD}^+$  sintasi [10].
3. La *via di salvataggio* (salvage pathway), è la principale via biosintetica del  $\text{NAD}^+$ , converte la nicotinamide (NAM) (acquisita tramite la dieta o come prodotto finale del consumo di  $\text{NAD}^+$ ) e alfa-d-5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) in mononucleotide di nicotinamide (NMN) e pirofosfato inorganico, in una reazione ATP-dipendente e catalizzata dalla nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT), enzima limitante la velocità di biosintesi del  $\text{NAD}^+$ . La reazione prevede il legame dell'ATP al sito attivo della NAMPT e una transitoria autofosforilazione sul residuo di istidina 247 (His247), questo permette l'aumento dell'affinità dell'enzima per i substrati NAM e PRPP. Dopo la formazione di NMN, esso viene convertito in  $\text{NAD}^+$ , da parte della nicotinamide mononucleotide adenililtransferasi (NMNAT 1-3) [6]. La via di salvataggio consente anche di rigenerare il NAM, garantendo così il mantenimento dei livelli intracellulari di  $\text{NAD}^+$ .

Come riportato precedentemente, le cellule tumorali, per soddisfare le elevate richieste energetiche, aumentano il consumo di  $\text{NAD}^+$  e, di conseguenza, molti tumori risultano essere fortemente dipendenti dalla via di salvataggio. In questo contesto, NAMPT risulta essere un importante bersaglio terapeutico per modulare i livelli di  $\text{NAD}^+$  nelle cellule tumorali e compromettere i processi che favoriscono la crescita, la sopravvivenza e la progressione maligna [6].

### 1.3 L'ATTIVITÀ DI NAMPT COME PROTEINA MOONLIGHTING

La nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT) è una proteina pleiotropica, capace di svolgere molteplici funzioni biochimiche rilevanti, oltre al suo ruolo di enzima limitante della via biosintetica del  $\text{NAD}^+$ . La NAMPT è ampiamente espressa in diversi tessuti e tipi cellulari, inclusi midollo umano, fegato, muscoli e altri organi, nonché nelle cellule del sistema immunitario, nei cardiomiociti, nei fibroblasti e nei neuroni. Tale espressione suggerisce il ruolo centrale della NAMPT sia negli stati fisiologici che patologici [12]. In accordo con la sua importanza biologica il gene NAMPT è espresso in maniera pressoché ubiquitaria nei tessuti dei mammiferi e la sua sequenza codificante risulta altamente conservata dal punto di vista evolutivo, condividendo un'elevata omologia tra specie mammifere come il topo e l'uomo.

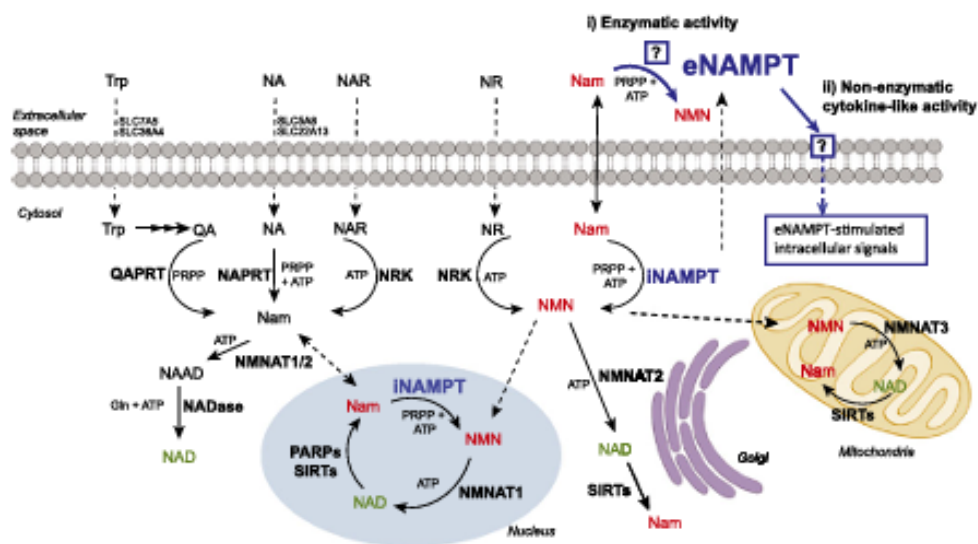


Figura 1 Principali vie biosintetiche del  $\text{NAD}^+$  [25].

A livello molecolare, NAMPT esiste in due forme distinte: NAMPT intracellulare (iNAMPT), responsabile dell'attività enzimatica e NAMPT extracellulare (eNAMPT), con attività di citochina con proprietà proliferative, pro-infiammatorie e pro-angiogeniche [13].

### 1.3.1 IL RUOLO DI iNAMPT

#### *Funzioni biologiche di iNAMPT*

iNAMPT è una fosforibosiltransferasi dimerica di tipo II che presenta due siti attivi situati all'interfaccia del dimero, ciascuno in grado di legare una molecola di NMN. NAMPT possiede una notevole omologia strutturale con la fosforibosiltransferasi dimerica dell'acido nicotinico (NAPRT), tuttavia, differisce per la presenza di uno specifico legame a idrogeno tra il residuo Asp219 e il gruppo ammidico della NAM, che impedisce la formazione di legami idrogeno con la niacina o con l'acido chinolinico. L'attività catalitica di NAMPT risulta essere potenziata in seguito alla fosforilazione sul residuo His247, la carica negativa aggiuntiva favorisce il clivaggio del pirofosfato dal PRPP stabilizzando la formazione di un intermedio carico positivamente che reagisce con la NAM per formare NMN. Mutazioni a carico del residuo His247 influenzano significativamente l'attività enzimatica. In particolare, la sostituzione dell'istidina con l'alanina (mutazione H247A) comporta una completa perdita di attività catalitica, mentre la sostituzione con il glutammato conserva una ridotta attività enzimatica [14]. L'importanza funzionale di questa fosforilazione è ulteriormente supportata dall'identificazione di un composto (SBI-797812), che stabilizza il residuo fosforilato His247, aumentando l'affinità della NAMPT per l'ATP e potenziando così la produzione di NAD<sup>+</sup> [15].

Il gene NAMPT è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7 e contiene diverse regioni regolatorie. All'interno del promotore prossimale è presente una regione sensibile allo stress meccanico in grado di modulare l'attività del promotore di NAMPT, l'espressione di mRNA e il legame del trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione 5 (STAT5). Questa regione ospita anche siti di legame per ulteriori fattori di trascrizione, inclusi due elementi responsivi all'ipossia (HRE), coinvolti nell'aumento d'espressione di iNAMPT in condizioni ipossiche ed elementi che modulano l'espressione di geni associati al fattore di crescita epidermico (EGF). La regione del promotore distale, invece, presenta un sito di legame per NF-κB, un fattore trascrizionale centrale delle risposte infiammatorie e immunitarie, associando l'espressione di NAMPT ai circuiti molecolari dell'infiammazione [16]. Tra i meccanismi regolatori presi in considerazione rientra un elemento potenziatore specifico, denominato enhancer B, contrassegnato dall'acetilazione dell'istone H3 in posizione K27 (H3K27ac), un marcatore di cromatina trascrizionalmente attiva, che contribuisce al controllo dell'espressione di iNAMPT e dei livelli di NAD<sup>+</sup>. Inoltre, questo enhancer funge da sito di legame per fattori di trascrizione coinvolti nella progressione tumorale, quali c-MYC, STAT3 e forkhead box M1 (FOXO1) [17].

### *iNAMPT nel cancro*

Considerata la stretta correlazione tra l'aumentato fabbisogno metabolico e il fenotipo neoplastico, iNAMPT risulta sovraespressa in diverse neoplasie, tra cui tumore al seno, tumore gastrico, pancreatico, prostatico, tiroideo, ovarico, endometriale e cerebrale, così come melanomi, sarcomi e neoplasie ematologiche, inoltre è frequentemente predittiva di una prognosi clinica sfavorevole [13]. Nel glioblastoma è stato dimostrato come l'aumentata espressione di iNAMPT correli con una maggiore invasività tumorale, un potenziale metastatico peggiore e resistenza alla chemioterapia [18].

iNAMPT è principalmente localizzato nel citoplasma, compartimento cellulare principale per la biosintesi di  $\text{NAD}^+$  nelle cellule tumorali. Tuttavia, la traslocazione nucleare di iNAMPT, come dimostrato da Svoboda e colleghi, risulta essere dipendente dal ciclo cellulare ed è un processo fondamentale per la proliferazione delle cellule neoplastiche e per il mantenimento dei livelli nucleari di  $\text{NAD}^+$  in condizioni di stress cellulare, come danni al DNA o stress ossidativo [19]. In questo contesto, Grolla e collaboratori, nel 2020 hanno dimostrato come GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) funzioni da "shuttle" proteico favorendo il trasporto di NAMPT all'interno del nucleo, attraverso la formazione di un complesso stabile, in risposta a stimoli di stress che aumentano il consumo di  $\text{NAD}^+$ . Tali evidenze suggeriscono che, nel contesto tumorale, possa verificarsi una ridistribuzione dei pool intracellulari di  $\text{NAD}^+$  [20].

Evidenze crescenti suggeriscono che la iNAMPT eserciti azioni neoplastiche attraverso molteplici meccanismi. Agendo come regolatore delle vie metaboliche del cancro, guida la riprogrammazione metabolica e favorisce la sintesi di biomolecole supportando la crescita tumorale. Inoltre, modulando l'attività di enzimi NAD-dipendenti quali le PARP e le sirtuine, potenzia i meccanismi di riparazione del DNA, permettendo alle cellule neoplastiche di sopravvivere ai danni genotossici e allo stress ossidativo. In particolare, l'attivazione della sirtuina SIRT1, mediata da iNAMPT, promuove la sopravvivenza cellulare attenuando segnali pro-apoptotici come p53 e PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog). Nel carcinoma mammario, la iNAMPT promuove la crescita cellulare attraverso l'upregolazione della via Notch1 e l'attivazione di cicline, tra cui la ciclina D1 [13,21].

Un'ulteriore funzione di iNAMPT riguarda il suo ruolo nella regolazione delle cellule endoteliali (EC) e nella promozione dell'angiogenesi tumorale. La sua sovraespressione supporta la sopravvivenza delle EC e favorisce quindi la formazione di nuovi vasi, al contrario il silenziamento di iNAMPT aumenta l'apoptosi indotta da  $\text{TNF-}\alpha$  [22]. Parallelamente, iNAMPT contribuisce alla polarizzazione pro-tumorigenica dei neutrofili associati ai tumori (TAN). In modelli murini di

melanoma e fibrosarcoma, il trattamento dei TAN con FK866, un inibitore specifico di NAMPT, ha ridotto la crescita tumorale e la vascolarizzazione, suggerendo che iNAMPT rappresenta un elemento centrale nella modulazione dell'angiogenesi e un promettente bersaglio terapeutico [23].

### 1.3.2 IL RUOLO DI eNAMPT

#### *Origini di eNAMPT*

La forma extracellulare di NAMPT (eNAMPT) fu identificata per la prima volta nel 1994 come una proteina attiva nello spazio extracellulare. Originariamente isolata dalle cellule pre-B, venne denominata pre-B-cell colony enhancing factor (PBEF) in virtù della sua capacità di cooperare con l'interleuchina-7 (IL-7) e il fattore delle cellule staminali (SCF) al fine di promuovere la formazione delle cellule B [11]. Nel 2005 fu rinominata visfatina poiché fu dimostrato che veniva rilasciata dal tessuto adiposo viscerale [24]. eNAMPT viene rilasciata dalla maggior parte delle cellule, tra cui il sistema circolatorio, il sistema immunitario, il liquido cerebrospinale, il tessuto adiposo, il fegato e i cardiomiociti [11].

Nonostante gli esatti meccanismi di secrezione della proteina non siano ancora completamente chiariti, le evidenze attuali suggeriscono un rilascio attraverso vie non convenzionali in assenza di morte cellulare, configurandosi quindi come un fenomeno reale e specifico. Infatti, la secrezione di eNAMPT è stata osservata in un ampio spettro di linee cellulari tumorali, come epatoma (HepG2-Huh-7), carcinoma coloretale (HCT-116, LS180), cancro al seno (ad es., MCF7, MDA-MB-231), melanoma (ad es., SkMel28, B16), glioma e neuroblastoma (U87, SH-SY5Y), mesotelioma, tumori della prostata, della cervice uterina e delle cellule leucemiche [25].

#### *Meccanismi di secrezione di eNAMPT*

Gli stimoli che inducono il rilascio di eNAMPT possono essere classificati in tre categorie: (i) stress cellulare, come stress ossidativo, deprivazione di ossigeno e di glucosio; (ii) segnali nutrizionali, come insulina e glucosio; (iii) stimoli infiammatori come LPS, TNF- $\alpha$ , e IL-1b. Queste condizioni sono altamente rilevanti nel contesto tumorale, poiché rappresentano caratteristiche tipiche del TME [25].

La secrezione di eNAMPT non sembra seguire nella maggior parte dei casi una via classica, infatti, alcuni studi suggeriscono che il suo rilascio non è influenzato dall'inibizione di brefeldina e monensina, noti inibitori della via classica dipende da ER-Golgi. Inoltre, nelle cellule di melanoma, il trattamento con cloroquina è stato associato ad un incremento della secrezione, suggerendo un possibile coinvolgimento del traffico lisosomiale. In uno studio più recente si è dimostrato però come la via di rilascio possa essere diversa in base al contesto cellulare. Nei macrofagi murini primari (PECs), infatti, uno stimolo come IFN $\gamma$  sinergizza con eNAMPT e ne induce attivamente l'espressione e la secrezione attraverso la via classica (ER-Golgi) [26].

Un altro possibile meccanismo di rilascio prevede l'incorporazione di eNAMPT all'interno di esosomi o microvescicole, anche se questo percorso sembra contribuire solo marginalmente alla quantità totale di proteina secreta [27]. Uno studio recente di Yoshida e colleghi, ha dimostrato che vescicole extracellulari (EVs) contenenti eNAMPT, isolate da topi giovani, prolungano la durata della vita di topi adulti, suggerendo come la forma incapsulata nelle EV possa potenziare la biosintesi di NAD<sup>+</sup> [28].

Indipendentemente dal meccanismo di secrezione, un ruolo fondamentale è svolto dalle modifiche post-traduzionali (PTM) successive alla secrezione. In particolare, da studi di mutagenesi è emerso come la deacetilazione della lisina K53 mediata da SIRT1 favorisca sia la secrezione di eNAMPT sia la sua attività [11,25]. Al contrario, la deacetilazione da parte di SIRT6 è stata dimostrata ridurre il rilascio [29].

### *eNAMPT e le sue molteplici funzioni*

La forma extracellulare di NAMPT è una proteina multifunzionale con attività pro-infiammatorie, proliferative, anti-apoptotiche, pro-angiogeniche e di adipocitochina [13, 30]. In letteratura, numerose evidenze sperimentali indicano come eNAMPT sia in grado di attivare diversi pathway di segnalazione intracellulari con dinamiche temporali variabili, ma i meccanismi molecolari sono ancora oggi oggetto di studio [25].

Una condizione essenziale per l'attività enzimatica di NAMPT è la sua dimerizzazione, come evidenziato dalla ridotta attività dei mutanti non dimerizzanti S199D e S200D [30]. Uno studio ha dimostrato come eNAMPT secreta dagli adipociti possa catalizzare la formazione di NMN nello spazio extracellulare, che successivamente entra nelle cellule contribuendo alla sintesi intracellulare di NAD<sup>+</sup>. Tuttavia, la disponibilità di substrati, attivatori e prodotti della reazione enzimatica di

NAMPT nello spazio extracellulare sembra non sia sufficiente. È noto, però, che alcune condizioni patologiche possono creare un ambiente extracellulare favorevole all'attività della NAMPT, ad esempio, il microambiente tumorale, caratterizzato da regioni ipossiche, elevata necrosi e pH acido, potrebbe fornire substrati per l'eNAMPT [21, 30].

Infatti, nel diabete mellito di tipo 2 i livelli sierici di eNAMPT risultano aumentati; tuttavia, il contributo delle sue diverse forme molecolari alla patogenesi della malattia non è completamente chiarito. Studi su modelli murini indicano che l'eNAMPT monomerica, è selettivamente elevata e promuove alterazioni metaboliche e infiammatorie indipendenti dalla biosintesi del NAD<sup>+</sup>, mentre la forma dimerica rimane invariata. Nel complesso, tali dati suggeriscono un ruolo patogenetico specifico dell'eNAMPT monomerica [31].

Considerata la rapidità e l'intensità di attivazione di diversi percorsi intracellulari mediata da eNAMPT, numerosi studi recenti suggeriscono il coinvolgimento di specifici recettori espressi sulla superficie cellulare. L'interazione di eNAMPT con tali recettori costituirebbe il meccanismo attraverso il quale la proteina è in grado di esercitare le proprie funzioni extracellulari. Tra i recettori finora proposti, i più plausibili sono il recettore per le chemochine C-C di tipo 5 (CCR5) e il recettore Toll-like 4 (TLR4) [24, 25]. L'evidenza più solida a supporto del coinvolgimento di CCR5 è stata fornita inizialmente nel 2012 da Van den Bergh e colleghi, i quali hanno mostrato il legame diretto tra eNAMPT e CCR5 con un'affinità nel range del nanomolare (nM). Successivamente, Torretta e colleghi hanno osservato una conformazione strutturale sovrapponibile tra eNAMPT e CCL7, un ligando fisiologico di CCR5, suggerendo una possibile funzione da antagonista di eNAMPT nei confronti del recettore [32]. Per quanto riguarda il TLR4, invece, l'analisi computazionale condotta da Garcia nel 2015 ha evidenziato un'omologia strutturale tra NAMPT e MD2, proteina fondamentale per il legame del lipopolisaccaride (LPS) e TLR4. Nello stesso anno i suoi colleghi hanno dimostrato che eNAMPT attiva la via di segnalazione NF-κB mediante l'interazione diretta con TLR4 [33]. A ulteriore conferma di questo meccanismo, esperimenti di silenziamento genico di TLR4 nei macrofagi, hanno determinato una marcata riduzione dell'attivazione di NF-κB in risposta a eNAMPT. Infine, ulteriori studi hanno caratterizzato l'interazione diretta di eNAMPT e TLR4, mostrando un'affinità relativamente alta, nel range del nM (KD = 18 nM) e che il legame eNAMPT-TLR4 coinvolge la regione 57-65aa della proteina, associata al dominio LRR (ripetizioni ricche in leucina) del recettore, proponendo un ulteriore sito di legame nella regione C-terminale [30].

Nonostante questi risultati, alcune attività di eNAMPT sembra possano essere TLR4 indipendenti, in quanto recentemente uno studio ha riportato come eNAMPT induca nei macrofagi l'espressione di

geni pro-infiammatori M1 (IL6, IL1b, COX2, TNF) indipendentemente da TLR4, suggerendo quindi un'azione pleiotropica della proteina tramite il legame con diversi recettori di superficie [26, 30].

eNAMPT è ampiamente riconosciuta come un mediatore dell'infiammazione. Numerosi studi presenti in letteratura, hanno dimostrato come la proteina attivi diverse vie di segnalazione infiammatorie, oltre a NF- $\kappa$ B, la proteina chinasi attivata dal mitogeno (MAPK) e il trasduttore attivatore del segnale di trascrizione-3 (STAT3), inducendo la produzione di citochine pro-infiammatorie, come IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-6, IL-10, CXCL8 e TNF- $\alpha$ , nonché di chemochine, tra cui CCL2, CCL3, CCL18 e CCL20 [30]. eNAMPT può modulare la differenziazione dei monociti in macrofagi in modo dipendente dal contesto. In condizioni fisiologiche o in monociti derivati da donatori sani, la proteina favorisce la polarizzazione verso il fenotipo pro-infiammatorio M1, caratterizzato dall'aumento di iNAMPT e dalla secrezione di citochine come TNF- $\alpha$  e IL-6. Tuttavia, in altri contesti, come nei monociti di pazienti leucemici o in microambienti patologici, eNAMPT può promuovere caratteristiche tipiche dei macrofagi M2, includendo l'espressione di IL-10, IDO, CD206 e CD163. Questi dati sperimentali supportano l'idea che eNAMPT eserciti un'azione pleiotropica, in grado di influenzare sia la risposta infiammatoria sia quella immunosoppressiva a seconda del tipo cellulare e delle condizioni circostanti [26, 30]. Le attività pro-infiammatorie di eNAMPT non si limitano alle cellule immunitarie, infatti, la proteina è anche implicata nei processi di infiammazione vascolare, inducendo nelle cellule endoteliali l'aumento dell'espressione delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1, con conseguente incremento dell'adesione monocitaria [13].

Oltre ai suoi effetti pro-infiammatori, è stato dimostrato che eNAMPT svolge un'azione pro-angiogenica stimolando la proliferazione, la migrazione e la capacità di formazione di vasi in vitro su cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC). Inoltre, è stato dimostrato come eNAMPT promuova la produzione e la secrezione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e aumenta l'espressione del recettore VEGF2 nelle cellule epiteliali endoteliali e amniotiche, mediante l'attivazione delle vie MAPK e PI3K, AKT, mTOR [25, 34, 35]. Infine, eNAMPT partecipa indirettamente al rimodellamento della matrice extracellulare (ECM), fenomeno che genera un microambiente favorevole all'angiogenesi, attraverso l'upregolazione delle proteasi coinvolte nella degradazione della membrana basale vascolare tramite MMP2, MMP9, gelatine e collagenasi [33,35, 36, 37, 38].

Oltre ai meccanismi precedentemente descritti, evidenze più recenti attribuiscono a eNAMPT un ruolo specifico nell'angiogenesi tumorale mediata dai periciti, cellule della parete vascolare essenziali

per la maturazione e la stabilità dei vasi. Alti livelli plasmatici di eNAMPT sono stati riportati in pazienti con carcinoma mammario e risultano associati a maggiore aggressività e peggior prognosi [39]. In particolare, in modelli preclinici di carcinoma mammario triplo negativo, l'arricchimento del microambiente tumorale con eNAMPT promuove l'angiogenesi e la metastatizzazione, agendo come un efficace fattore chemoattrattivo per i periciti, favorendone il reclutamento e contribuendo alla maturazione dei vasi neoformati tramite un incremento della copertura pericitica.

Questo effetto si manifesta in sinergia con PDGF-BB, promuovendo la formazione di una rete vascolare disorganizzata. A livello molecolare, eNAMPT stimola la via di segnalazione NF- $\kappa$ B nei periciti, aumentando l'espressione di chemochine come CXCL8, CXCL1 e CCL2, nonché di molecole di adesione quali VCAM1, contribuendo così alla creazione di un microambiente tumorale pro-infiammatorio e pro-angiogenico. L'utilizzo dell'anticorpo neutralizzante C269 ha portato a una significativa riduzione dell'angiogenesi e delle metastasi, suggerendo che l'inibizione di eNAMPT possa rappresentare una strategia terapeutica promettente contro l'angiogenesi nel carcinoma mammario triplo negativo [39].

eNAMPT funziona anche come adipocitochina, ovvero una molecola specializzata secreta dal tessuto adiposo che agisce come una cellula endocrina, secernendo citochine bioattive e regolando l'omeostasi del glucosio, il peso corporeo, l'infiammazione, la pressione sanguigna e la tumorigenesi [40]. La prima descrizione di eNAMPT come adipocitochina è stata riportata nel 2005 da Fukuhara e colleghi, i quali hanno dimostrato che eNAMPT è secreta dagli adipociti murini in vitro, confermato successivamente anche nei ratti [41]. eNAMPT sembra svolgere un ruolo chiave nel supportare la sopravvivenza e la funzionalità delle cellule  $\beta$  pancreatiche, in quanto la proteina contrasta l'apoptosi e la compromissione metabolica indotte dagli acidi grassi liberi in una linea cellulare pancreatica murina [42].

### *eNAMPT nel cancro*

eNAMPT agisce come citochina pro-infiammatoria stimolando la tumorigenesi come fattore anti-apoptotico e proliferativo attraverso l'attivazione di molteplici vie di segnalazione e la promozione dell'espressione di cicline come la ciclina D1 e la chinasi dipendente da ciclina 2 (CDK2). Inoltre, eNAMPT favorisce angiogenesi, invasione e metastatizzazione sfruttando i meccanismi già descritti per le sue funzioni extracellulari. È importante sottolineare che eNAMPT contribuisce alla progressione del cancro favorendo l'immunosoppressione nel microambiente tumorale, inoltre, in

alcuni tipi di tumori, agisce come mediatore ormonale [13,30]. In uno studio recente, è stato ipotizzato come estrogeni e/o progesterone possano indurre l'espressione di NAMPT negli adipociti e nei pre-adipociti mammari e come un'eccessiva secrezione di eNAMPT da parte di quest'ultimi potrebbe agire in modo autocrino e paracrino al fine di favorire la crescita e la progressione tumorale dell'epitelio mammario suscettibile [13].

Elevate concentrazioni di eNAMPT nel siero e nei fluidi biologici sono state riscontrate in diverse tipologie di tumori, sia tumori solidi che neoplasie ematologiche [30], suggerendo il suo potenziale come biomarcatore utile per la diagnosi precoce e per il follow-up della progressione della malattia [11]. In particolare, numerosi studi condotti su campioni clinici di pazienti oncologici hanno analizzato l'associazione tra i livelli circolanti di eNAMPT e diversi parametri, tra cui dimensioni tumorali, stadio della malattia, prognosi e biomarcatori specifici. Come riportato da Dalamaga e colleghi, gli elevati livelli di eNAMPT nei pazienti malati risultano positivamente correlati con la dimensione e lo stadio del tumore, oltre a essere associate a una prognosi sfavorevole, caratterizzata da una maggiore probabilità di recidiva e da una riduzione della sopravvivenza complessiva dei pazienti. Inoltre, livelli aumentati di eNAMPT si correlano con una maggiore invasione linfonodale e con la presenza di metastasi [30].

I livelli circolanti di eNAMPT mostrano inoltre associazioni significative con diversi biomarcatori tumorali, tra cui CA 15-3 nel carcinoma mammario, alfa-fetoproteina nel carcinoma epatocellulare e lattato deidrogenasi nel melanoma metastatico [30]. In particolare, nelle pazienti con carcinoma mammario postmenopausale, eNAMPT risulta significativamente aumentata rispetto ai controlli sani e correla positivamente con lo stadio TNM (tumore-linfonodi-metastasi), con le dimensioni del tumore, con il coinvolgimento linfonodale e il grado istologico [43]. Nei sottotipi ER-/PR-, eNAMPT presenta una capacità discriminante superiore rispetto al marcatore CA 15-3 nel distinguere tra stadi precoci e avanzati della malattia, supportando il suo potenziale ruolo come biomarcatore diagnostico e prognostico [44].

Infine, evidenze derivate da studi in vitro indicano che eNAMPT possa contribuire alla resistenza alle terapie oncologiche. È stato riportato come eNAMPT, inducendo la fosforilazione del recettore degli estrogeni  $\alpha$ , favorisca la resistenza al tamoxifene nel carcinoma mammario [45, 46]. Inoltre, l'aumento della capacità antiossidante delle cellule tumorali mediato da eNAMPT potrebbe contribuire alla chemioresistenza [30].

## 1.4 NAMPT COME BERSAGLIO TERAPEUTICO

### 1.4.1 INIBITORI CLASSICI

L'inibizione di NAMPT rappresenta una promettente strategia terapeutica antitumorale, infatti, inibire NAMPT porta all'esaurimento del  $\text{NAD}^+$  e conseguentemente dell'ATP, causando infine la diminuzione della proliferazione delle cellule tumorali e la loro morte [18].

Nel corso degli anni, sono stati sviluppati diversi inibitori di NAMPT a basso peso molecolare (NAMPTi) [30]. Il primo composto chimico ad essere stato sintetizzato e testato come inibitore fu FK866 (noto anche come APO866) nel 2003, che mostrò un'importante citotossicità e attività antitumorale nel range del nanomolare, sia in modelli in vitro che in vivo [21]. FK866 si lega all'interfaccia dell'omodimero di NAMPT, occupando parzialmente il sito di legame della nicotinamide [47].

Successivamente a FK866 sono stati sviluppati altri inibitori come CHS-828 (o GMX-17778) e il suo profarmaco GMX-1777, il quale è stato progettato per migliorare le proprietà di solubilità e il profilo farmacocinetico dimostrando un'elevata efficacia inibitoria in vivo [12]. Nonostante questi inibitori abbiano mostrato una potente attività antitumorale nei modelli preclinici, il loro sviluppo clinico si è arrestato nelle fasi iniziali. Le molecole hanno completato gli studi clinici di fase I mostrando una farmacocinetica poco favorevole e un'efficacia clinica limitata, principalmente a causa dell'insorgenza di tossicità dose-limitanti, tra cui trombocitopenia, disturbi gastrointestinali, rash cutaneo, linfopenia, cardiotoxicità e tossicità retinica [30, 13].

Il fallimento parziale degli inibitori potrebbe dipendere dall'espressione di enzimi alternativi della biosintesi del  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NAD}^+$  biosynthetic enzymes, NBE), come NAPRT, che consentono alle cellule tumorali di mantenere la produzione di  $\text{NAD}^+$  attraverso vie indipendenti da NAMPT.

Per superare questi limiti, sono state esplorate altre strategie terapeutiche, inclusa la terapia combinata con agenti chemioterapici, inibitori duali, PROTAC (Proteolysis-Targeting Chimera), HyTag, coniugati anticorpo-farmaco (ADC) e gli anticorpi monoclonali (Ab) [21].

## 1.4.2 INIBITORI DUALI

Nei protocolli oncologici, le monoterapie spesso presentano problemi di efficacia ridotta, resistenza farmacologica e tossicità dose-dipendente. Sviluppare inibitori doppi, che possono inibire simultaneamente NAMPT e altri bersagli offre numerosi e significativi vantaggi [12]. Uno di questi è la riduzione dei problemi farmacocinetici che possono insorgere con terapie che combinano molecole separate. Un esempio di inibitore doppio è KPT-9274 (noto anche come ATG-019), il quale colpisce simultaneamente NAMPT e la chinasi 4 attivata da p21 (PAK4), mostrando una buona efficacia contro diversi tumori solidi e malattie ematologiche sia in vitro che in vivo durante studi preclinici. Un altro esempio è STF 31, testato per la sua attività sia contro NAMPT che contro GLUT1, ha dimostrato una potente soppressione tumorale, in particolar modo contro l'osteosarcoma MG-63. Infine, è stato progettato anche un inibitore doppio diretto contro NAMPT e IDO1 (indoleamina 2,3-diossigenasi 1), mostrando una notevole attività inibitoria equilibrata su entrambi i target, che ha permesso la riduzione della proliferazione e della migrazione di linee cellulari di carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) [48, 49].

## 1.4.3 DEGRADATORI iNAMPT

### *PROTAC*

La degradazione proteica mirata (*targeted protein degradation*, TPD) rappresenta un vero e proprio cambio di paradigma nello sviluppo di nuovi farmaci. In questo contesto, le *proteolysis-targeting chimeras* (PROTAC) emergono come una tecnologia innovativa che supera l'approccio farmacologico tradizionale, basato sull'inibizione dell'attività proteica mediante il legame a siti catalitici o allosterici. I PROTAC sfruttano il sistema endogeno ubiquitina–proteasoma (UPS), principale sistema di turnover proteico, per indurre la degradazione selettiva della proteina bersaglio.

La validazione clinica di questa strategia è risultata particolarmente solida in ambito oncologico, dove gli approcci tradizionali sono spesso fallimentari. Grazie alla loro capacità di eliminare fisicamente le proteine target, i PROTAC si configurano come una strategia antitumorale altamente promettente [50]. Numerose evidenze indicano come i PROTAC presentino vantaggi significativi rispetto agli inibitori classici. Questi sono infatti da considerarsi dei degradatori con un meccanismo d'azione “event-driven” in cui una singola molecola di PROTAC può infatti essere riutilizzata per innescare

cicli successivi di degradazione, non è quindi necessario un legame continuo con il target per garantire l'effetto terapeutico. Questo meccanismo consente di ampliare lo spettro delle proteine farmacologicamente bersagliabili, includendo target tradizionalmente considerati “undruggable”, come fattori di trascrizione (ad esempio MYC e STAT3) o proteine prive di siti catalitici sfruttabili dagli inibitori convenzionali. Inoltre, questa strategia può contribuire a superare i meccanismi di resistenza associati a mutazioni del target [50, 51].

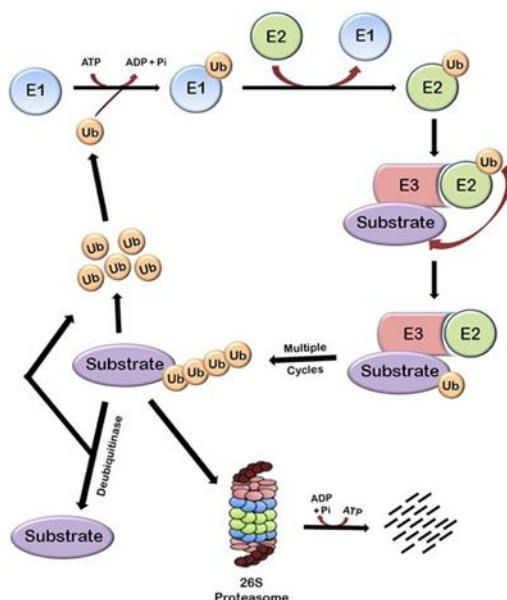
I PROTAC sono molecole eterobifunzionali composte da tre elementi chiave legati covalentemente: un ligando per la proteina d'interesse (POI), un ligando per un'ubiquitina ligasi E3 e un linker per unire i due domini. PROTAC induce la vicinanza spaziale tra la POI e la E3 ligasi, favorendo la formazione del complesso ternario POI-PROTAC-E3 che innesca l'ubiquitinazione e la successiva degradazione del POI [50].

Anche ligandi a bassa affinità possono promuovere una degradazione proteica efficace se il linker permette la formazione di un complesso ternario stabile. Proprietà come lunghezza, flessibilità e orientamento spaziale del linker influenzano direttamente l'interazione proteina-proteina e l'efficienza dell'ubiquitinazione, rendendolo un elemento chiave nella progettazione dei PROTAC, con effetti su selettività e farmacocinetica. Tra le ubiquitine ligasi E3, CRBN (cereblon) e VHL (proteina Von Hippel-Lindau) sono le più comunemente impiegate, grazie a relazioni struttura-attività ben caratterizzate, buona stabilità chimica e facilità di sintesi.

La tecnologia PROTAC agisce tramite il sistema ubiquitina-proteasoma, costituito da tre principali componenti: il proteosoma 26S, le ligasi dell'ubiquitina e un ampio repertorio di enzimi de-ubiquitinanti (DUB) [Figura 2].

Il processo di marcatura delle proteine destinate alla degradazione, chiamato ubiquitinazione, è mediato in maniera sequenziale da tre enzimi: E1, E2 ed E3. In una prima fase, l'enzima E1 (enzima attivante l'ubiquitina) lega e attiva l'ubiquitina in modo ATP-dipendente. Successivamente, l'ubiquitina viene trasferita all'enzima E2 (enzima coniugante dell'ubiquitina). Nella fase finale, una ligasi E3 riconosce specificamente la proteina substrato e catalizza il trasferimento dell'ubiquitina da E2 a un residuo di lisina del substrato stesso. La ripetizione ciclica di questo processo determina la formazione di catene di poliubiquitina, che fungono da segnale per il riconoscimento da parte del proteasoma 26S. Il substrato poliubiquitinato viene quindi indirizzato al proteasoma, dove subisce la degradazione proteolitica. Al termine del processo, le molecole di ubiquitina vengono rilasciate e riciclate, potendo essere nuovamente attivate da E1 per avviare ulteriori cicli di ubiquitinazione.

In questo contesto, i PROTAC favoriscono il reclutamento delle ligasi E3 verso proteine bersaglio specifiche, inducendone l'ubiquitinazione e la degradazione proteasomica [52].



**Figura 2** Il meccanismo della degradazione proteasomica [54].

Il primo PROTAC entrato in sperimentazione clinica nel 2019 e conosciuto come ARV-110 (bavdegalutamide), è stato sviluppato per il trattamento del carcinoma prostatico resistente alla castrazione [50]. Il composto più avanzato è però ARV-471 (vepedegestrant), un PROTAC orale progettato per indurre la degradazione selettiva del recettore degli estrogeni mediante il reclutamento dell'E3 ligasi CRBN. ARV-471 ha dimostrato buoni risultati nel ridurre i livelli di ER, un buon profilo di sicurezza e una significativa attività antitumorale in pazienti affette da carcinoma mammario. Attualmente ARV-471 è in studio clinico di fase III in cui ha dimostrato una buona efficacia sui mutanti a paragone dell'inibitore di riferimento fulvestrant ma non nei wild-type per cui si pensa verrà approvato come trattamento limitato ai mutanti ESR1 [53].

Il gruppo di Sheng ha progettato il primo PROTAC della NAMPT, PROTAC A7, e hanno dimostrato che questa tecnologia è in grado di degradare efficacemente sia iNAMPT che eNAMPT nelle cellule CT26 e MC38 (linee cellulari murine di carcinoma coloretto) in vitro, esercitando una forte attività antitumorale e riducendo il reclutamento di cellule soppressive derivate dai mieloidi (MDSC). Questo primo PROTAC è caratterizzato dal ligando NAMPT derivato da MS7, un potente inibitore NAMPT,

che è stato coniugato a un ligando peptidico della VHL mediante linker alifatici di diversa lunghezza [54]. Un anno dopo, lo stesso gruppo ha sviluppato PROTAC B3, caratterizzato anch'esso dal ligando VHL ma con un inibitore diverso, MS0 [55]. PROTAC B3 ha efficacemente indotto la degradazione della NAMPT in modo dipendente dalla concentrazione e dal tempo, ha ridotto la proliferazione delle cellule di carcinoma ovarico epiteliale (EOC) e ha mostrato un'adeguata esposizione sistemica dopo somministrazione endovenosa, inibendo la crescita tumorale in modelli di xenotrapianto, senza evidenza di tossicità [54, 55]. Rispetto ad A7, B3 mostra una selettività verso il bersaglio differente e un'efficacia antiproliferativa superiore nei modelli di EOC [55].

Recentemente, a partire dal PROTAC B3 si è sviluppato VHL-PS-PROTAC B3, una variante foto-commutabile ottenuta inserendo nel linker un'unità sensibile alla luce. Tale PROTAC dimostra versatilità, adottando sia una conformazione trans che cis durante l'irradiazione con specifiche lunghezze d'onda, questo consente di aumentare o ridurre i livelli di NAMPT e NAD<sup>+</sup> in modo dipendente dalla luce. In una delle conformazioni, il PROTAC promuove l'avvicinamento tra la proteina bersaglio e la ligasi E3, facilitando l'ubiquitinazione e la successiva degradazione proteasomica, nell'altra conformazione, invece, la formazione del complesso ternario risulta compromessa, con una conseguente riduzione o abolizione della degradazione. Questa modulazione consente un controllo spaziotemporale dell'azione dei PROTAC e può contribuire a limitare la tossicità rispetto agli inibitori convenzionali di NAMPT. In questo contesto, è stato dimostrato che il VHL-PS-PROTAC B3 conserva la capacità di indurre la degradazione del bersaglio e di inibire la crescita tumorale in seguito a somministrazione endovenosa in un modello xenotrapiantato di carcinoma ovarico [56]. Tale esempio sottolinea come strategie di funzionalizzazione mirata possano migliorare e regolare le proprietà farmacologiche.

Altri PROTAC, come PROTAC-11 (630120) e PROTAC-12 (630121), progettati tramite la relazione struttura-attività e sfruttando la ligasi E3 CRBN, hanno dimostrato un'ottima degradazione di NAMPT in varie linee cellulari di carcinoma coloretale, mammario ed ematologico [57]. In vitro, questi composti hanno mostrato effetti citotossici migliori rispetto a FK866, grazie alla soppressione delle vie di segnalazione NF- $\kappa$ B e MAPK-Erk. Tuttavia, le limitazioni farmacocinetiche e i profili di tossicità sono rimasti paragonabili a quelli degli inibitori già esistenti [58]. Al fine di aumentare la selettività ed efficacia, è stato sviluppato il "drugtamero" AS-2F-NP, un composto attivabile selettivamente dal glutatione presente nel TME. La molecola integra un aptamero per il targeting cellulare, nucleotidi di fluorouridina e un PROTAC diretto contro NAMPT. Studi hanno evidenziato

che la fluorouridina agisce in sinergia con FK866, amplificando l'effetto antitumorale complessivo [59].

Oltre alla degradazione proteasomica, NAMPT può essere eliminata tramite la via lisosomiale. A tal fine, sono stati sviluppati dei composti per utilizzare l'autofagosoma (ATTEC) e degradare iNAMPT. Il primo è stato creato da Sheng collegando un ligando LC3 (proteina chiave per la formazione e il trasporto degli autofagosomi) a un inibitore NAMPT derivato da MS2, inducendo la degradazione selettiva di NAMPT in modelli di cancro ovarico [60].

Nonostante le numerose evidenze promettenti, i PROTAC presentano alcune limitazioni. La loro efficacia è strettamente dipendente dalla formazione del complesso ternario stabile tra la POI, il PROTAC e la ligasi E3 reclutata, processo che può essere influenzato dalla compatibilità strutturale e spaziale di tutti i componenti. Inoltre, il loro peso molecolare elevato influenza le proprietà farmacocinetiche, limitando la biodisponibilità orale e la permeabilità cellulare. Tra le limitazioni vi è anche la dipendenza dell'espressione specifica della ligasi E3 e l'insorgenza del cosiddetto "Hook effect", un fenomeno paradossale per cui concentrazioni eccessive del composto riducono l'efficacia della degradazione, a causa della saturazione della POI e della ligasi E3 e alla conseguente formazione di complessi binari non produttivi che ostacolano il complesso ternario funzionale [50].

Per superare tali problemi e migliorare l'efficienza, la selettività e le proprietà farmacologiche sono fondamentali strategie di funzionalizzazione. Ad esempio, l'utilizzo di ligasi E3 alternative per bypassare la resistenza causata da bassa espressione o mutazioni, lo sviluppo di linker più flessibili per favorire l'interazione sia con il bersaglio che con la ligasi E3. Inoltre, l'ottimizzazione dei ligandi diretti al bersaglio è cruciale, poiché consente di incrementare l'affinità di legame, migliorare la specificità e limitare gli effetti off-target [61]. Per ridurre la tossicità sistemica, si è intrapresa la funzionalizzazione con gruppi sensibili a stimoli attivati dal microambiente tumorale, ad esempio unità a base di glutatione, consentendo un'attivazione selettiva nelle cellule tumorali e un controllo spaziotemporale dell'attività terapeutica [62].

## HyTAG

Alla luce delle limitazioni associate ai PROTAC, sono state sviluppate delle potenziali strategie di degradazione alternative. Una promettente tecnologia terapeutica per la TPD, a lungo sottovalutata è il *tagging* idrofobico (HyT). Rispetto ai PROTAC, l'HyT presenta diversi vantaggi, tra cui un peso molecolare inferiore, l'assenza del rischio di effetti teratogeni associati a ligandi derivati dalla talidomide come CRBN, e un meccanismo indipendente dal reclutamento di specifiche ligasi E3. Quest'ultima caratteristica rende l'HyT particolarmente promettente in contesti in cui l'espressione o la funzionalità delle ligasi E3 risulti compromessa [63, 64].

Il *tagging* idrofobico sfrutta i meccanismi endogeni di controllo qualità cellulare, in particolare, mediante l'esposizione di regioni idrofobiche sulla superficie della proteina bersaglio, l'HyT mima uno stato di proteina mal ripiegata. Conseguentemente, la cellula attiva i sistemi deputati alla sorveglianza proteica, la *unfolded protein response* (UPR), che favorisce il reclutamento di chaperoni molecolari e il successivo indirizzamento alla degradazione proteasomica [65]. A livello strutturale, una classica molecola HyT presenta due componenti, un peptide identificativo o un ligando chimico che si lega selettivamente alla POI e un tag idrofobico che simula la conformazione mal ripiegata della proteina [63, 66]. Ad oggi, solo un numero limitato di tag idrofobici è stato identificato e utilizzato con successo nello sviluppo di degradatori HyT, ad esempio adamantano, fluorene e pirene [63].

Recenti studi riportano la progettazione dei primi degradatori NAMPT basati sulla strategia HyT. Tra questi composti, NH-11 è emerso come il più efficace, mostrando una degradazione selettiva di NAMPT mediata dal sistema ubiquitina–proteasoma nelle cellule leucemiche, in particolare nelle linee K562 e HL60. Questa attività si è tradotta in una marcata induzione dell'apoptosi con arresto del ciclo cellulare e da una potente inibizione della proliferazione. È importante sottolineare che NH-11 non ha mostrato effetti citotossici significativi nelle cellule normali, evidenziando così un profilo di selettività favorevole.

Nel complesso, il *tagging* idrofobico potrebbe rappresentare una valida strategia alternativa per la degradazione di NAMPT, aprendo nuove prospettive per gli sviluppi futuri. In questo contesto, ulteriori studi sono attualmente in corso per migliorarne l'efficacia e la selettività [66].

#### 1.4.4 MODULAZIONE FARMACOLOGICA DI eNAMPT

Oltre alle strategie dirette contro iNAMPT, sono stati sviluppati anticorpi neutralizzanti al fine di bloccare l'attività citochina-simile di eNAMPT. Neutralizzare eNAMPT costituisce una strategia promettente per inibire le sue azioni pro-tumorali, senza compromettere le funzioni metaboliche essenziali regolate da iNAMPT [67]. L'anticorpo contro eNAMPT più avanzato è ALT-100, un anticorpo monoclonale umanizzato sviluppato dal gruppo di Garcia. Questo anticorpo ha mostrato un'azione efficace nel ridurre la fibrosi polmonare infiammatoria in modelli murini e suini [68, 69], nel migliorare l'ipertensione polmonare nei ratti [67] e nel mitigare la fibrosi polmonare indotta da radiazioni nei topi [70]. Inoltre, ALT-100 ha dimostrato di inibire la proliferazione, l'invasione e le metastasi delle cellule di carcinoma prostatico [71]. ALT-100 ha completato uno studio di fase I sull'uomo volto a valutarne la sicurezza, la tollerabilità e il profilo farmacocinetico/farmacodinamico in volontari sani (NCT05426746). Attualmente, un trial clinico di fase IIa sta indagando efficacia e sicurezza di ALT-100 in pazienti con sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) di grado moderato-grave.

Un altro anticorpo neutralizzante eNAMPT di particolare rilievo è C269, che ha mostrato efficacia sia in contesti infiammatori sia oncologici nei modelli preclinici. Nei topi con colite indotta chimicamente tramite acido dinitrobenzene solfonico (DNBS) o solfato di sodio destrano (DSS), C269 ha ridotto in modo significativo l'infiltrazione di cellule immunitarie nella lamina propria intestinale, inclusi monociti, neutrofili, linfociti T helper (Th1) e linfociti T citotossici CD8<sup>+</sup>. Successivamente, Travelli e colleghi (2023) hanno evidenziato che C269 riduce la crescita tumorale e la diffusione metastatica in modelli murini di carcinoma mammario (linee cellulari 4T1 ed E0771), promuovendo l'attivazione delle cellule T CD8<sup>+</sup>INF $\gamma$ <sup>+</sup>GrzB<sup>+</sup> e invertendo il fenotipo immunosoppressivo delle cellule T regolatorie (Treg) [72].

Sebbene i risultati preclinici siano promettenti, permangono ancora diverse criticità. In primo luogo, la caratterizzazione incompleta dei recettori e dei meccanismi molecolari di eNAMPT limita il targeting farmacologico, inoltre la sua natura pleiotropica solleva potenziali problematiche relative al rischio di effetti avversi indesiderati. Infine, rimane aperta la necessità di identificare biomarcatori affidabili, fondamentali per una corretta stratificazione dei pazienti e per prevedere la risposta terapeutica agli approcci anti-eNAMPT [25, 30].

## 2.0 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo centrale di questo progetto di tesi è la caratterizzazione e la validazione biologica di una nuova classe di molecole conosciute come *proteolysis-targeting chimeras* (PROTAC) dirette contro la nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT).

Il laboratorio in cui ho svolto la tesi ha sviluppato una libreria di 42 composti, nuovi PROTAC anti-NAMPT costruiti a partire dall'inibitore classico MV78 come *warhead*.

Il presente lavoro intende valutare l'attività antitumorale in modelli di carcinoma mammario del PROTAC più promettente, U42, un degradatore ottimizzato che recluta la ligasi E3 VHL. U42, infatti, è stato ottimizzato per avere un gruppo metile sul ligando per VHL, che ne dovrebbe aumentare la potenza sia sull'attività di degradazione che, di conseguenza, di citotossicità. L'obiettivo principale è, quindi, dimostrare il meccanismo d'azione, la potenza di degradazione e l'efficacia citotossica di U42 come degradatore di NAMPT.

Nello specifico, la tesi si propone di i) validare la formazione del complesso ternario NAMPT-U42-VHL mediante saggi di competizione e *Cellular Thermal Shift Assay* (CETSA), ii) valutare la capacità di degradare selettivamente la forma intracellulare di NAMPT (iNAMPT) in linee cellulari MCF7 e 4T1 e di iii) analizzare gli effetti sulla vitalità cellulare. Inoltre, iv) viene indagata la capacità di U42 di ridurre i livelli di NAMPT extracellulare (eNAMPT), per valutare l'impatto della degradazione proteica anche sulle funzioni non enzimatiche della proteina.

L'efficacia biologica del composto viene infine testata, oltre che in modelli bidimensionali, anche in colture tridimensionali di mammosfere, fisiologicamente più rilevanti per lo studio di tumorigenicità, con l'obiettivo di dimostrare come l'approccio PROTAC consenta di superare i limiti degli inibitori classici a piccola molecola, degradando la proteina e bloccandone sia le funzioni enzimatiche che non enzimatiche.

### 3.0 RISULTATI E DISCUSSIONE

I PROTAC promuovono la formazione di un complesso ternario tra la proteina bersaglio (POI) e la ligasi E3, inducendo la degradazione tramite il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS).

Per la progettazione razionale di PROTAC anti-NAMPT, l'inibitore noto MV78 (7) (**Figura 1A**) è stato selezionato come inibitore NAMPT, grazie alla sua potente attività inibitoria e alla sua buona stabilità metabolica *in vitro* [72]. Il reclutamento delle ligasi E3, invece, è stato ottenuto mediante l'utilizzo di lenalidomide (9) per CRBN e un ligando contenente idrossiprolina (10) per VHL (**Figura 1A**). Tali ligandi sono stati selezionati in quanto CRBN e VHL rappresentano le ligasi E3 meglio caratterizzate nella degradazione mirata delle proteine. VHL e CRBN sono, infatti, ampiamente espresse a livello cellulare, i ligandi sono ben conosciuti, e sono presenti solide evidenze precliniche e cliniche.

Il gruppo di chimica farmaceutica del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, diretto dalla Prof.ssa Ubaldina Galli e dalla Prof.ssa Tracey Pirali, ha condotto uno studio che mette in relazione struttura e attività (SAR) per valutare come la scelta delle ligasi E3 (CRBN vs. VHL), così come la lunghezza e la composizione del linker, influenzino l'efficienza della degradazione proteica, con particolare attenzione alla presenza del triazolo nel linker. Il gruppo di chimica farmaceutica ha sintetizzato complessivamente 42 PROTAC anti-NAMPT.

Inizialmente è stata esplorata una serie di linker di diverse lunghezze a base di alcani e polietilenglicole (PEG), contenenti un'unità 1,2,3-triazolo (**Figura 1A**), al fine di sfruttare la robustezza di questo anello, noto per resistere all'idrolisi, all'ossidazione e alla degradazione metabolica. Lo screening di questa prima selezione di PROTAC su MCF7, linea cellulare di carcinoma mammario umano positivo per il recettore degli estrogeni, non ha evidenziato una riduzione significativa dei livelli proteici di NAMPT, sebbene alcune molecole abbiano mostrato effetti citotossici, suggerendo come la loro attività sia probabilmente dovuta all'inibizione enzimatica piuttosto che alla degradazione mirata della proteina.

La successiva eliminazione del gruppo triazolico nel linker, introdotta nella seconda serie di PROTAC, ha portato ad un miglioramento dell'efficienza di degradazione dei composti. In particolare, tra i derivati privi del gruppo triazolo, U23 e U31 si sono dimostrati potenti agenti citotossici ed efficaci degradatori di NAMPT.

Al fine di valutare la capacità di U23 e U31 di indurre la degradazione di iNAMPT e di determinare l'attività citotossica, sono stati condotti degli esperimenti di dose-risposta su cellule MCF7 e su un clone più invasivo e aggressivo delle cellule di carcinoma mammario murino triplo negativo 4T1 (4T1 cl5) [73]. Le cellule sono state trattate con concentrazioni comprese tra 30 nM e 3  $\mu$ M per 18 ore e successivamente è stata misurata la degradazione di NAMPT. Entrambi i composti hanno mostrato Hook effect a concentrazioni superiore a 1  $\mu$ M.

I valori di  $DC_{50}$  di U23 e U31 (**Figura 1B**) corrispondono a 171 nM e 107 nM nelle cellule MCF7 e di 500 nM e 350 nM nelle cellule 4T1. Nel contesto della degradazione mirata delle proteine,  $DC_{50}$  (concentrazione di degradazione 50) rappresenta la concentrazione necessaria per ridurre del 50% i livelli di una proteina target in un determinato sistema cellulare. È determinata sperimentalmente trattando le cellule con concentrazioni crescenti del composto per un periodo di tempo fisso, seguito dalla quantificazione dei livelli di proteina rimanenti tramite tecniche di Western Blot. I dati vengono successivamente normalizzati e tracciati al fine di generare una curva dose-risposta.

Inoltre, sia U23 che U31 hanno un'attività citotossica minore rispetto a MV78 ( $IC_{50}$  di  $7.0 \pm 0.02$  nM in MCF7 e di  $9.6 \pm 0.03$  nM in 4T1, **Figura 1B**). I valori di  $IC_{50}$  nelle cellule MCF7 sono di  $1.03 \pm 0.06$   $\mu$ M per U23 e  $550 \pm 0.04$  nM per U31, mentre nelle cellule 4T1  $1.5 \pm 0.94$   $\mu$ M per U23 e  $687 \pm 0.03$  nM per U31 (**Figura 1B**). L'  $IC_{50}$  (concentrazione inibitoria 50), invece, è la concentrazione necessaria a ridurre del 50% l'attività biologica di un target molecolare, rispetto a una condizione di controllo, ed è utilizzata come parametro di riferimento per valutare la potenza inibitoria di un composto.

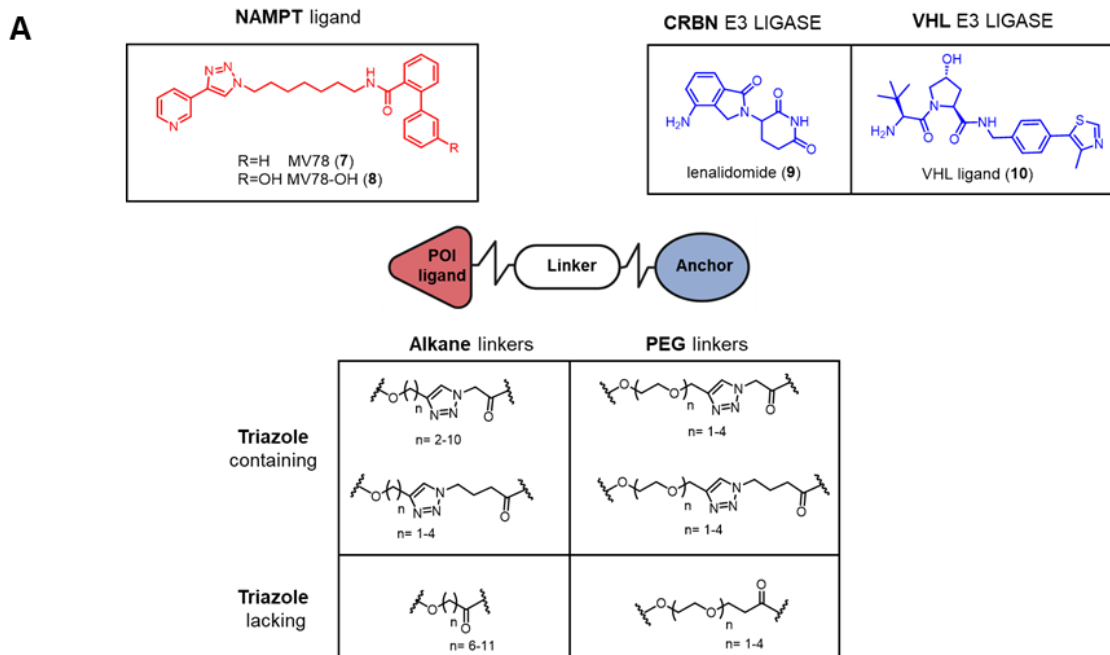
Questi risultati hanno evidenziato U31 come il miglior PROTAC anti-NAMPT sia in termini di citotossicità che di degradazione.

Con l'obiettivo di verificare il coinvolgimento del sistema ubiquitina-proteasoma nel meccanismo d'azione dei PROTAC sviluppati, il composto U31 è stato valutato in presenza e in assenza dell'inibitore del proteasoma bortezomib (300 nM) nelle cellule MCF7 e 4T1. In entrambe le linee cellulari, l'inibizione del proteasoma ha impedito la degradazione di NAMPT mediata da U31, confermando così la nostra ipotesi (**Figura 1C-D**).

Un'ulteriore ottimizzazione del miglior composto, U31, è stata guidata da dati di letteratura che indicano come l'introduzione stereoselettiva di un gruppo (S)-metilico in posizione benzilica nel ligando per VHL (10) possa aumentare significativamente l'affinità per la ligasi E3 [75]. Sulla base di queste evidenze, è stato progettato U42, derivato metilato di U31.

L'analisi delle curve dose-risposta (30 nM-1  $\mu$ M) ha confermato il miglioramento dell'efficienza di degradazione, evidenziando una maggiore potenza di U42 rispetto a U31 nel degradare NAMPT. In particolare, U42 ha mostrato valori di  $DC_{50}$  pari a 45 nM nelle cellule MCF7 e a 55 nM nelle cellule 4T1 (**Figura 1B**). Coerentemente, il composto ha anche dimostrato una superiore attività citotossica, con valori di  $IC_{50}$  di  $110 \pm 0,01$  nM nelle cellule MCF7 e di  $157 \pm 0,04$  nM nelle cellule 4T1 (**Figura 1B**).

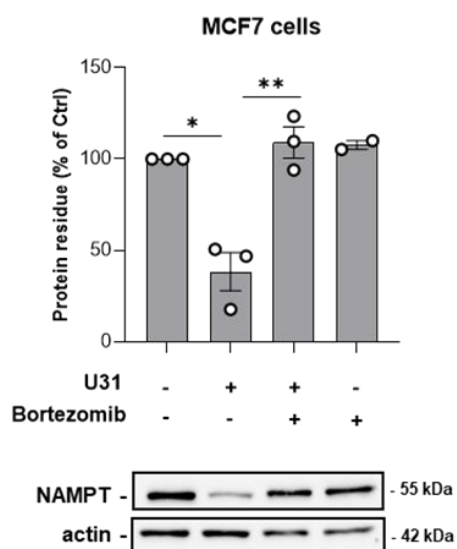
Nel complesso, questi dati indicano che i linker contenenti triazolo compromettono la degradazione di NAMPT, probabilmente a causa dell'eccessiva rigidità imposta che limita la stabilizzazione del complesso ternario.



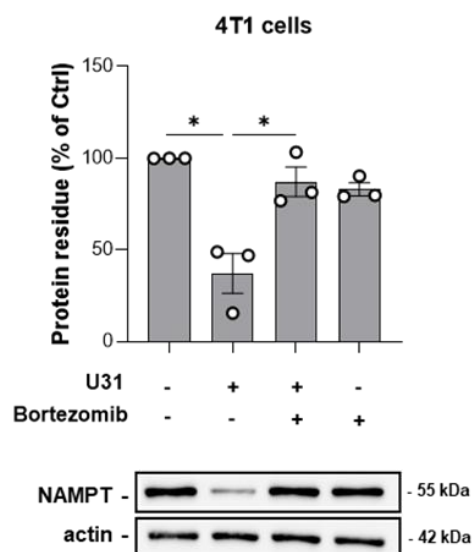
**B**

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

**C**



**D**



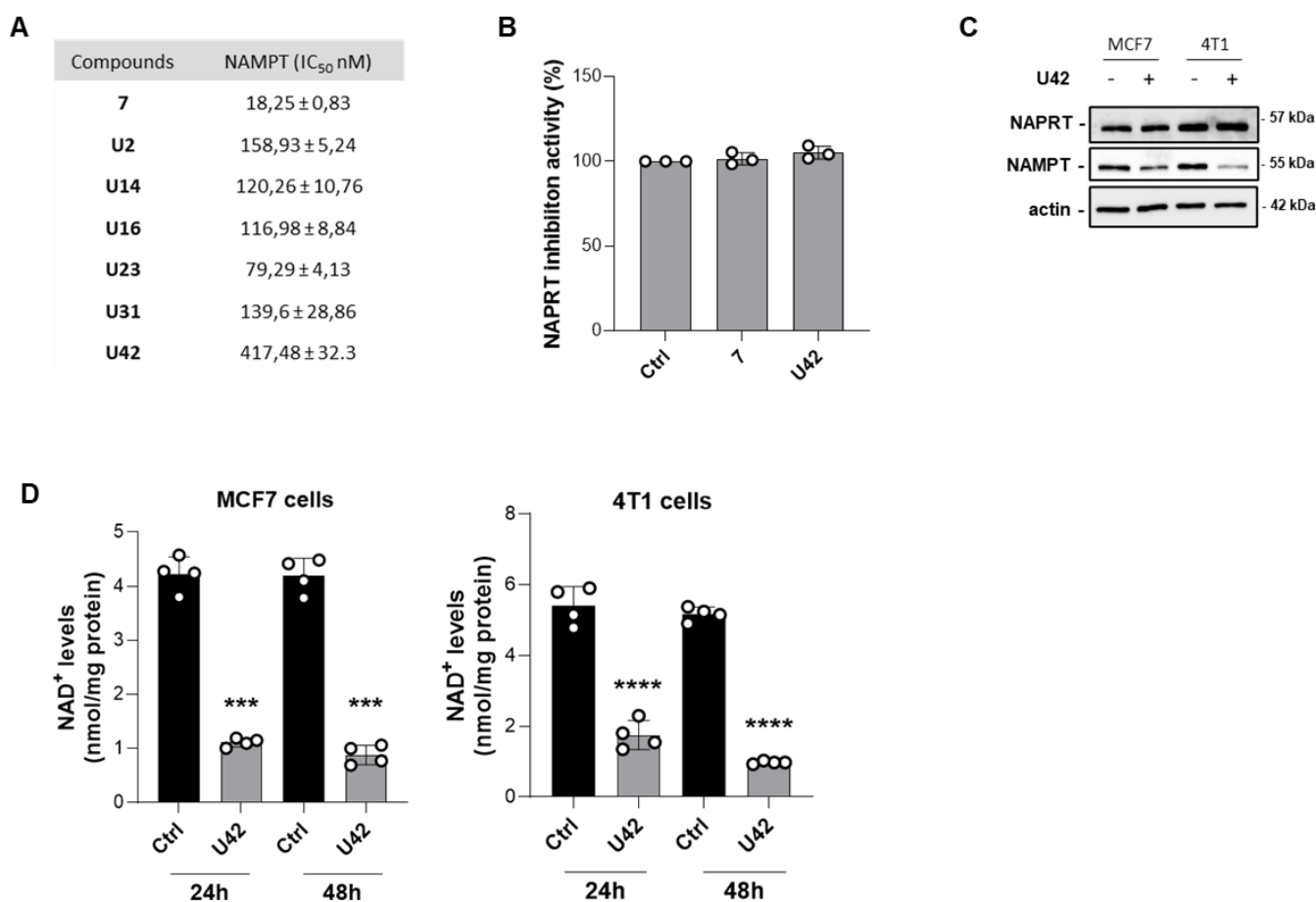
**Figura 1** (A) Strategia di progettazione dei PROTAC anti-NAMPT basati su MV78. (B) Screening dei farmaci basato su: 1) vitalità cellulare valutata mediante saggio MTT dopo 72 ore su cellule MCF7 e 4T1 trattate con il composto 7 e U23, U31, U42, utilizzati a concentrazioni comprese tra 30 nM e 3 µM 2) analisi Western blot eseguita dopo 18 ore su cellule MCF7 e 4T1 trattate con il composto 7 e U23, U31 e U42, utilizzati a concentrazioni comprese tra 30 nM e 3 µM. n.d. = non determinato. Immagine rappresentativa e quantificazione della degradazione di NAMPT sia nelle cellule MCF7 (C) che 4T1 (D) trattate rispettivamente per 18 ore con U31 (300 nM), bortezomib (300 nM) o la combinazione dei due. Media ± SEM di 3 esperimenti indipendenti. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  mediante test t parametrico non accoppiato.

Successivamente, per confermare che l'attività biologica del nostro miglior PROTAC fosse attribuibile a una specifica inibizione di NAMPT, abbiamo valutato l'attività inibitoria di U42 su NAMPT ricombinante mediante un saggio enzimatico accoppiato. Questo saggio biochimico è stato svolto dal Prof. Giuseppe Orsomando in collaborazione con il mio laboratorio. A scopo comparativo, sono stati inoltre inclusi in questo studio alcuni PROTAC rappresentativi della serie: U2, U16, U14, U23 e U31. U23, U31 e U42 hanno linker di lunghezza simile agli altri PROTAC analizzati ma sono privi di triazolo e sono in grado di reclutare VHL. Tutti questi composti hanno evidenziato una potenza inibitoria nel range nanomolare nei confronti di NAMPT ricombinante (**Figura 2A**), dimostrando, da una parte, che i composti U2, U16, U14 sono citotossici ma senza attività degradatoria inducendo morte cellulare attraverso l'inibizione di NAMPT, dall'altra, che i nostri miglior PROTAC inibiscono efficacemente NAMPT.

NAMPT e il suo enzima "gemello" NAPRT (nicotinato fosforibosiltransferasi) sono enzimi chiave nelle vie di sintesi del NAD<sup>+</sup>. NAMPT catalizza la conversione della nicotinamide in NMN, mentre NAPRT converte l'acido nicotinico mononucleotide da acido nicotinico, rappresentando percorsi paralleli e complementari per il mantenimento dei livelli cellulari di NAD<sup>+</sup>. Considerato questo tipo di correlazione tra NAMPT e NAPRT abbiamo verificato se U42 potesse esercitare effetti off-target su NAPRT. In particolare, abbiamo valutato l'attività inibitoria dei composti 7 e U42 su NAPRT ricombinante utilizzando un saggio enzimatico accoppiato, esperimento svolto in collaborazione con il Prof. Giuseppe Orsomando. Come mostrato in **Figura 2B**, nessuno dei due composti ha mostrato attività inibitoria contro NAPRT, nemmeno a concentrazioni elevate, dimostrando che l'attività inibitoria e degradativa è selettiva per NAMPT.

Successivamente, al fine di valutare se questa selettività fosse mantenuta anche nei modelli cellulari, le linee cellulari 4T1 e MCF7 sono state trattate con U42 e i livelli proteici di NAMPT e NAPRT sono stati analizzati tramite western blot. Come mostrato in **Figura 2C**, U42 induce la degradazione di NAMPT senza alterare i livelli di NAPRT in entrambe le linee cellulari.

Essendo NAMPT l'enzima limitante nella via di salvataggio del  $\text{NAD}^+$ , abbiamo misurato se il nostro migliore PROTAC modulasse i livelli di  $\text{NAD}^+$  nelle cellule MCF7 e 4T1 dopo 24 e 48 ore di trattamento con U42 (300 nM). I risultati hanno rivelato una riduzione significativa dei livelli di  $\text{NAD}^+$  in entrambi i tipi cellulari confermando che l'effetto citotossico mostrato è legato alla deplezione di  $\text{NAD}^+$  (**Figura 2D**).

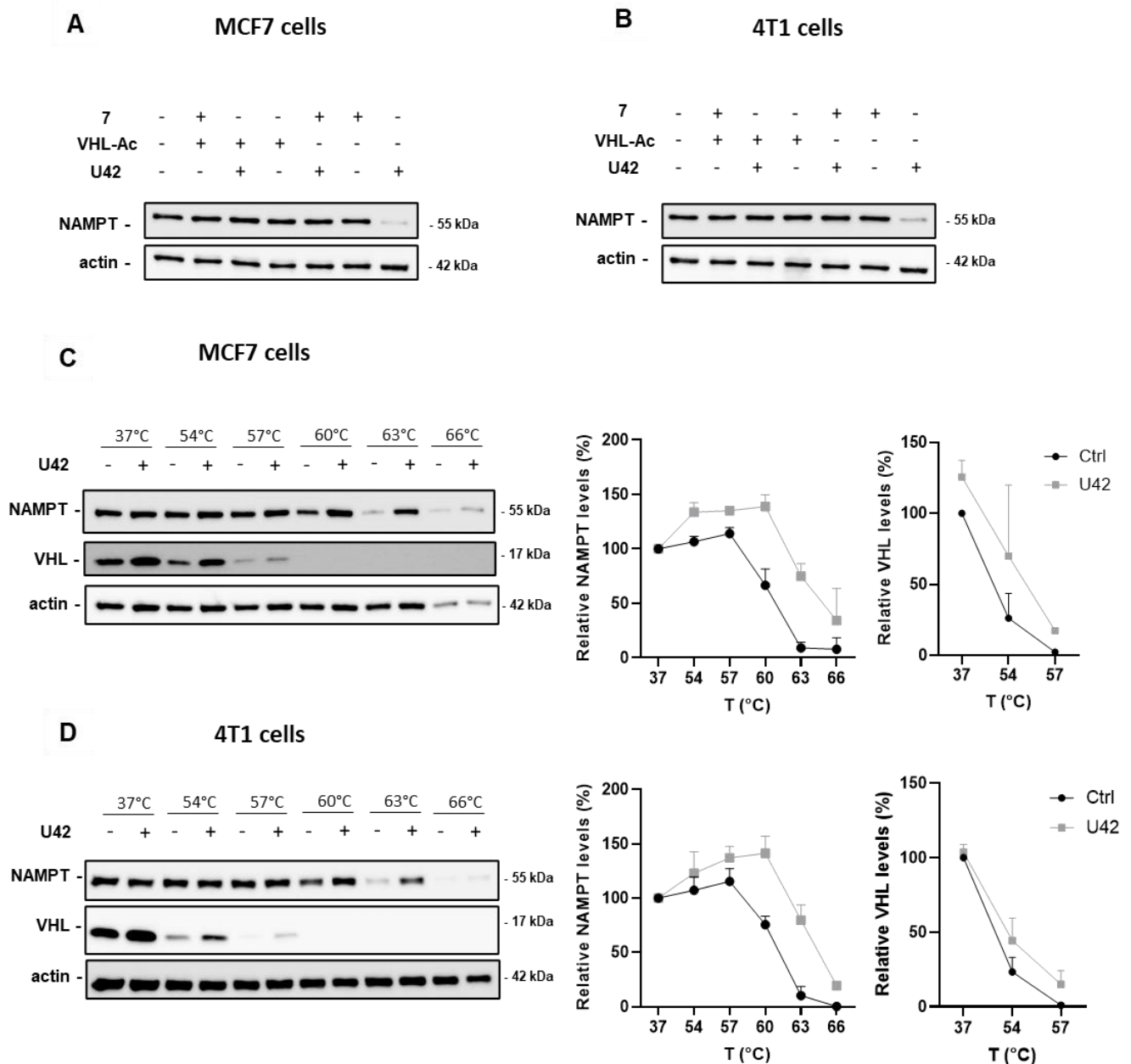


**Figura 2** (A) Attività inibitoria di NAMPT paragonando l'inibitore 7 e i PROTAC più rappresentativi: U2, U14, U16, U23, U31, U42. I dati sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti ± deviazione standard. (B) Attività inibitoria di NAPRT dei composti 7 e U42 (10  $\mu\text{M}$ ); i dati sono riportati come media di tre esperimenti indipendenti. (C) Livelli proteici di NAPRT e NAMPT dopo 18 ore di trattamento con U42 a 300 nM nelle linee cellulari MCF7 e 4T1. (D) Livelli intracellulari di  $\text{NAD}^+$  nelle cellule MCF7 (in alto) e 4T1 (in basso) trattate per 24 e 48 ore con U42 (300 nM). Media ± SEM di 4 esperimenti indipendenti. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  mediante t-test parametrico non accoppiato.

Dopo aver confermato il coinvolgimento diretto dell'inibizione di NAMPT nell'attività di U42, abbiamo indagato il reclutamento del complesso VHL. Tramite un saggio di competizione abbiamo valutato la capacità di degradazione di NAMPT paragonando l'inibitore 7 con un ligando per VHL (VHL-Ac) e il PROTAC U42. Il trattamento delle cellule con il composto 7, VHL-Ac e U42, sia singolarmente che in combinazione, ha dimostrato che solo U42, quando somministrato da solo, è in grado di indurre la degradazione di NAMPT, suggerendo quindi che per indurre la degradazione si deve formare un complesso ternario stabile in modo da avvicinare correttamente la POI e l'E3 ligasi. Questi risultati evidenziano che il reclutamento simultaneo della POI e del VHL è essenziale per l'induzione efficace della degradazione (**Figura 3A-B**).

A ulteriore conferma dei nostri risultati abbiamo usato un saggio CETSA (*Cellular Thermal Shift Assay*) in modo da valutare il legame dell'U42 alla proteina target e alla ligasi direttamente in cellule, sfruttando la variazione di stabilità termica indotta dal complesso ligando-proteina [54]. Questo approccio conferma l'interazione specifica prima della degradazione proteasomica. Come mostrato in **Figura 3C** (cellule MCF7) e **Figura 3D** (cellule 4T1), NAMPT ha mostrato una maggiore stabilità termica nelle cellule trattate con U42 rispetto al controllo, in particolare a temperature superiori a 60°C. In maniera analoga, VHL ha mostrato una stabilità aumentata al trattamento con U42, a temperature superiori a 54°C.

Complessivamente, tali risultati indicano che U42 è in grado di formare un complesso ternario legandosi simultaneamente a NAMPT e a VHL, promuovendo così la degradazione del target tramite UPS.



**Figura 3 (A-B)** Saggio di competizione per la degradazione di NAMPT nelle cellule MCF7 e 4T1, rispettivamente, trattate con l'inibitore NAMPT 7 (1  $\mu$ M) o il ligando VHL-Ac (100  $\mu$ M), seguito dal trattamento con U42 (300 nM) o DMSO per 18 ore. Le immagini rappresentative mostrano i risultati di 2 esperimenti indipendenti. **(C-D)** Livelli di NAMPT e VHL nelle cellule MCF7 e 4T1, rispettivamente, trattate con U42 (10  $\mu$ M) per 5 ore mediante saggio di stabilità termica cellulare (CETSA). Le immagini rappresentative mostrano i risultati di 2 esperimenti indipendenti.

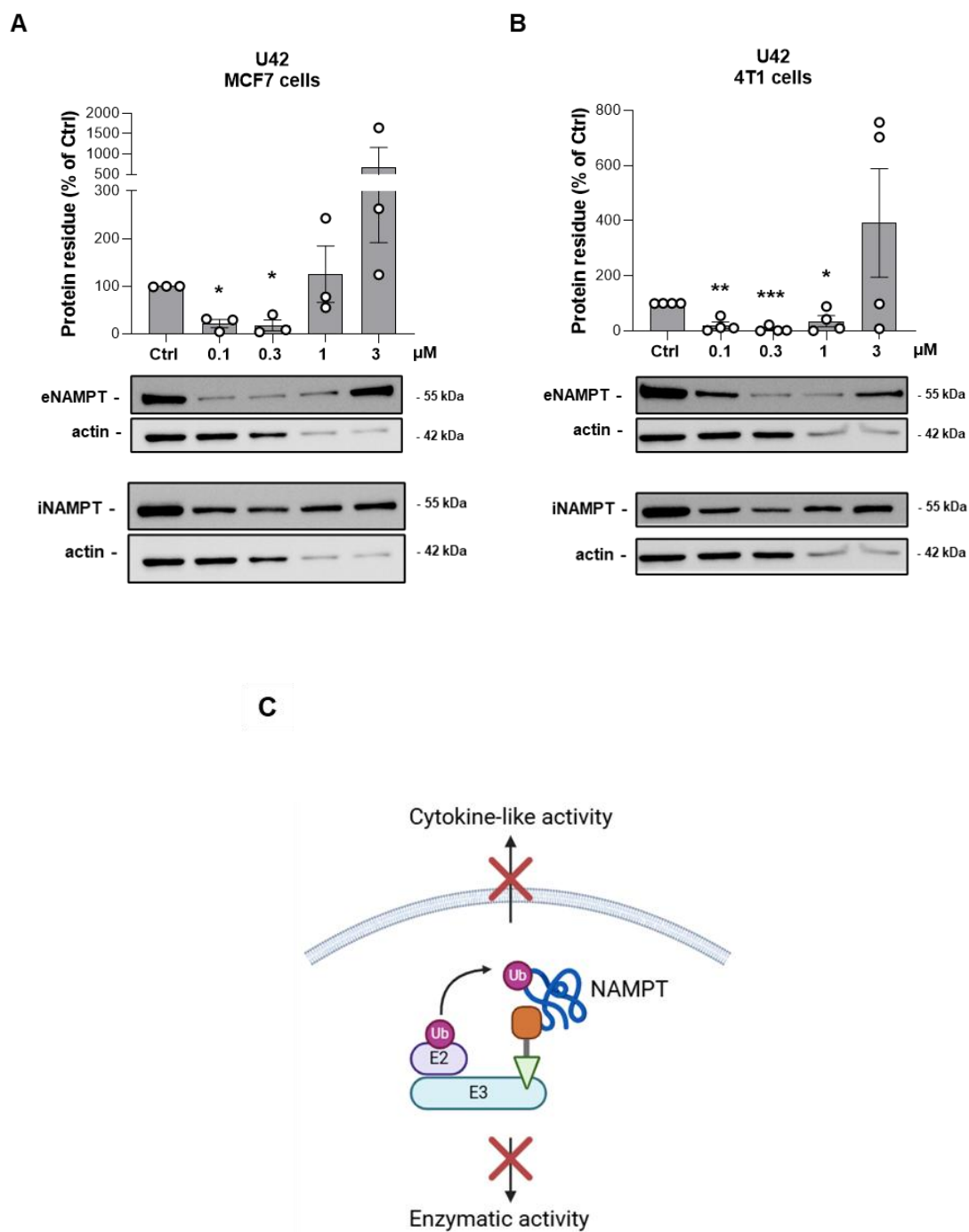
Come già discusso, NAMPT, oltre ad essere un enzima citosolico, agisce anche come citochina extracellulare (eNAMPT), legandosi a specifici recettori presenti sulla membrana plasmatica ed esercitando così i propri effetti biologici. Abbiamo quindi analizzato gli effetti di U42 sui livelli di eNAMPT in entrambe le linee cellulari, al fine di valutare se, inducendo la degradazione di iNAMPT, il composto fosse in grado di modulare anche i livelli di eNAMPT.

In una prima fase, i livelli di eNAMPT sono stati valutati dopo 18 ore di trattamento con U42 in condizioni prive di siero, un intervallo temporale corrispondente ad una efficiente degradazione di iNAMPT. Sorprendentemente, in queste condizioni non è stata osservata alcuna riduzione dei livelli extracellulari di eNAMPT (dati non mostrati). Al contrario, abbiamo notato una tendenza di eNAMPT ad aumentare in seguito al trattamento con U42. Questi risultati dimostrano che una breve esposizione al composto non è sufficiente per favorire una efficiente riduzione di eNAMPT.

Inoltre, l'aumento transitorio di eNAMPT dopo 18 ore di trattamento con U42 potrebbe riflettere una risposta compensatoria indotta dallo stress cellulare conseguente alla deplezione di iNAMPT. La cinetica del rilascio di eNAMPT sembra dipendere sia dalla velocità di degradazione intracellulare sia dall'attivazione di vie secretorie stress-dipendenti e anche dal tipo cellulare.

In uno studio precedente, Liu et al. hanno progettato degradatori derivati da FK866 con l'obiettivo di interferire selettivamente con le funzioni non enzimatiche di NAMPT. In tale studio, cellule di carcinoma ovarico e del colon sono state trattate per 24 ore, seguite da un lavaggio e da un'ulteriore incubazione di 24 ore in mezzo privo di siero contenente i composti [74]. Sulla base di questo protocollo, abbiamo trattato le cellule MCF7 e 4T1 con U42 per 18 ore in un medium completo di siero, per poi continuare altre 24 ore di trattamento in un medium privo di siero. In queste condizioni, oltre alla degradazione di iNAMPT, si verifica una degradazione dose-dipendente di eNAMPT (**Figura 4A-B**), con una  $DC_{50}$  di 50 nM, suggerendo che una durata di trattamento più prolungata sia necessaria per ottenere un esaurimento completo della forma extracellulare di NAMPT. Una possibile spiegazione potrebbe essere la presenza di riserve intracellulari di eNAMPT, che dovrebbero essere esaurite prima che si verifichi una riduzione misurabile della frazione extracellulare.

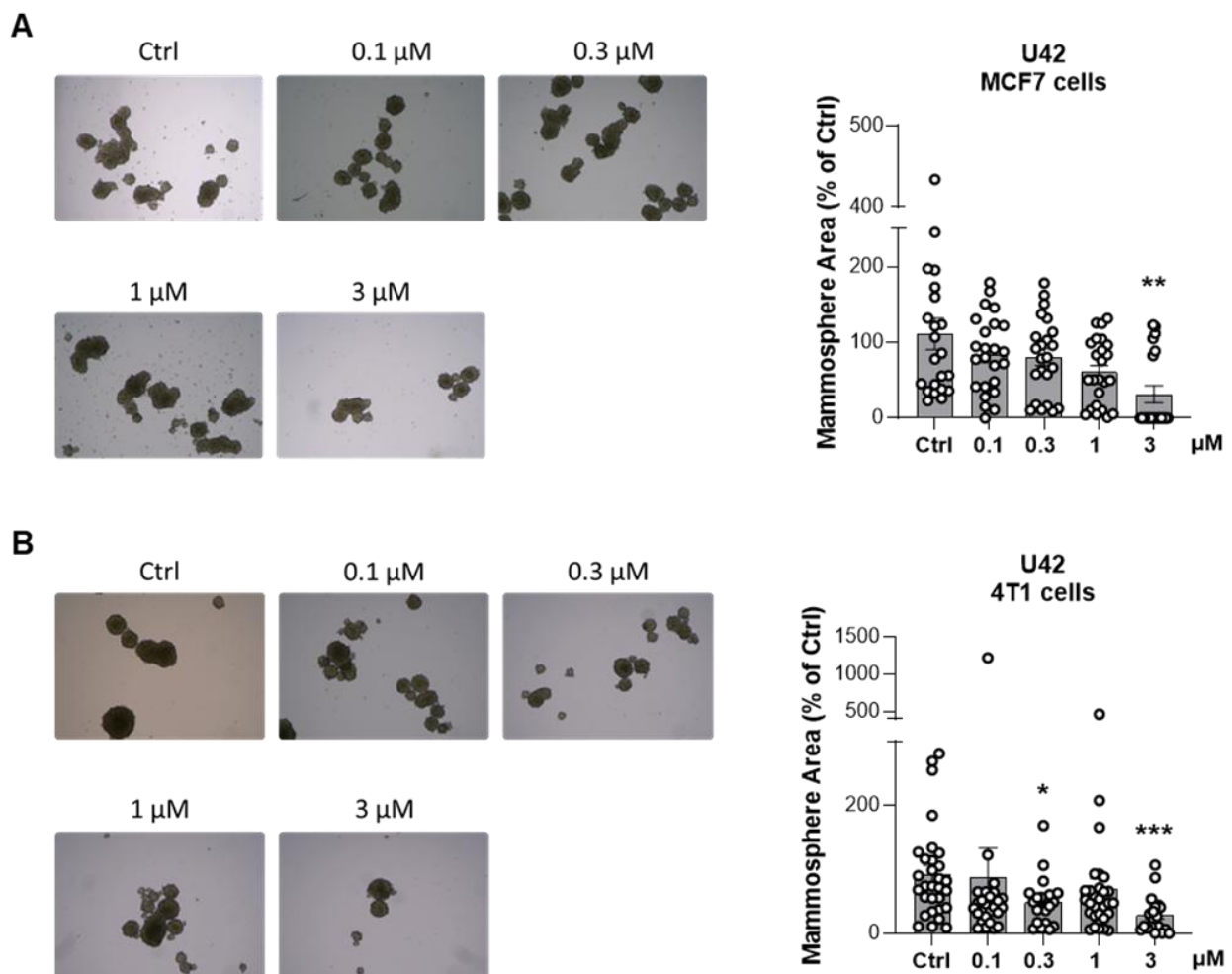
Alla luce di questi risultati, possiamo concludere che U42 non solo induce la degradazione della forma intracellulare di NAMPT (iNAMPT) con conseguente riduzione dei livelli di  $NAD^+$ , ma è anche in grado di modulare i livelli extracellulari di eNAMPT, contribuendo a ridurre gli effetti citochino-mediati (**Figura 4C**).



**Figura 4** Immagine rappresentativa e quantificazioni della degradazione di eNAMPT e iNAMPT sia nelle cellule MCF7 (**A**) sia in 4T1 (**B**) trattate per 18 ore in medium completo e poi trattate di nuovo per 24 ore in condizioni senza siero con una curva di dosaggio 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**) Meccanismo d'azione di U42: degradazione di NAMPT tramite il sistema ubiquitina-proteasoma, con conseguente inibizione dell'attività enzimatica e citochinica.

Infine, abbiamo valutato l'efficacia di U42 nel ridurre la progressione tumorale utilizzando un modello di coltura 3D, basato sulla formazione di mammosfere, modello che riproduce in maniera più fedele rispetto al 2D l'interazione cellulare *in vivo*. Sia le cellule MCF7 che 4T1 sono state seminate su piastre pre-rivestite di polyHEMA (1.2%) e trattate con una curva crescente di U42 per 8 giorni, senza ulteriori aggiunte di composto durante il periodo di coltura. Questo modello tridimensionale consente di valutare la capacità dei PROTAC di inibire il potenziale clonogenico delle cellule tumorali.

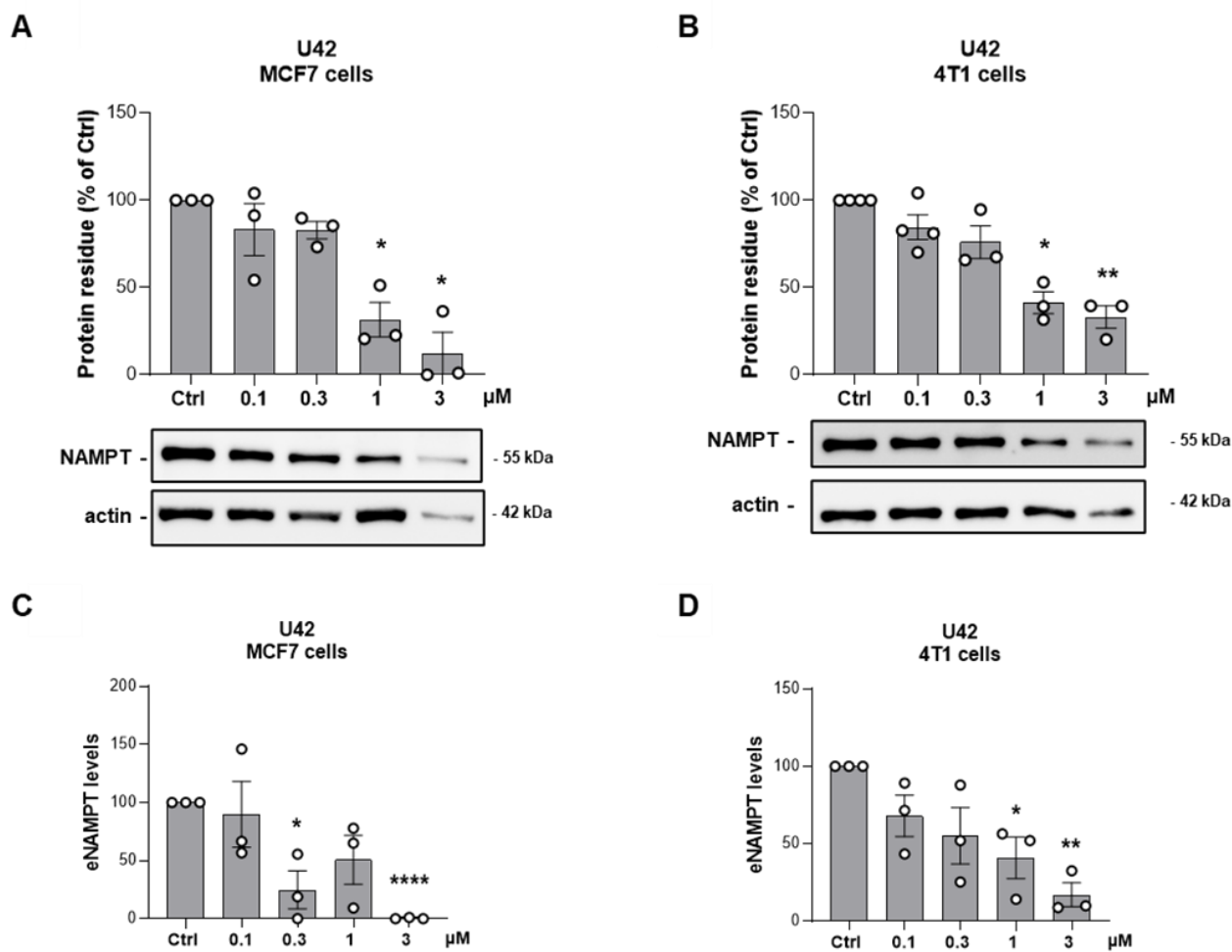
Come mostrato nelle **Figure 5A e 5B**, il trattamento con U42 a 3  $\mu\text{M}$  ha determinato una riduzione del numero e dell'area delle mammosfere nelle linee cellulari MCF7 e 4T1. L'aumento di concentrazione rispetto ai modelli 2D precedentemente descritti è in linea con la crescita delle mammosfere. Essendo infatti le mammosfere strutture 3D la concentrazione di composto, così come avviene in vivo, sarà necessariamente più alta.



**Figura 5** Rappresentazione delle immagini e quantificazione dell'area delle mammosfere nelle cellule MCF7 (A) e 4T1 (B) coltivate su piastre pre-rivestite con polyHEMA e trattate con una curva crescente di U42 per 8 giorni (singolo trattamento al momento della piastratura). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di cinque esperimenti indipendenti. \* $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , test t parametrico non accoppiato.

Inoltre, nelle condizioni precedentemente riportate, U42 ha indotto un'efficace degradazione di NAMPT nelle mammosfere, rinforzando ulteriormente l'ipotesi che la degradazione di NAMPT comprometta la capacità clonogenica e proliferativa delle cellule di carcinoma mammario (**Figura 6A-B**). È rilevante osservare che i livelli di eNAMPT misurati nel terreno di coltura delle mammosfere, dopo 8 giorni hanno evidenziato una riduzione significativa nelle cellule 4T1 e MCF7, come mostrato nelle **Figure 6C e 6D**. I dati sono stati ottenuti calcolando il rapporto tra i livelli di eNAMPT rilevati mediante saggio ELISA e il numero di mammosfere in ciascun esperimento indipendente.

Nel complesso, questi risultati dimostrano che il trattamento con U42 non solo compromette la capacità delle cellule MCF7 e 4T1 di sostenere la formazione di mammosfere, ma induce anche la degradazione sia di iNAMPT sia di eNAMPT, contribuendo così al suo effetto antitumorale.



**Figura 6** Rappresentazione delle immagini e quantificazione densitometrica della degradazione di NAMPT mediante analisi Western blot nelle mammosfere di MCF7 (A) e 4T1 (B). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di tre esperimenti indipendenti. \* $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , test t parametrico non appaiato. Livelli di eNAMPT misurati mediante saggio ELISA nel mezzo di coltura delle mammosfere dopo 8 giorni nelle cellule MCF7 (E) e 4T1 (F), seminate su piastre pre-rivestite con polyHEMA e trattate con una curva di dosi di U42. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di tre esperimenti indipendenti. \* $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , test t parametrico non appaiato.

## 4.0 CONCLUSIONI

Sfruttando un potente inibitore di NAMPT, precedentemente sviluppato dal nostro gruppo di ricerca, è stata progettata, sintetizzata e analizzata in modo completo una nuova classe di PROTAC anti-NAMPT. In particolare, nel corso del presente lavoro di tesi ho indagato in maniera più dettagliata l'attività del PROTAC U42 sia sulla forma intracellulare sia su quella extracellulare di NAMPT in modelli di carcinoma mammario.

Nelle colture bidimensionali classiche, U42 si è dimostrato un potente degradatore in grado di ridurre i livelli sia di iNAMPT che di eNAMPT, inoltre ha mostrato una buona attività antiproliferativa a concentrazioni nell'intervallo nanomolare. Studi meccanicistici, condotti mediante l'inibizione del proteasoma hanno confermato che la degradazione è dipendente dal reclutamento del proteasoma mediato da VHL. Inoltre, tramite saggi di competizione sulla degradazione di NAMPT e saggi termici come il CETSA, abbiamo validato la formazione del complesso ternario tra U42, NAMPT e VHL, dimostrando come il reclutamento simultaneo della POI e della ligasi rappresenta un requisito fondamentale e determinante per l'attività degradativa del PROTAC.

È importante sottolineare che U42 ha mantenuto la sua efficacia nelle colture tridimensionali, dove ha compromesso significativamente la formazione e la dimensione delle mammosfere, promuovendo al contempo la degradazione sia di iNAMPT che di eNAMPT. Questi risultati suggeriscono un potenziale effetto di riduzione della capacità oncogenica delle cellule tumorali.

In questo contesto, U42 si identifica come un promettente degradatore di NAMPT. Come descritto i PROTAC generati, incluso U42, ritengono tutti un'ottima attività inibitoria diretta sull'enzima ricombinante e sono in grado di ridurre i livelli di  $\text{NAD}^+$  intracellulare.

NAMPT è però una proteina ubiquitaria e inibirlo a livello sistemico, sebbene attraverso un PROTAC, porterebbe agli effetti indesiderati già mostrati dagli inibitori classici in clinica.

Per questa ragione, lo sviluppo di PROTAC funzionalizzati e selettivamente indirizzati alla sede tumorale potrebbe aprire nuove prospettive per razionalizzare l'utilizzo in modo controllato di queste molecole, consentendo di sfruttare pienamente i vantaggi dei degradatori proteici in un'ottica di maggiore specificità e sicurezza terapeutica.

## 5.0 MATERIALI E METODI

### COLTURE CELLULARI

La linea cellulare di carcinoma mammario umano MCF7 (ATCC HTB-22) e la linea cellulare murina di carcinoma mammario triplo negativo 4T1cl5 [73] sono state coltivate in Minimum Essential Medium Eagle (MEM; Sigma-Aldrich) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS; Gibco), 1% di glutammina (Sigma-Aldrich) e 1% di penicillina/streptomina (Sigma-Aldrich). Tutte le cellule sono state mantenute a 37 °C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO<sub>2</sub>.

### ANALISI WESTERN BLOT

Un numero pari a  $0,4 \times 10^6$  cellule MCF7 o  $1,5 \times 10^5$  cellule 4T1 cl5 è stato seminato rispettivamente in piastre a 6 o 12 pozzetti e, il giorno successivo alla semina, le cellule sono state esposte a diverse concentrazioni dei composti sintetizzati, come descritto nel testo. Per gli esperimenti riportati in **Figura 1C-D**, il bortezomib (300 nM, Sigma-Aldrich; #5043140001) è stato aggiunto 30 minuti prima del trattamento con l'U31. Per gli esperimenti riportati in **Figura 3A-B**, le cellule sono state trattate un'ora prima con l'inibitore 7 e con il ligando VHL-Ac e successivamente per 18 ore con il composto U42.

Le cellule sono state lisate in RIPA lysis buffer contenente inibitori delle proteasi (PMSF 100 nM, Sigma-Aldrich; PIC, Merck-Millipore) e inibitori delle fosfatasi (NaF 1 M; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 M, Sigma-Aldrich). I lisati sono stati centrifugati a 13.000 rpm per 15 minuti a 4 °C e la concentrazione proteica è stata determinata mediante saggio di Bradford (Sigma-Aldrich). Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e trasferite su membrane di nitrocellulosa utilizzando il sistema TurboBlot (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK).

L'immunoblotting è stato eseguito incubando le membrane con gli anticorpi primari: anticorpo monoclonale murino anti-NAMPT (AdipoGen; Cat# AG-20A-0034, RRID: AB\_2490117), anticorpo monoclonale anti-VHL (Santa Cruz; Cat# sc-135657), anticorpo anti-NAPRT (Proteintech; Cat# 13549-1-AP) e anticorpo monoclonale murino anti-actina (Sigma-Aldrich; #MAB1501), seguiti da anticorpi secondari anti-mouse coniugati con HRP (Bio-Rad Laboratories). I livelli proteici sono stati valutati mediante rilevazione chemiluminescente utilizzando soluzione ECL (Thermo Fisher Scientific). Le immagini rappresentative e gli istogrammi densitometrici sono stati ottenuti da almeno tre esperimenti indipendenti.

## **SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE (MTT)**

Il saggio MTT è un saggio colorimetrico standard comunemente utilizzato per valutare la vitalità cellulare, basato sulla riduzione del sale di tetrazolio MTT a formazano insolubile, da parte delle deidrogenasi mitocondriali di cellule metabolicamente attive.

$1,5 \times 10^4$  MCF7 o  $1,0 \times 10^4$  4T1 cl5 sono state seminate in piastre multiwell da 24 pozzetti. Il giorno successivo alla semina, le cellule sono state trattate con i composti per 72 ore. Dopo l'esposizione ai composti sintetizzati, le cellule sono state lavate con PBS 1X e incubate con 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT; Sigma-Aldrich) in buffer Locke per 1 ora a  $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ . Successivamente, l'isopropanolo-HCl 0,1 M è stato utilizzato per solubilizzare i cristalli di formazano, e l'assorbanza ottica è stata misurata a 570 nm utilizzando un lettore di piastre (Victor3 V, PerkinElmer Life Sciences). I dati riportati sono stati ottenuti da almeno tre esperimenti indipendenti.

## **DETERMINAZIONE DEI LIVELLI INTRACELLULARI DI $\text{NAD}^+$**

I livelli intracellulari di  $\text{NAD}^+$  sono stati determinati nelle cellule MCF7 e 4T1 dopo 24 e 48 ore di trattamento con 300 nM di U42. Inizialmente, le cellule sono state lisate con 150  $\mu\text{L}$  di acido perclorico ( $\text{HClO}_4$ ) 0,4 M. Dopo l'aggiunta di questa soluzione di estrazione, i campioni sono stati sonicati per 3 cicli da 30 secondi ciascuno, a 50 W, con impulsi di 0,5 secondi. Durante la sonicazione, i campioni sono stati mantenuti in ghiaccio per prevenire il surriscaldamento della soluzione. Successivamente, i campioni sono stati centrifugati a 20.000 g per 5 minuti.

Il surnatante è stato trasferito in un'altra microprovetta Eppendorf (1,5 mL) e il suo volume è stato misurato con la massima accuratezza possibile. Successivamente, il campione è stato neutralizzato mediante l'aggiunta di circa 1/8 del volume di carbonato di potassio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) 1 M per ottenere un pH finale compreso tra 5 e 6. L'estratto neutralizzato è stato quindi analizzato dal Prof. Giuseppe Orsomando all'Università di Ancona, mediante HPLC.

Il pellet, invece, è stato risospeso in 100  $\mu\text{L}$  di acido formico all'88%, incubato overnight fino a completa solubilizzazione. Successivamente, il contenuto proteico è stato determinato nella sospensione in acido formico mediante saggio di Bradford. Poiché tutte le misurazioni dei metaboliti sono state normalizzate rispetto al contenuto proteico, tale determinazione è stata eseguita con particolare accuratezza.

## **SAGGIO DI COMPETIZIONE PER LA DEGRADAZIONE DI NAMPT**

Dopo la semina di cellule MCF7 e 4T1 in piastre da 12 pozzetti e una successiva incubazione notturna in MEM completo, le cellule sono state trattate con l'inibitore **7** (1  $\mu$ M) e/o con **VHL-Ac** (300  $\mu$ M). Dopo un'ora di pretrattamento, 300 nM di **U42** sono stati aggiunti alle cellule seguendo lo schema di trattamento rappresentato in **Figura 3 A-B**. Dopo 18 ore, le cellule sono state lisate come descritto sopra e sono stati eseguiti saggi di western blot. I dati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti.

## **CELLULAR THERMAL SHIFT ASSAY (CETSA)**

10<sup>6</sup> cellule MCF7 e 4T1 sono state seminate in piastre Petri da 60 mm e incubate durante la notte. Il giorno successivo, le cellule sono state trattate con DMSO oppure con 10  $\mu$ M di U42 per 5 ore. Dopo 5 ore, le cellule sono state raccolte, lavate due volte con PBS e divise in due aliquote per condizione. Ogni aliquota per gruppo sperimentale in 6 aliquote da 25  $\mu$ L ciascuna. Due aliquote per ogni linea cellulare (controllo e U42-trattate) sono state riscaldate a 37 °C. Le aliquote rimanenti sono state riscaldate alle temperature indicate (54, 57, 60, 63, 66 °C) per 3 minuti. Dopo il riscaldamento, le aliquote sono state immediatamente poste in ghiaccio, quindi è stato aggiunto RIPA lysis buffer in rapporto 1:1. Dopo 30 minuti in ghiaccio, le aliquote sono state sottoposte a due cicli di congelamento rapido (snap-freeze) in azoto liquido. Dopo scongelamento a temperatura ambiente, i campioni sono stati centrifugati a 13.000 rcf per 15 minuti a 4 °C. I surnatanti risultanti sono stati raccolti, miscelati con il tampone di caricamento (loading buffer) e analizzati mediante western blot come descritto sopra. I dati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti.

## **COLTURE DI MAMMOSFERE SU poly-HEMA**

Un totale di  $2 \times 10^3$  cellule è stato seminato in piastre da 6 pozzetti precedentemente rivestite con poly (2-hydroxyethyl methacrylate) [poly-HEMA, 1,2% p/v] (Sigma-Aldrich) sciolto in etanolo al 95%, riscaldato a 60 °C e preparato il giorno precedente su piastre multiwell a 6 pozzetti, al fine di consentirne l'asciugatura durante la notte. Le cellule sono state mantenute per 8 giorni in MEM privo di FBS, supplementato con B27 (Invitrogen™ Life Technologies, CA, USA), basic fibroblast growth factor-2 (bFGF-2, 10 ng/mL; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), epidermal growth factor (EGF, 20

ng/mL; Sigma) ed eparina sodica (0,0004%; Sigma). Al momento della semina, le cellule sono state trattate con una curva dose-dipendente di U42, senza ulteriori trattamenti nel corso dell'esperimento. Le colture sono state mantenute a 37 °C in atmosfera umidificata con 5% di CO<sub>2</sub> per 8 giorni. Al termine dell'esperimento è stata valutata la formazione delle sfere e per acquisire le immagini è stato utilizzato un microscopio invertito (Leica DM IL LED con un ingrandimento di 4x). Per ciascuna condizione sperimentale sono state acquisite almeno cinque immagini per pozzetto, al fine di ottenere una rappresentazione più accurata della coltura. I dati di ciascun replicato sono stati espressi in percentuale rispetto alla media delle immagini di controllo per ciascun esperimento indipendente.

Per il calcolo del numero e dell'area delle mammosfere, è stato utilizzato il software ImageJ, selezionando singolarmente ciascuna mammosfera nelle cinque immagini per ogni condizione sperimentale. Sono stati condotti complessivamente quattro esperimenti indipendenti e i dati sono stati raggruppati e rappresentati in istogrammi. Per l'analisi mediante western blot, le mammosfere sono state raccolte centrifugando il mezzo di coltura a 1.200 rpm per 5 minuti, seguita dalla lisi del pellet. I lisati sono stati quindi quantificati. Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e trasferite su membrane di nitrocellulosa utilizzando il sistema TurboBlot, come descritto sopra per l'analisi di western blot.

## **SAGGI PER IL RILEVAMENTO DI eNAMPT**

### **Western Blot**

Le cellule MCF7 e 4T1 sono state seminate a una concentrazione di  $0,4 \times 10^6$  in piastre da 6 pozzetti. Il giorno successivo, le cellule sono state trattate per 18 ore con una curva dose-dipendente di U42. Dopo questo periodo, le cellule sono state lavate con PBS 1X e coltivate per ulteriori 24 ore in condizioni senza siero, trattando nuovamente con U42. I mezzi di coltura sono stati quindi raccolti e concentrati mediante cut-off tramite centrifugazione a 8000 rcf per 5 minuti [27], questo passaggio è stato ripetuto fino a ottenere il volume finale desiderato. I mezzi concentrati sono stati successivamente caricati per SDS-PAGE come descritto sopra.

### **Saggio ELISA**

Dopo 8 giorni di coltura, le mammosfere sono state raccolte mediante centrifugazione a 1.200 rpm per 5 minuti. I pellet ottenuti sono stati lisati in RIPA lysis buffer, come descritto sopra per il saggio

di western blot. I mezzi di coltura sono stati raccolti e concentrati mediante cut-off (come descritto da Grolla *et al.*). I livelli di eNAMPT sono stati quindi valutati utilizzando un kit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a sandwich disponibile in commercio (AdipoGen Inc., Seul, Corea). Le mammosfere, infatti, non potevano essere private di nutrienti (starvation) come avveniva per le cellule coltivate in condizioni bidimensionali (2D) e, per la valutazione dei livelli di eNAMPT, è stato pertanto utilizzato il saggio ELISA.

I livelli di eNAMPT riportati negli istogrammi sono espressi come rapporto tra i valori di eNAMPT ottenuti dal saggio ELISA e il numero di mammosfere per ciascuna condizione sperimentale. I dati di ciascun singolo esperimento sono stati espressi in percentuale rispetto alla media della condizione di controllo. Infine, sono stati raggruppati tutti i dati provenienti da tre esperimenti indipendenti.

## **ANALISI STATISTICA**

Le rappresentazioni grafiche e le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism, con i dati espressi come media  $\pm$  SEM. Per il confronto tra due campioni (due colonne) è stato utilizzato il t-test parametrico (t-test di Welch) e un valore di  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo. Per confronti multipli è stata utilizzata l'ANOVA a una via (ANOVA di Brown–Forsythe e Welch).

## 6.0 BIBLIOGRAFIA

- [1] Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 25;13(17):4287.
- [2] Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H. Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers (Basel)*. 2022 May 23;14(10):2569.
- [3] Katsura C, Ogunmwonyi I, Kankam HK, Saha S. Breast cancer: presentation, investigation and management. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2022 Feb 2;83(2):1-7.
- [4] Xiong X, Zheng LW, Ding Y, Chen YF, Cai YW, Wang LP, Huang L, Liu CC, Shao ZM, Yu KD. Breast cancer: pathogenesis and treatments. *Signal Transduct Target Ther*. 2025 Feb 19;10(1):49.
- [5] Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*. 2020 Jun 9;22(1):61.
- [6] Kennedy BE, Sharif T, Martell E, Dai C, Kim Y, Lee PW, Gujar SA. NAD<sup>+</sup> salvage pathway in cancer metabolism and therapy. *Pharmacol Res*. 2016 Dec; 114:274-283.
- [7] Mookerjee SA, Gerencser AA, Nicholls DG, Brand MD. Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements. *J Biol Chem*. 2017 Apr 28;292(17):7189-7207.
- [8] Yang J, Shay C, Saba NF, Teng Y. Cancer metabolism and carcinogenesis. *Exp Hematol Oncol*. 2024 Jan 29;13(1):10.
- [9] Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer*. 2021 Oct;21(10):669-680.
- [10] Xie N, Zhang L, Gao W, Huang C, Huber PE, Zhou X, Li C, Shen G, Zou B. NAD<sup>+</sup> metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Oct 7;5(1):227.
- [11] Zhang W, Ren H, Chen W, Hu B, Feng C, Li P, Shi Y, Fang J. Nicotinamide phosphoribosyltransferase in NAD<sup>+</sup> metabolism: physiological and pathophysiological implications. *Cell Death Discov*. 2025 Aug 8;11(1):371.

- [12] Peng A, Li J, Xing J, Yao Y, Niu X, Zhang K. The function of nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT) and its role in diseases. *Front Mol Biosci*. 2024 Oct 24; 11:1480617.
- [13] Dalamaga M, Christodoulatos GS, Mantzoros CS. The role of extracellular and intracellular Nicotinamide phosphoribosyl-transferase in cancer: Diagnostic and therapeutic perspectives and challenges. *Metabolism*. 2018 May; 82:72-87.
- [14] Wang T, Zhang X, Bheda P, Revollo JR, Imai S, Wolberger C. Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD<sup>+</sup> biosynthetic enzyme. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Jul;13(7):661-2.
- [15] Gardell SJ, Hopf M, Khan A, Dispagna M, Hampton Sessions E, Falter R, Kapoor N, Brooks J, Culver J, Petucci C, Ma CT, Cohen SE, Tanaka J, Burgos ES, Hirschi JS, Smith SR, Sergienko E, Pinkerton AB. Boosting NAD<sup>+</sup> with a small molecule that activates NAMPT. *Nat Commun*. 2019 Jul 19;10(1):3241.
- [16] Sun X, Elangovan VR, Mapes B, Camp SM, Sammani S, Saadat L, Ceco E, Ma SF, Flores C, MacDougall MS, Quijada H, Liu B, Kempf CL, Wang T, Chiang ET, Garcia JG. 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*. 2014 Nov;51(5):660-7.
- [17] 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, Mischel PS. NAD metabolic dependency in cancer is shaped by gene amplification and enhancer remodelling. *Nature*. 2019 May;569(7757):570-575.
- [18] Lucena-Cacace A, Otero-Albiol D, Jiménez-García MP, Peinado-Serrano J, Carnero A. NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor signature for glioma prognosis. *Oncotarget*. 2017 Aug 28;8(59):99514-99530.
- [19] 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, Skop V. Nuclear transport of nicotinamide phosphoribosyltransferase is cell cycle-dependent in mammalian cells, and its inhibition slows cell growth. *J Biol Chem*. 2019 May 31;294(22):8676-8689.
- [20] Grolla AA, Miggiano R, Di Marino D, Bianchi M, Gori A, Orsomando G, Gaudino F, Galli U, Del Grosso E, Mazzola F, Angeletti C, Guarneri M, Torretta S, Calabrò M, Boumya S, Fan X,

Colombo G, Travelli C, Rocchio F, Aronica E, Wohlschlegel JA, Deaglio S, Rizzi M, Genazzani AA, Garavaglia S. A nicotinamide phosphoribosyltransferase-GAPDH interaction sustains the stress-induced NMN/NAD<sup>+</sup> salvage pathway in the nucleus. *J Biol Chem*. 2020 Mar 13;295(11):3635-3651.

[21] Gasparrini M, Audrito V. NAMPT: A critical driver and therapeutic target for cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2022 Apr; 145:106189.

[22] Oita RC, Camp SM, Ma W, Ceco E, Harbeck M, Singleton P, Messana J, Sun X, Wang T, Garcia JGN. Novel Mechanism for Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibition of TNF- $\alpha$ -mediated Apoptosis in Human Lung Endothelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018 Jul;59(1):36-44.

[23] Pylaeva E, Harati MD, Spyra I, Bordbari S, Strachan S, Thakur BK, Höing B, Franklin C, Skokowa J, Welte K, Schadendorf D, Bankfalvi A, Brandau S, Lang S, Jablonska J. NAMPT signaling is critical for the proangiogenic activity of tumor-associated neutrophils. *Int J Cancer*. 2019 Jan 1;144(1):136-149.

[24] Travelli C, Colombo G, Mola S, Genazzani AA, Porta C. NAMPT: A pleiotropic modulator of monocytes and macrophages. *Pharmacol Res*. 2018 Sep; 135:25-36.

[25] Grolla AA, Travelli C, Genazzani AA, Sethi JK. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase, a new cancer metabokine. *Br J Pharmacol*. 2016 Jul;173(14):2182-94.

[26] Colombo, G., Travelli, C., Porta, C., Genazzani, A. A. (2022) Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase boosts IFN $\gamma$ -induced macrophage polarization independently of TLR4. *iScience* 25, 104021.

[27] Grolla, A. A., Torretta, S., Gnemmi, I., Amoruso, A., Orsomando, G., Gatti, M., et al. (2015) Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is a tumoral cytokine released from melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 28, 718–729.

[28] Yoshida M, Satoh A, Lin JB, Mills KF, Sasaki Y, Rensing N, Wong M, Apte RS, Imai SI. Extracellular Vesicle-Contained eNAMPT Delays Aging and Extends Lifespan in Mice. *Cell Metab*. 2019 Aug 6;30(2):329-342.e5.

[29] 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, Bruzzone S. SIRT6 deacetylase

activity regulates NAMPT activity and NAD(P)(H) pools in cancer cells. *FASEB J.* 2019 Mar;33(3):3704-3717.

[30] Semerena E, Nencioni A, Masternak K. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase: role in disease pathophysiology and as a biomarker. *Front Immunol.* 2023 Oct 17; 14:1268756.

[31] Kieswich J, Sayers SR, Silvestre MF, Harwood SM, Yaqoob MM, Caton PW. Monomeric eNAMPT in the development of experimental diabetes in mice: a potential target for type 2 diabetes treatment. *Diabetologia.* 2016 Nov;59(11):2477-2486. doi: 10.1007/s00125-016-4076-3. Epub 2016 Aug 19. PMID: 27541013; PMCID: PMC5506101.

[32] Torretta S, Colombo G, Travelli C, Boumya S, Lim D, Genazzani AA, Grolla AA. The Cytokine Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (eNAMPT; PBEF; Visfatin) Acts as a Natural Antagonist of C-C Chemokine Receptor Type 5 (CCR5). *Cells.* 2020 Feb 21;9(2):496.

[33] Camp SM, Ceco E, Evenoski CL, Danilov SM, Zhou T, Chiang ET, Moreno-Vinasco L, Mapes B, Zhao J, Gursoy G, Brown ME, Adyshev DM, Siddiqui SS, Quijada H, Sammani S, Letsiou E, Saadat L, Yousef M, Wang T, Liang J, Garcia JG. Unique Toll-Like Receptor 4 Activation by NAMPT/PBEF Induces NF $\kappa$ B Signaling and Inflammatory Lung Injury. *Sci Rep.* 2015 Aug 14; 5:13135.

[34] Adya R, Tan BK, Punn A, Chen J, Randeve HS. 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.* 2008 May 1;78(2):356-65.

[35] Dakroub A, Nasser SA, Kobeissy F, Yassine HM, Orekhov A, Sharifi-Rad J, et al. Visfatin: An emerging adipocytokine bridging the gap in the evolution of cardiovascular diseases. *J Cell Physiol* (2021) 236(9):6282–96.

[36] Fan Y, Meng S, Wang Y, Cao J, Wang C. Visfatin/PBEF/Nampt induces EMMPRIN and MMP-9 production in macrophages via the NAMPT-MAPK (p38, ERK1/2)-NF-kB signaling pathway. *Int J Mol Med* (2011) 27(4):607–15.

[37] S.-Y. Hung sy et al., “Visfatin Promotes the Metastatic Potential of Chondrosarcoma Cells by Stimulating AP-1-Dependent MMP-2 Production in the MAPK Pathway,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 16, p. 8642, Aug. 2021.

- [38] G. Wang et al., “Visfatin Triggers the Cell Motility of Non-Small Cell Lung Cancer via Up Regulation of Matrix Metalloproteinases,” *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, vol. 119, no. 6, pp. 548–554, Dec. 2016.
- [39] Moro M, Balestrero FC, Colombo G, Torretta S, Clemente N, Ciccone V, Del Grosso E, Donnini S, Travelli C, Condorelli F, Sangaletti S, Genazzani AA, Grolla AA. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) drives abnormal pericyte-rich vasculature in triple-negative breast cancer. *Angiogenesis*. 2024 Dec 5;28(1):4.
- [40] Elsevier. Adipocytokine – Medicine & Dentistry [Internet]. ScienceDirect. [cited 2025 Aug 2].
- [41] Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* (2005) 307(5708):426–30.
- [42] Cheng Q, Dong W, Qian L, Wu J, Peng Y. Visfatin inhibits apoptosis of pancreatic b-cell line, MIN6, via the mitogen-activated protein kinase/ phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Mol Endocrinol* (2011) 47(1):13–21.
- [43] Assiri AM, Kamel HF, Hassanien MF. 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*. 2015; 2015:253519.
- [44] Dalamaga M, Archondakis S, Sotiropoulos G, Karmaniolas K, Pelekanos N, Papadavid E, Lekka A. Could serum visfatin be a potential biomarker for postmenopausal breast cancer? *Maturitas*. 2012 Mar;71(3):301-8.
- [45] Zangoeei M, Nourbakhsh M, Ghahremani MH, Meshkani R, Khedri A, Shadboorestan A, Shokri Afra H, Shahmohamadnejad S, Mirmiranpour H, Khaghani S. Investigating the effect of visfatin on ERalpha phosphorylation (Ser118 and Ser167) and ERE-dependent transcriptional activity. *EXCLI J*. 2018 Jun 4; 17:516-525.
- [46] de Leeuw R, Neeffjes J, Michalides R. A role for estrogen receptor phosphorylation in the resistance to tamoxifen. *Int J Breast Cancer*. 2011; 2011:232435.
- [47] Hasmann M, Schemainda I. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Res*. 2003 Nov 1;63(21):7436-42.

- [48] Wen F, Gui G, Wang X, Ye L, Qin A, Zhou C, Zha X. Drug discovery targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT): Updated progress and perspectives. *Bioorg Med Chem*. 2024 Feb 1; 99:117595.
- [49] Tang H, Wang L, Wang T, Yang J, Zheng S, Tong J, Jiang S, Zhang X, Zhang K. Recent advances of targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) for cancer drug discovery. *Eur J Med Chem*. 2023 Oct 5; 258:115607.
- [50] Fan G, Chen S, Zhang Q, Yu N, Shen Z, Liu Z, Guo W, Tang Z, Yang J, Liu M. Proteolysis-Targeting Chimera (PROTAC): Current Applications and Future Directions. *MedComm (2020)*. 2025 Oct 4;6(10): e70401.
- [51] Zhao, L., Zhao, J., Zhong, K. et al. Targeted protein degradation: mechanisms, strategies and application. *Sig Transduct Target Ther* 7, 113 (2022).
- [52] Lata S, Mishra R, Banerjea AC. Proteasomal Degradation Machinery: Favorite Target of HIV-1 Proteins. *Front Microbiol*. 2018 Nov 21; 9:2738.
- [53] Tang H, Wang L, Wang T, Yang J, Zheng S, Tong J, Jiang S, Zhang X, Zhang K. Recent advances of targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) for cancer drug discovery. *Eur J Med Chem*. 2023 Oct 5; 258:115607.
- [54] Wu Y, Pu C, Fu Y, Dong G, Huang M, Sheng C. NAMPT-targeting PROTAC promotes antitumor immunity *via* suppressing myeloid-derived suppressor cell expansion. *Acta Pharm Sin B*. 2022 Jun;12(6):2859-2868.
- [55] Bi K, Cheng J, He S, Fang Y, Huang M, Sheng C, Dong G. Discovery of Highly Potent Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Degraders for Efficient Treatment of Ovarian Cancer. *J Med Chem*. 2023 Jan 12;66(1):1048-1062.
- [56] Cheng J, Zhang J, He S, Li M, Dong G, Sheng C. Photoswitchable PROTACs for Reversible and Spatiotemporal Regulation of NAMPT and NAD. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2024 Mar 18;63(12): e202315997.
- [57] Zhu X, Liu H, Chen L, Wu C, Liu X, Cang Y, Jiang B, Yang X, Fan G. Addressing the Enzyme-independent tumor-promoting function of NAMPT via PROTAC-mediated degradation. *Cell Chem Biol*. 2022 Nov 17;29(11):1616-1629.e12.

- [58] Cheng J, He S, Xu J, Huang M, Dong G, Sheng C. Making Protein Degradation Visible: Discovery of Theranostic PROTACs for Detecting and Degrading NAMPT. *J Med Chem*. 2022 Dec 8;65(23):15725–37.
- [59] He S, Fang Y, Zhu Y, Ma Z, Dong G, Sheng C. Drug-tamer-PROTAC Conjugation Strategy for Targeted PROTAC Delivery and Synergistic Antitumor Therapy. *Adv Sci (Weinh)*. 2024 Jul;11(25):e2401623.
- [60] M. P. Schwalm et al., “Critical assessment of LC3/GABARAP ligands used for degrader development and ligand ability of LC3/GABARAP binding pockets,” *Nat Commun*, vol. 15, p. 10204, Nov. 2024.
- [61] Zhang L, Riley-Gillis B, Vijay P, Shen Y, Tong B, Jaeger MG, et al. Targeted protein degradation strategies: PROTACs and molecular glues. *Cell Chem Biol*. 2022;29(7):1039–1055.
- [62] Zhou Z, Fan H, Yu D, Shi F, Li Q, Zhang Z, Wang X, Zhang X, Dong C, Sun H, Mi W. Glutathione-responsive PROTAC for targeted degradation of ER $\alpha$  in breast cancer cells. *Bioorg Med Chem*. 2023 Dec 15; 96:117526.
- [63] Xie S, Zhan F, Zhu J, Sun Y, Zhu H, Liu J, et al. Discovery of Norbornene as a Novel Hydrophobic Tag Applied in Protein Degradation. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2023 Mar 20;62(13).
- [64] Xie S, Zhu J, Zhan F, Feng D, He C, Liu L, Xie J, Liu J, Zhong M, Zhang X, Xu J, Yao H, Xu S. Overcoming E3 Ligase-Mediated Resistance: Development of Novel Hydrophobic Tagging-Based Degraders Targeting ALK Protein. *J Med Chem*. 2025 Aug 14;68(15):15579-15597.
- [65] Luh LM, Scheib U, Juenemann K, Wortmann L, Brands M, Cromm PM. Prey for the Proteasome: Targeted Protein Degradation-A Medicinal Chemist's Perspective. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2020 Sep 1;59(36):15448-15466.
- [66] Guo M, Song YQ, Cheng J, Dong G, Sun X, Sheng C. Hydrophobic tagging-induced degradation of NAMPT in leukemia cells. *Chinese Chemical Letters*. 2024 Sep 1;35(9).
- [67] Ahmed M, Zaghoul N, Zimmerman P, Casanova NG, Sun X, Song JH, et al. Endothelial eNAMPT drives EndMT and preclinical PH: rescue by an eNAMPT neutralizing mAb. *Pulm Circ* (2021) 11(4):204589402110597.

- [68] Bermudez T, Sammani S, Song JH, Hernon VR, Kempf CL, Garcia AN, Burt J, Hufford M, Camp SM, Cress AE, Desai AA, Natarajan V, Jacobson JR, Dudek SM, Cancio LC, Alvarez J, Rafikov R, Li Y, Zhang DD, Casanova NG, Bime C, Garcia JGN. eNAMPT neutralization reduces preclinical ARDS severity via rectified NFkB and Akt/mTORC2 signaling. *Sci Rep.* 2022 Jan 13;12(1):696.
- [69] Sammani S, Bermudez T, Kempf CL, Song JH, Fleming JC, Reyes Hernon V, Hufford M, Tang L, Cai H, Camp SM, Natarajan V, Jacobson JR, Dudek SM, Martin DR, Karmonik C, Sun X, Sun B, Casanova NG, Bime C, Garcia JGN. eNAMPT Neutralization Preserves Lung Fluid Balance and Reduces Acute Renal Injury in Porcine Sepsis/VILI-Induced Inflammatory Lung Injury. *Front Physiol.* 2022 Jun 22; 13:916159.
- [70] Garcia AN, Casanova NG, Kempf CL, Bermudez T, Valera DG, Song JH, et al. eNAMPT is a novel damage-associated molecular pattern protein that contributes to the severity of radiation-induced lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2022) 66(5):497-509.
- [71] Sun BL, Tang L, Sun X, Garcia AN, Camp SM, Posadas E, et al. A humanized monoclonal antibody targeting extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase prevents aggressive prostate cancer progression. *Pharmaceuticals* (2021) 14(12):1322.
- [72] Travelli C, Aprile S, Rahimian R, Grolla AA, Rogati F, Bertolotti M, et al. Identification of Novel Triazole-Based Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibitors Endowed with Antiproliferative and Anti-inflammatory Activity. *J Med Chem.* 2017 Mar 9;60(5):1768–92.
- [73] Bellenghi M, Talarico G, Botti L, Puglisi R, Tabolacci C, Portararo P, Piva A, Pontecorvi G, Carè A, Colombo MP, Mattia G, Sangaletti S. SCD5-dependent inhibition of SPARC secretion hampers metastatic spreading and favors host immunity in a TNBC murine model. *Oncogene.* 2022 Aug;41(34):4055-4065.
- [74] Raina K, Lu J, Qian Y, Altieri M, Gordon D, Rossi AM, Wang J, Chen X, Dong H, Siu K, Winkler JD, Crew AP, Crews CM, Coleman KG. PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Jun 28;113(26):7124-9.
- [75] Lu T, Chen F, Yao J, Bu Z, Kyani A, Liang B, Chen S, Zheng Y, Liang H, Neamati N, Liu Y. Design of FK866-Based Degradable Compounds for Blocking the Nonenzymatic Functions of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. *J Med Chem.* 2024 May 23;67(10):8099-8121.